

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7527758号  
(P7527758)

(45)発行日 令和6年8月5日(2024.8.5)

(24)登録日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
		Z Z N A	
		D	
		N	
請求項の数 27 (全212頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2018-554063(P2018-554063)	(73)特許権者	517351857
(86)(22)出願日	平成29年4月14日(2017.4.14)		アルバイン イミューン サイエンスズ
(65)公表番号	特表2019-521643(P2019-521643 A)		インコーポレイテッド
(43)公表日	令和1年8月8日(2019.8.8)		アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン
(86)国際出願番号	PCT/US2017/027817		州 シアトル イースト プレイン ストリート 1 8 8 スイート 2 0 0
(87)国際公開番号	WO2017/181152	(74)代理人	100102978
(87)国際公開日	平成29年10月19日(2017.10.19)		弁理士 清水 初志
審査請求日	令和2年4月9日(2020.4.9)	(74)代理人	100160923
審判番号	不服2022-4815(P2022-4815/J1)		弁理士 山口 裕孝
審判請求日	令和4年4月1日(2022.4.1)	(74)代理人	100119507
(31)優先権主張番号	62/394,743		弁理士 刑部 俊
(32)優先日	平成28年9月14日(2016.9.14)	(74)代理人	100142929
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 井上 隆一
		(74)代理人	100148699

最終頁に続く	最終頁に続く
--------	--------

(54)【発明の名称】 C D 8 0 バリエント免疫調節タンパク質およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CD80-Fc融合体の精製ホモ二量体であって、

該CD80-Fc融合体が、免疫グロブリンのFc領域に機能的に連結された1つのポリペプチドを含み、

該1つのポリペプチドが、IgVドメインを含む、バリエントCD80ポリペプチドであり、

該バリエントCD80ポリペプチドが、SEQ ID NO:28のアミノ酸のナンバリングを基準にしてアミノ酸置換V68Mを含み、

該バリエントCD80ポリペプチドが、(i) SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列、または(ii) SEQ ID NO:1の35～141位のアミノ酸配列、に対して少なくとも93%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ

該バリエントCD80ポリペプチドが、SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列を含む未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性でPD-L1のエクトドメインに特異的に結合する、

CD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

【請求項 2】

前記バリエントCD80ポリペプチドが、CD28およびPD-L1のエクトドメインに非競合的に結合する、請求項1記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

【請求項 3】

前記バリエントCD80ポリペプチドが、

## アミノ酸置換

V68M/L70P/L72P/K86E、

H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A、

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A/N149S/R190S、

V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A、または

V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/D115G/I118T/T130A/G133D/N149S

を含む、

請求項1または2記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項4】

前記バリエーションCD80ポリペプチドが、前記IgVドメインおよびIgCドメインを含む、請求項1～3のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項5】

前記バリエーションCD80ポリペプチドが、前記IgVドメインのみを含む、請求項1～3のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項6】

前記バリエーションCD80ポリペプチドが、

SEQ ID NO:320、321、325および327のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、または

SEQ ID NO:320、321、325および327のうちのいずれかに対して少なくとも95%の配列同一性を示しかつ前記アミノ酸置換を含有するアミノ酸配列

を含む、請求項1～4のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項7】

前記PD-L1のエクトドメインに対する向上した親和性が、前記エクトドメインに対する前記未改変CD80の結合親和性と比較して、2倍より大きく向上している、請求項1～6のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項8】

前記Fc領域が、エフェクター機能が低下しているバリエーションFc領域である、請求項1～7のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項9】

前記Fc領域が、アミノ酸置換N297A、N297Q、IgG1-N297G、IgG1-L234A/L235A、IgG1-L234A/L235E/G237A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A、またはIgG4-L236Eを含む、請求項1～8のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項10】

前記Fc領域が、IgG1に由来するFc領域であるか、エフェクター機能が低下しているバリエーションIgG1 Fc領域である、請求項1～7のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項11】

前記Fc領域が、SEQ ID NO:226に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:226に対して少なくとも85%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、請求項10記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

### 【請求項12】

前記バリエーションIgG1 Fc領域が、アミノ酸置換R292C/N297G/V302Cを含む、請求項

10

20

30

40

50

10または11記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

【請求項 1 3】

前記バリエーションIgG1Fc領域が、アミノ酸置換L234A/L235E/G237Aを含む、請求項10または11記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

【請求項 1 4】

前記Fc領域が、IgG2のFc領域である、請求項1～7のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

【請求項 1 5】

前記Fc領域が、SEQ ID NO:227に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:227に対して少なくとも85%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、請求項1～7および14のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

10

【請求項 1 6】

前記Fc領域が、IgG4のFc領域である、または変異S228Pを含有するバリエーションIgG4 Fc領域である、請求項1～8のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

【請求項 1 7】

前記1つのポリペプチドが、Fc領域ヘリンカーを介して間接的に連結されている、請求項1～16のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体。

【請求項 1 8】

請求項1～17のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体を生産するインビトロの方法であって、該Fc融合ポリペプチドをコードする核酸または核酸分子を、宿主細胞において該Fc融合ポリペプチドが発現する条件下で宿主細胞に導入する工程を含む、方法。

20

【請求項 1 9】

前記CD80-Fc融合体を、前記細胞から単離または精製して、前記CD80-Fc融合体の精製ホモ二量体を生産する工程をさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項1～17のいずれか一項記載のCD80-Fc融合体の精製ホモ二量体と、薬学的に許容し得る賦形剤とを含む、薬学的組成物。

【請求項 2 1】

請求項20記載の薬学的組成物を含む、製造品またはキット。

30

【請求項 2 2】

対象における免疫応答を調節するための医薬の製造における、請求項20記載の薬学的組成物の使用。

【請求項 2 3】

対象における免疫応答の調節に使用するための、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 4】

前記免疫応答の調節が、前記対象における疾患または病態を治療する、請求項22記載の使用。

【請求項 2 5】

前記免疫応答の調節が、前記対象における疾患または病態を治療する、請求項23記載の薬学的組成物。

40

【請求項 2 6】

前記疾患または病態が、がんである、請求項24記載の使用。

【請求項 2 7】

前記疾患または病態が、がんである、請求項25記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年4月15日に出願された「CD80リガンドバリエーション免疫調節タンパク

50

質およびその使用 (CD80 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof)」という表題の米国仮特許出願第62/353,595号、2016年9月14日に出願された「CD80リガンドバリエーション免疫調節タンパク質およびその使用 (CD80 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof)」という表題の米国仮特許出願第62/394,743号、2016年10月20日に出願された「ICOSリガンドバリエーション免疫調節タンパク質およびその使用 (CD80 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof)」という表題の米国仮特許出願第62/410,844号、2017年3月16日に出願された「CD80リガンドバリエーション免疫調節タンパク質およびその使用 (ICOS Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof)」という表題の米国仮特許出願第62/472,570号、および2017年3月22日に出願された「CD80リガンドバリエーション免疫調節タンパク質およびその使用 (CD80 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof)」という表題の米国仮特許出願第62/475,201号の優先権を主張するものであり、それらの各々の内容は、参照によってその全体として組み入れられる。

10

【0002】

#### 配列表の参照による組み入れ

本出願は、電子フォーマットの配列表と一緒に出願される。配列表は、2017年4月13日に作成された761612000440SeqList.txtという表題の815,991バイトサイズのファイルとして提供される。配列表の電子フォーマットの情報は、参照によってその全体として組み入れられる。

20

【0003】

#### 分野

本開示は、がんおよび免疫学的疾患の治療における免疫応答を調節するための治療用組成物に関する。いくつかの局面において、本開示は、同族結合パートナーに対して変化した結合親和性を示す、CD80の特定のバリエーションに関する。

【背景技術】

【0004】

#### 背景

抗原提示細胞 (APC) または標的細胞とリンパ球とにより、当該細胞間で形成される免疫シナプス (IS) で起こるプロセスへの介入により免疫応答を調節することに関して医学的関心が高まっている。機構的には、IS内の細胞表面タンパク質は、複数のタンパク質標的とそれらが結合する単一のタンパク質との間の協調的で多くの場合同時の相互作用に関与し得る。ISにおける相互作用は、2つの細胞の接合と密接に関連して起こり、この構造体内の単一のタンパク質は、同じ細胞 (シス) 上のタンパク質および相互作用している細胞 (トランス) 上のタンパク質の両方と (おそらく同時に) 相互作用することができる。ISを調節することができる治療薬が知られているが、改良された治療薬が必要とされている。このようなニーズを満たす、細胞上に発現することができる可溶性タンパク質または膜貫通型免疫調節タンパク質を含む免疫調節タンパク質を提供する。

30

【発明の概要】

【0005】

40

#### 概要

いくつかの態様において、IgVドメインもしくはその特異的結合断片、IgCドメインもしくはその特異的結合断片、または両方を含む、バリエーションCD80ポリペプチドであって、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置4、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、24、25、27、28、29、30、31、33、36、37、38、40、41、42、43、44、47、48、50、52、53、54、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、72、74、76、77、80、81、83、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、99、102、103、104、108、107、109、110、114、115、116、117、118、120、121、122、126、127、128、129、130、133、137、140、142、143、144、148、149、152、154、160、162、

50

164、168、169、174、175、177、178、183、178、185、188、190、192、193、または199に対応する、未改変CD80またはその特異的結合断片における1つまたは複数のアミノ酸改変を含有するバリエーションCD80ポリペプチドが本明細書において提供される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変は、1つまたは複数のアミノ酸置換、挿入、または欠失を含む。いくつかの態様において、未改変CD80は、哺乳動物CD80またはその特異的結合断片である。いくつかの態様において、未改変CD80は、ヒトCD80またはその特異的結合断片である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片；およびIgCドメインまたはその特異的結合断片を含む。いくつかの態様において、未改変CD80は、(i) SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列、(ii) SEQ ID NO:28に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) その一部分であって、IgVドメインもしくはIgCドメインまたはそれらの特異的結合断片を含む部分を、含む。

10

**【0006】**

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、IgVドメインまたはIgCドメインの特異的結合断片は、少なくとも50、60、70、80、90、100、110アミノ酸またはそれより多いアミノ酸の長さを有するか；IgVドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO:1の35～135番目のアミノ酸として示されるIgVドメインの長さの少なくとも80%の長さを含むか；または、IgCドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO:1の145～230番目のアミノ酸として示されるIgCドメインの長さの少なくとも80%の長さを含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変（任意でアミノ酸置換）を含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28またはその特異的結合断片に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80は、CD28、PD-L1、またはCTLA-4のエクトドメインに対する結合特異性が未改変CD80と比較して変化している。いくつかの場合では、結合性の変化は、結合親和性の変化および/または結合選択性の変化である。

20

**【0007】**

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

30

40

50

V4M, K9E, E10R, V11S, A12G, A12T, A12V, T13N, L14A, S15V,  
 S15F, C16S, C16G, C16L, G17W, H18L, H18R, H18Y, V20L, S21P, V22A, E24G, L25P,  
 Q27R, T28A, T28S, R29C, R29D, R29H, R29V, I30V, Y31F, Y31H, Y31L, Q33H, K36E,  
 K36G, K37E, K37Q, M38I, M38L, M38T, M38V, L40M, T41A, T41G, T41D, T41I, M42T,  
 M43I, M43Q, M43R, M43V, S44P, M47T, N48I, N48D, W50G, E52G, Y53C, K54M, F59L,  
 F59S, D60V, I61N, T62S, N63S, N64S, L65H, S66H, I67F, I67T, V68A, V68M, I69T, L70Q,  
 L70P, L70R, L72P, P74L, D76G, E77G, E77K, Y80N, E81A, E81R, E81V, V83A, V83I, L85I, 10  
 L85R, K86E, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90L, D90N, A91E, A91G,  
 A91S, A91T, F92L, F92N, F92P, F92Y, K93I, K93E, K93Q, K93R, K93V, R94G, R94L, R94F,  
 E95K, H96R, L97R, E99G, E99D, L102S, S103L, S103P, V104A, V104L, D107N, F108L,  
 P109S, P109H, T110A, S114T, D115G, F116S, F116L, E117V, E117G, I118V, I118A, I118T,  
 T120S, S121P, N122S, I126L, I126V, I127T, C128Y, C128R, S129L, S129P, T130A, G133D,  
 P137L, S140T, L142S, E143G, N144S, N144D, L148S, N149D, N149S, N152T, T154I, T154A,  
 E160G, E162G, Y164H, S168G, K169E, K169I, K169S, M174T, M174V, T175A, N177S, 20  
 H178R, L183H, K185E, H188D, H188Q, R190S, N192D, Q193L, T199S

またはその保存的アミノ酸置換である。

【 0 0 0 8 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80またはその特異的結合断片における1つまたは複数のアミノ酸欠失を含む、IgVドメインもしくはIgCドメインまたはそれらの特異的結合断片を含有する。いくつかの態様において、欠失は、SEQ ID NO:28の位置43に対応する。

【 0 0 0 9 】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、 30  
 V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A, A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,  
 A12V/S15F/Y31H/T41G/T130A/P137L/N152T, V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A,  
 V22A/L70Q/S121P, E24G/L25P/L70Q/T120S, T28S/L70Q/A91G/E95K/T120S/T130A,

10

20

30

40

50

E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P  
/K93V/R94L/H96R,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S, 10  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,  
R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/T130A, R29H/E52G/T120S/T130A,  
R29V/Y31F/K36G/M38L/M43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G,  
R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G,  
Y31H/T41G/L70Q/A91G/T120S/T130A, K36G, K36G/K37Q/M38I/L40M,  
K36G/K37Q/M38I/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S, 20  
K36E/I67T/L70Q/A91G/T120S/T130A/N152T, K37E/F59S/L70Q/A91G/T120S/T130A,  
M38T/L70Q/E77G/A91G/T120S/T130A/N152T,  
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/T120S/T130A, T41I/A91G,  
S44P/L70Q/A91G/T130A, E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A, K54M/A91G/T120S,  
D60V/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, S66H/D90G/T110A/F116L,  
I67F/L70R/E88G/A91G/T120S/T130A, I67T/L70Q/A91G/T120S, V68A/T110A,  
V68M/L70P/L72P/K86E, L70Q/A91G/T110A/T120S/T130A,  
L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A, L70Q/Y87N/A91G/T130A, L70Q/A91G, 30  
L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A, L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/T130A,  
L70Q/A91G/I118A/T20S/T130A, L70R/A91G/T120S/T130A,  
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89E/T130A, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,  
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S,  
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S, A91G, A91G/F92L/F108L/T120S,  
A91G/L102S, A91G/S103P, A91G/T120S/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93 40

40





40

P/K93V/R94L/ L97R/T130A/L183H,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/ I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/T130A/N149S/K169I, I118T/C128R, Q27R/R29C/M42T/S129P/E160G, S129P/T154A,  
S21P/L70Q/D90G/T120S/T130A, L70Q/A91G/N144D,  
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E, V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,  
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A,  
V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A, L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A,  
A91G/I118V/T120S/T130A, L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S,  
L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A,  
T28S/L70Q/A91G/E95K/I118V/T120S/I126V/T130A/K169E,  
N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,  
K36E/I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T,  
E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E,  
K37E/F59S/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K185E,  
D60V/A91G/I118V/T120S/T130AK169E, K54M/L70Q/A91G/Y164H/T120S,  
M38T/L70Q/E77G/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T,  
Y31H/T41G/M43L/L70Q/A91G/I118V/T120S/I126V/T130A, L65H/D90G/T110A/F116L,  
R29H/E52G/D90N/I118V/T120S/T130A, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,  
L70Q/A91G/T110A/I118V/T120S/T130A,  
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/I118V/T120S/I126V/T130A,  
A12V/S15F/Y31H/M38L/T41G/M43L/D90N/T130A/P137L/N149D/N152T,  
I67F/L70R/E88G/A91G/I118V/T120S/T130A, E24G/L25P/L70Q/A91G/I118V/T120S/N152T,

10

20

30

40

50

A91G/F92L/F108L/I118V/T120S, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S,  
K36G/K37Q/M38I/L40M/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N14  
9S, K36G/L40M,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/T130A/K169E/M174T,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N48D/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,  
H18R/R29D/Y31L/Q33H/K36G/K37E/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91  
T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/E143G/K169E/M174V/H188D,  
R29D/I30V/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V  
/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118  
V/T120S/I127T/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/F108L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/T130A/N149D/K169E/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92

10

20

30

40

50

P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
 L/I118V/T120S/I127T/C128Y/T130A/H188D,  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/E99D/T130A,  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
 P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/I61N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V  
 /R94F/V104A/I118V/T120S/I126V/T130A,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
 F/I118V/T120S/T130A,  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/L142S/H188D,  
 C16S/H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
 P/K93V/R94L/T110A/I118V/H188D,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/D76G/A91G/S103L/I118V/T120S/I1  
 27T/T130A,Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
 T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E,  
 Y53C/L70Q/D90G/T130A/N149D/N152T/H188D,  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D, または  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/T130A/N149S

10

20

30

である。

【 0 0 1 0 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインもしくはその特異的断片および/またはIgCドメインもしくはその特異的断片を含有する。バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片を含有する。いくつかの態様において、IgVドメインまたはその特異的結合断片は、バリエーションCD80ポリペプチドの唯一のCD80部分である。いくつかの態様において、IgCドメインまたはその特異的結合断片は、バリエーションCD80ポリペプチドの唯一のCD80部分である。

40

【 0 0 1 1 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:55 ~ 108、280 ~ 346、414 ~ 475のうちのいずれかもしくはその特異的結合断片に示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:55 ~ 108、280 ~ 346、414 ~ 475のうちのいずれかもしくはその特異的結合断片に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%

50

、96%、97%、98%、99%の配列同一性を示しかつ1つまたは複数のアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片を含む。いくつかの態様において、IgVドメインまたはその特異的断片は、バリエーションCD80ポリペプチドの唯一のCD80部分である。いくつかの態様において、IgCドメインまたはその特異的断片は、バリエーションCD80ポリペプチドの唯一のCD80部分である。バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:153~195、347、373~386、476~477のいずれかもしくはその特異的結合断片に示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:153~195、347、373~386、476~477のいずれかもしくはその特異的結合断片に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を示しかつ1つまたは複数のアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列を含む。

10

#### 【0012】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未変換CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28、PD-L1、またはCTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。任意のそのような態様のいくつかにおいて、バリエーションポリペプチドは、エクトドメインに対する未変換CD80の結合性と比較して向上した選択性で、CD28、PD-L1、またはCTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの局面において、選択性の向上は、CD28、PD-L1、およびCTLA-4の中から選択される1つの同族結合パートナーに対する結合性と、該同族結合パートナーのうちの別のものに対する結合性との比率が、該1つの同族結合パートナーに対する未変換CD80ポリペプチドの結合性と、該同族結合パートナーのうちの該別のものに対する未変換CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む。

20

#### 【0013】

いくつかの態様において、バリエーションポリペプチドは、CD28のエクトドメインに対する未変換CD80の結合性と比較して向上した選択性で、CD28のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの局面において、選択性の向上は、CD28に対する結合性と、PD-L1またはCTLA-4に対する結合性との比率が、CD28に対する未変換CD80ポリペプチドの結合性と、PD-L1またはCTLA-4に対する未変換CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む。いくつかの場合では、当該比率は、少なくともまたは少なくとも約1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、またはそれ以上大きい。

30

#### 【0014】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未変換CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、当該エクトドメインに対する向上した親和性は、当該エクトドメインに対する未変換CD80の結合親和性と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より大きく向上している。

#### 【0015】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置12、18、20、29、31、36、40、41、43、52、59、60、63、67、70、77、81、87、88、89、90、91、92、93、107、109、114、117、118、120、122、127、130、144、169、177、または199に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

40

A12T, H18L, V20L,

R29H, Y31H, K36G, L40M, T41G, T41I, M43V, E52G, F59L, D60V, N63S, I67T, L70Q, L70R, E77K, E81A, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90K, D90N, A91G, A91S, F92Y, K93R, D107N, P109S, S114T, E117G, I118A, I118T, I118V, T120S, I127T, T130A, N144D, K169E, N177S および T199S

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

10

A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T, V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A,

V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A,

R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M, T41I/A91G, E52G/L70/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E, D60V/A91G/T120S/T130A, D60V/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,

20

L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A, L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A,

L70Q/Y87N/A91G/T130A, L70Q/A91G, L70Q/A91G/N144D,

L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A, L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A,

L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E,

L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

L70R/A91G/T120S/T130A, L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または

30

K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S

である。

【 0 0 1 6 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、PD-L1のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの場合では、当該エクトドメインに対する向上した親和性は、当該エクトドメインに対する未改変CD80の結合親和性と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より大きく向上している。任意のそのような態様のいくつかにおいて、バリエーションポリペプチドは、当該エクトドメインに対する未改変CD80の結合性と比較して向上した選択性で、PD-L1のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの場合では、選択性の向上は、PD-L1に対する結合性と、CD28またはCTLA-4に対する結合性との比率が、PD-L1に対する未改変CD80ポリペプチドの結合性と、CD28またはCTLA-4に対する未改変CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む。いくつかの場合では、当該比率は、少なくともまたは少なくとも約1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、またはそれ以上大きい。

40

【 0 0 1 7 】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置12、18、29、31、33、36、38、40、41、42、43、47、59

50

、67、70、77、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、109、118、120、122、144、148、149、または177に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

A12T, H18L, R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, L40M,

T41A, T41G, M42T, M43R, M43V, M47T, F59L, I67T, L70Q, E77K, E81V, L85R, Y87N,

E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90N, A91G, A91T, F92P, F92Y, K93R, K93V,

R94L, P109S, I118T, I118V, T120S, N122S, N144S, L148S, N149S, および N177S

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S,

R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または A91G

である。

【0018】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28のエクトドメインおよびPD-L1のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置12、18、36、40、43、59、77、88、89、90、91、92、93、109、118、122、177に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、A12T, H18L, K36G, L40M, M43V, F59L, E77K, E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, P109S, I118T, N112S, N177S

およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T, K36G, K36G/L40M,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または

K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S

である。

【0019】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CTL



A-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、当該エクトドメインに対する向上した親和性は、当該エクトドメインに対する未改変CD80の結合親和性と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍、またはそれより大きく向上している。任意のそのような態様のいくつかにおいて、バリエーションポリペプチドは、エクトドメインに対する未改変CD80の結合性と比較して向上した選択性で、CTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの場合では、選択性の向上は、CTLA-4に対する結合性と、CD28またはPD-L1に対する結合性との比率が、CTLA-4に対する未改変CD80ポリペプチドの結合性と、CD28またはPD-L1に対する未改変CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む。いくつかの態様において、当該比率は、少なくともまたは少なくとも約1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、またはそれ以上大きい。

10

【0020】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置4、29、31、36、40、41、52、67、68、70、87、88、89、90、91、92、93、107、109、110、118、120、130、144、または169に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

V4M, R29H, Y31H,  
K36G, L40M, T41G, E52G, I67T, V68A, L70Q, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90K,  
D90N, A91G, F92Y, K93R, D107N, P109S, T110A, I118V, T120S, T130A, N144D, および K169E

20

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A,

V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M,

E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, V68A/T110A, L70Q/A91G,

30

L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

L70Q/A91G/T130A, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,

A91G/I118V/T120S/T130A, または A91G/T120S/T130A

である。

【0021】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28のエクトドメインおよびCTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28の位置36、40、52、70、88、89、90、91、92、93、107、118、120、130、144、または169に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

40

K36G, L40M, E52G, L70Q,

E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, D107N, I118V, T120S, T130A, N144D, および K169E

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

50

K36G, K36G/L40M, E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A,  
E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E, L70Q/A91G, L70Q/A91G/N144D,  
L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,  
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R  
である。

【 0 0 2 2 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、PD-L1のエクトドメインおよびCTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28の位置29、31、36、40、41、67、70、87、88、89、90、91、92、93、109、118、120、122、または178に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

10

R29H, Y31H, K36G,  
L40M, T41G, I67T, L70Q, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90N, D90K, A91G, F92Y,  
K93R, P109S, I118V, T120S

およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、  
R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M,  
I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,  
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

20

である。

【 0 0 2 3 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28のエクトドメイン、PD-L1のエクトドメイン、およびCTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28の位置36、40、88、89、90、91、92、または93に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、K36G、L40M、E88D、K89R、D90K、A91G、F92Y、K93R、およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

30

K36G, K36G/L40M, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

である。

【 0 0 2 4 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28のエクトドメインまたはPD-L1のエクトドメインに特異的に結合し、またバリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性で、CTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28の位置29、31、33、36、38、41、42、43、47、63、67、70、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、109、114、118、120、127、130、144、148、または149に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

40

50

R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, T41G, M42T, M43R, M47T, N63S, I67T, L70Q, E81A, E81V, L85R, Y87N, E88G, K89E, K89N, D90N, A91G, A91T, F92P, K93V, R94L, P109S, S114T, I118T, I118V, T120S, I127T, T130A, N144S, L148S, および N149S ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A, または L70Q/Y87N/A91G/T120S/I127T/T130A

10

である。

#### 【 0 0 2 5 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28のエクトドメインに特異的に結合し、またバリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性で、CTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28の位置63、70、81、87、91、114、118、120、127、または130に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、N63S、L70Q、E81A、Y87N、A91G、S114T、I118V、T120S、I127T、およびT130A、ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S,

20

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,

30

N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, または

L70Q/Y87N/A91G/T120S/I127T/T130A

である。

#### 【 0 0 2 6 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、PD-L1のエクトドメインに特異的に結合し、またバリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性で、CTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28の位置29、31、33、36、38、41、42、43、47、67、70、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、109、118、120、144、148、149に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

40

R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A,  
T41G, M42T, M43R, M47T, I67T, L70Q, E81V, L85R, Y87N, E88G, K89E, K89N, D90N,  
A91G, A91T, F92P, K93V, R94L, P109S, I118T, I118V, T120S, N144S, L148S, および N149S  
ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。いくつかの態様において、  
1つまたは複数のアミノ酸置換は、  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,  
I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, または I67T/L70Q/A91G/T120S

10

20

である。

【 0 0 2 7 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で、CD28のエクトドメインおよびPD-L1のエクトドメインに特異的に結合し、またバリエーションCD80ポリペプチドは、未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性で、CTLA-4のエクトドメインに特異的に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28の70、81、87、91、または120の位置に対応する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、L70Q、Y87N、A91G、およびT120S、ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される。

30

【 0 0 2 8 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、CD28はヒトCD28である。いくつかの態様において、PD-L1はヒトPD-L1である。いくつかの態様において、CTLA-4はヒトCTLA-4である。

【 0 0 2 9 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、結合活性は、未改変CD80ポリペプチドと比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より大きく変化（向上または低下）している。

【 0 0 3 0 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、可溶性タンパク質である。

40

【 0 0 3 1 】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、多量体化ドメインに連結されている。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、多量体化ドメインに連結された第一のバリエーションCD80ポリペプチドおよび多量体化ドメインに連結された第二のバリエーションCD80ポリペプチドを含む、多量体ポリペプチド、任意で二量体ポリペプチドである。いくつかの態様において、第一のバリエーションCD80ポリペプチドおよび第二のバリエーションCD80ポリペプチドは、同じであるかまたは異なる。いくつかの態様において、多量体化ドメインは、エフェ

50

クター機能が低下しているFcドメインまたはそのバリエーションである。

【0032】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、ポリペプチドの生物学的半減期を延長させる部分に連結されている。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、エフェクター機能が低下しているFcドメインまたはそのバリエーションに連結されている。いくつかの態様において、Fcドメインは、哺乳動物（任意でヒト）のものであるか；または、バリエーションFcドメインは、哺乳動物（任意でヒト）のものである未改変Fcドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変を含有する。いくつかの態様において、Fcドメインまたはそのバリエーションは、SEQ ID NO:226もしくはSEQ ID NO:227に示されるアミノ酸配列を含有するか、または、SEQ ID NO:226もしくはSEQ ID NO:227に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、リンカーを介して間接的に連結されている。

10

【0033】

膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、バリエーションCD80ポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に連結された膜貫通ドメインをさらに含有する。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:1の243～263番目の残基として示されるアミノ酸配列を含有するか、または、SEQ ID NO:1の243～263番目の残基に対して少なくとも85%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、膜貫通ドメインに連結された細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含有する。いくつかの態様において、細胞質シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:1の264～288番目の残基として示されるアミノ酸配列を含有するか、または、SEQ ID NO:1の264～288番目の残基に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含有する。

20

【0034】

バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80は、インビトロ初代T細胞アッセイにおいて、未改変CD80と比べてIFN-（インターフェロン-）発現を増加させる。バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80は、インビトロ初代T細胞アッセイにおいて、未改変CD80と比べてIFN-（インターフェロン-）発現を減少させる。バリエーションCD80ポリペプチドのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、脱グリコシル化されている。

30

【0035】

いくつかの態様において、免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメインを含む第二のポリペプチドに連結された本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80を含む免疫調節ポリペプチドが本明細書において提供される。いくつかの態様において、IgSFドメインは、未改変または野生型IgSFドメインと比較して、親和性が改変されており、かつその同族結合パートナーのうちの1つまたは複数に対する結合性が変化している。いくつかの態様において、IgSFドメインは、その同族結合パートナーのうちの1つまたは複数に対する結合性が、未改変または野生型IgSFドメインと比較して向上している。いくつかの態様において、バリエーションCD80は第一のバリエーションCD80であり、第二のポリペプチドのIgSFドメインは、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る第二のバリエーションCD80由来のIgSFドメインであり、ここで、第一および第二のバリエーションCD80は、同じであるかまたは異なる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、またはCTLA-4に特異的に結合することができ、第二のポリペプチドのIgSFドメインは、バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる。いくつかの態様において、バリエーションCD

40

50

80ポリペプチドは、CD28またはPD-L1に特異的に結合することができ、IgSFドメインは、バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28またはCTLA-4に特異的に結合することができ、IgSFドメインは、バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CTLA-4またはPD-L1に特異的に結合することができ、IgSFドメインは、バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる。いくつかの態様において、IgSFドメインは、B7ファミリーのメンバー由来である。いくつかの態様において、IgSFドメインは、腫瘍上に発現するリガンドに結合する腫瘍局在化部分である。いくつかの態様において、リガンドは、B7H6である。いくつかの態様において、IgSFドメインは、NKP30由来である。いくつかの態様において、IgSFドメインは、未改変または野生型IgSFドメインと比較して、親和性が改変されており、かつその同族結合パートナーのうちの1つまたは複数に対する結合性が向上している。いくつかの態様において、IgSFドメインは、IgVドメインであるかまたはIgVドメインを含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインであるかまたはIgVドメインを含有する。

10

#### 【0036】

免疫調節タンパク質のうちのいずれか1つに係るいくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、バリエーションCD80ポリペプチドおよび第二のポリペプチド（IgSFドメインを含む）の一方または両方に連結された、多量体化ドメインを含有する。いくつかの態様において、多量体化ドメインは、エフェクター機能が低下しているFcドメインまたはそのバリエーションである。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、二量体である。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、ホモ二量体である。いくつかの場合では、免疫調節タンパク質は、ヘテロ二量体である。

20

#### 【0037】

いくつかの態様において、ある部分に連結された、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る免疫調節ポリペプチドを含む、コンジュゲートが本明細書において提供される。いくつかの態様において、前記部分は、細胞の表面上の分子に特異的に結合する標的化部分である。いくつかの態様において、標的化部分は、免疫細胞の表面上の分子に特異的に結合する。いくつかの態様において、免疫細胞は、抗原提示細胞またはリンパ球である。いくつかの態様において、標的化部分は、腫瘍の表面上の分子に結合する腫瘍局在化部分である。いくつかの態様において、前記部分は、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子またはナノ粒子である。いくつかの態様において、前記部分は、抗体または抗原結合断片である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、コンジュゲートは、二価、四価、六価または八価である。

30

#### 【0038】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る免疫調節ポリペプチドを、コードする核酸分子が本明細書において提供される。いくつかの態様において、核酸分子は、合成核酸である。いくつかの態様において、核酸は、cDNAである。

40

#### 【0039】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つの核酸を含むベクターが本明細書において提供される。いくつかの態様において、ベクターは、発現ベクターである。

#### 【0040】

いくつかの態様において、ベクターは、哺乳動物ベクターまたはウイルスベクターである。

#### 【0041】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るベクター

50

を含む細胞が本明細書において提供される。いくつかの態様において、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの態様において、細胞は、ヒト細胞である。

【0042】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を生産する方法であって、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る核酸分子または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るベクターを、細胞においてタンパク質を発現させる条件下で宿主細胞に導入する工程を含む方法が本明細書において提供される。いくつかの態様において、該方法は、バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を細胞から単離または精製する工程をさらに含む。

【0043】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドを発現する細胞を改変する方法であって、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80ポリペプチドをコードする核酸分子を、ポリペプチドが細胞において発現する条件下で宿主細胞に導入する工程を含む、方法が本明細書において提供される。

【0044】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80ポリペプチド、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る免疫調節タンパク質、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る核酸分子、または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るベクターを、発現する改変細胞が本明細書において提供される。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドは、シグナルペプチドを含有する。いくつかの局面において、バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドは、膜貫通ドメインを含有せず、かつ/または、細胞の表面上には発現しない。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドは、改変細胞から分泌される。

【0045】

いくつかの態様において、改変細胞は、膜貫通ドメインを含有しかつ/または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る膜貫通型免疫調節タンパク質である、バリエーションCD80ポリペプチドを含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、細胞の表面上に発現する。

【0046】

いくつかの態様において、改変細胞は、免疫細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞は、抗原提示細胞（APC）またはリンパ球である。いくつかの態様において、改変細胞は、初代細胞である。いくつかの態様において、改変細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの態様において、改変細胞は、ヒト細胞である。いくつかの態様において、リンパ球は、T細胞である。いくつかの態様において、APCは、人工APCである。

【0047】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、改変細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）または改変されたT細胞受容体をさらに含有する。

【0048】

また、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80ポリペプチドまたは本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る免疫調節ポリペプチドを、コードする核酸分子を含む感染性物質が提供される。いくつかの場合では、コードされているバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドは、膜貫通ドメインを含有せず、かつ/または、それが発現する細胞の表面上には発現しない。いくつかの態様において、コードされているバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドは、それを発現する細胞から分泌される。いくつかの局面において、コードされているバリエーションCD80ポリペプチドは、膜貫通ドメインを含有する。いくつかの局面において、コードされているバリエーションCD80ポリペプチドは、それを発現する細胞の表面上に発現する。

【0049】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、感染性物質は、細菌またはウイルスである

10

20

30

40

50

。いくつかの場合では、ウイルスは、腫瘍溶解性ウイルスである。いくつかの態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口腔ウイルス (Vesticular Stomatic virus)、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パルボウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス (vesticular stomatitis virus) (VSV)、コクサッキーウイルスまたはワクシニアウイルスである。いくつかの態様において、ウイルスは、樹状細胞 (DC) を特異的に標的化し、かつ/または、樹状細胞指向性である。いくつかの場合では、ウイルスは、改変されたシンドビスウイルスエンベロープ産物で偽型化されたレンチウイルスベクターである。

【0050】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、感染性物質は、標的細胞の死をもたらすかまたは免疫応答を増強もしくは強化することができるさらなる遺伝子産物をコードする核酸分子をさらに含有する。いくつかの態様において、さらなる遺伝子産物は、抗がん剤、抗転移剤、抗血管新生剤、免疫調節分子、免疫チェックポイント阻害剤、抗体、サイトカイン、成長因子、抗原、細胞傷害性遺伝子産物、アポトーシス促進性遺伝子産物、抗アポトーシス性遺伝子産物、細胞マトリックス分解性遺伝子、組織再生のための遺伝子、またはヒト体細胞の多能性へのリプログラミングのための遺伝子から選択される。

10

【0051】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80ポリペプチド、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る免疫調節タンパク質、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るコンジュゲート、または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る改変細胞を含む、薬学的組成物が本明細書において提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤をさらに含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、滅菌されている。

20

【0052】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る薬学的組成物をバイアル中に含む製造品が本明細書において提供される。いくつかの態様において、バイアルは密閉されている。

【0053】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る薬学的組成物と使用説明書とを含むキットが本明細書において提供される。いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る製造品と使用説明書とを含むキットが本明細書において提供される。

30

【0054】

いくつかの態様において、対象における免疫応答を調節する方法であって、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る薬学的組成物を対象に投与する工程を含む方法が本明細書において提供される。いくつかの態様において、該方法は、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る改変細胞を投与する工程を含む。いくつかの態様において、改変細胞は、対象にとって自家である。いくつかの態様において、改変細胞は、対象にとって同種である。

【0055】

いくつかの態様において、免疫応答を調節することは、対象における疾患または病態を治療する。いくつかの態様において、免疫応答が増強される。いくつかの態様において、腫瘍局在化部分に連結されたバリエーションCD80ポリペプチドを含む免疫調節タンパク質またはコンジュゲートが対象に投与される。いくつかの場合では、腫瘍局在化部分は、腫瘍抗原を認識する結合分子であるかまたはそれを含有する。いくつかの場合では、結合分子は、抗体もしくはその抗原結合断片を含有するか、または、野生型IgSFドメインまたはそのバリエーションを含有する。

40

【0056】

いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る免疫調節タンパク質または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るコンジュゲートを含

50



む薬学的組成物が対象に投与される。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションCD80ポリペプチドを含む改変細胞が対象に投与され、かつ/または、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る改変細胞が対象に投与される。

【0057】

いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションCD80ポリペプチドをコードする感染性物質が、任意で感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染しかつ膜貫通型免疫調節タンパク質が感染細胞の表面上に発現する条件下で、対象に投与される。いくつかの局面において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る膜貫通型免疫調節タンパク質である。

【0058】

いくつかの態様において、疾患または病態は、腫瘍またはがんである。いくつかの態様において、疾患または病態は、黒色腫、肺がん、膀胱がん、血液悪性腫瘍、肝臓がん、脳がん、腎臓がん、乳がん、膵臓がん、大腸がん、脾臓がん、前立腺がん、精巣がん、卵巣がん、子宮がん、胃がん、筋骨格がん、頭頸部がん、消化器がん、生殖細胞がん、または内分泌および神経内分泌がんから選択される。

【0059】

いくつかの態様において、免疫応答は、免疫応答を調節する提供される方法によって低下する。

【0060】

いくつかの態様において、可溶性である、バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、対象に投与される。いくつかの場合では、可溶性ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、Fc融合タンパク質である。任意のそのような態様のいくつかにおいて、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係るバリエーションCD80ポリペプチド、または本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る免疫調節タンパク質を含む、薬学的組成物が対象に投与される。いくつかの態様において、分泌性バリエーションCD80ポリペプチドを含む改変細胞が対象に投与される。いくつかの態様において、本明細書に記載の態様のうちのいずれか1つに係る改変細胞が対象に投与される。

【0061】

いくつかの態様において、分泌性免疫調節タンパク質であるバリエーションCD80ポリペプチドをコードする感染性物質が、任意で感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染しかつ分泌性免疫調節タンパク質が感染細胞から分泌される条件下で、対象に投与される。

【0062】

任意のそのような態様のいくつかにおいて、疾患または病態は、炎症性または自己免疫性の疾患または病態である。いくつかの態様において、疾患または病態は、抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎、血管炎、自己免疫性皮膚疾患、移植手術（transplantation）、リウマチ性疾患、炎症性消化器疾患、炎症性眼疾患、炎症性神経系疾患、炎症性肺疾患、炎症性内分泌疾患、または自己免疫性血液学的疾患である。いくつかの態様において、疾患または病態は、炎症性腸疾患、移植（transplant）、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、喘息、関節リウマチ、または乾癬から選択される。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1A】図1A～1Cは、提供されるバリエーションIgSFドメイン分子の種々のフォーマットを示す。図1Aは、以下を含む可溶性分子を示す：（1）Fc鎖に融合された、バリエーションIgSFドメイン（vIgD）、例えばバリエーションCD80；（2）第一のバリエーションIgSFドメイン（第一のvIgD）、例えばバリエーションCD80、および第二のIgSFドメイン、例えば第二のバリエーションIgSFドメイン（第二のvIgD）を含有する、スタック分子；（3）第一のバリエーションIgSFドメイン（vIgD）、例えばバリエーションCD80、および腫瘍抗原を標的化するIgSFドメイン、例えばNkP30 IgSFドメインを含有する、腫瘍標的化IgSF分子；ならびに（4）抗体（V-Mab）に連結された、バリエーションIgSFドメイン（vIgD）、例えばバリエーションCD80。

10

20

30

40

50

【図 1 B】図 1B は、細胞の表面上に発現するバリエーション IgSF ドメイン (vIgD) を含有する膜貫通型免疫調節タンパク質 (TIP) を示す。例示的な態様において、膜貫通型結合 vIgD の同族結合パートナーは共刺激受容体であり、vIgD (例えば、CD80 vIgD) を含有する TIP は、共刺激受容体を発現する細胞において TIP が陽性シグナルを誘導するように、共刺激受容体を作動させる。

【図 1 C】図 1C は、バリエーション IgSF ドメイン (vIgD) が、細胞、例えば第一の T 細胞 (例えば、CAR T 細胞) から分泌される、分泌された免疫調節タンパク質 (SIP) を示す。例示的な態様において、分泌された vIgD の同族結合パートナーは、第一の細胞 (例えば、T 細胞) および/または第二の細胞 (例えば、T 細胞; 内因性または改変型のいずれか、例えば CAR T 細胞) 上に発現することができる、活性化受容体、例えば、CD28 である。SIP とその同族結合パートナーとの結合によって、活性化受容体を介したシグナル伝達が遮断される。全ての場合で、vIgD は、単に V-ドメイン (IgV) であることも、細胞外ドメイン (ECD) 全体を含む V-ドメイン (IgV) と C-ドメイン (IgC) との組み合わせであることも、IgSF スーパーファミリーメンバーの Ig ドメインの任意の組み合わせであることもできる。

10

【図 2】vIgD が CD80 の IgSF ドメインのバリエーションである、Fc (vIgD-Fc) に融合されたバリエーション IgSF ドメイン (vIgD) の活性の例示的な概略図を示す。示すとおり、CD80 の可溶性 vIgD がその同族結合パートナーと相互作用して、CD28 の相互作用を遮断し、それによって、CD28 共刺激受容体による共刺激を遮断する。

【図 3】バリエーション IgSF ドメイン (vIgD) を腫瘍細胞に局在化するためのスタック分子の例示的な概略図を示す。このフォーマットでは、スタック分子は、第一のバリエーション IgSF ドメイン (第一の vIgD) および第二の IgSF ドメイン (例えば、第二の vIgD) を含有し、そこで第二の IgSF ドメイン (例えば、第二の vIgD) は、腫瘍抗原に結合する腫瘍標的化 IgSF ドメインである。例示的な腫瘍標的化 IgSF ドメインは、腫瘍抗原 B7-H6 に結合する、NKP30 の IgSF ドメインである。この描写において、vIgD は、CD80 の IgSF ドメインのバリエーションである。示すとおり、腫瘍標的化 IgSF ドメインの腫瘍細胞の表面への結合は、第一の vIgD を腫瘍細胞表面上に局在化し、そこで、vIgD は、隣接する免疫細胞 (例えば、T 細胞) の表面上に発現するその同族結合パートナー (例えば、CD28) のうちの 1 つまたは複数と相互作用して、共刺激受容体を刺激することができる。

20

【図 4】第一のバリエーション IgSF ドメイン (第一の vIgD) および第二の IgSF ドメイン、例えば第二のバリエーション IgSF ドメイン (第二の vIgD) を含有する、スタック分子の種々の例示的な配置を示す。示すとおり、第一の vIgD および第二の IgSF ドメインは、独立して、直接的または間接的に、Fc サブユニットの N 末端または C 末端に連結されている。ホモ二量体 Fc 分子を生成するために、Fc サブユニットは、細胞中での個々の Fc サブユニットの共発現によって Fc サブユニットがマッチした、ホモ二量体を形成することができるものである。ヘテロ二量体 Fc 分子を生成するために、個々の Fc サブユニットは、個々の Fc サブユニットが細胞中で共発現するときホモ二量体と比較してヘテロ二量体の形成が優先されるような、変異 (例えば、CH3 ドメインにおける「ノブイントゥーホール (knob-into-hole)」変異) を含有する。

30

【図 5】抗体 (例えば、抗 HER2 抗体) が腫瘍細胞の表面上の抗原に結合する、抗体 (V-Mab) にコンジュゲートされたバリエーション IgSF ドメイン (vIgD) の活性の例示的な概略図を示す。この描写において、vIgD は、CD80 の IgSF ドメインのバリエーションである。示すとおり、腫瘍細胞の表面への抗体の結合は、vIgD を腫瘍細胞表面上に局在化し、そこで、vIgD は、隣接する免疫細胞 (例えば、T 細胞) の表面上に発現するその同族結合パートナーのうちの 1 つまたは複数と相互作用して、受容体シグナル伝達を作動させることができる。示したとおりの例示的な態様において、バリエーション IgSF ドメイン (vIgD) は、CD80 の IgSF ドメインのバリエーションである。CD28 共刺激受容体への CD80 vIgD の結合は、アゴニストまたは共刺激シグナルを提供する。

40

【図 6 A】図 6A ~ 6C は、抗体 (V-Mab) にコンジュゲートされたバリエーション IgSF ドメイン (vIgD) の種々の例示的な配置を示す。図 6A は、vIgD が直接的または間接的に抗体の

50



A-4のうちの1つまたは複数に対する結合親和性が向上しており、かつCD28、PD-L1、またはCTLA-4のうちの別の1つまたは複数に対する結合親和性が低下している。

【0066】

いくつかの態様において、また、本明細書に提供されるバリエーションCD80ポリペプチドと1つまたは複数の他の部分またはポリペプチドとを含有するコンジュゲートまたは融合体である、1つまたは複数の他の免疫調節タンパク質も本明細書に提供される。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドおよび免疫調節タンパク質は、免疫学的免疫応答を調節し、例えば免疫応答を増強または低減する。いくつかの態様において、本明細書に提供されるバリエーションCD80ポリペプチドおよび免疫調節タンパク質を、調節不全になった免疫応答と関連する疾患または病態の治療に使用することができる。

10

【0067】

いくつかの態様において、提供されるバリエーションCD80ポリペプチドは、共刺激シグナル伝達分子との相互作用を介してT細胞活性化を調節する。一般に、抗原特異的T細胞活性化は、2つの別個のシグナルを概して必要とする。第一のシグナルは、T細胞受容体（TCR）と抗原提示細胞（APC）上に存在する主要組織適合性複合体（MHC）関連抗原との相互作用によって提供される。第二のシグナルは、TCR会合に対して共刺激性であり、かつ、T細胞アポトーシスまたはアネルギを回避するために必要である。

【0068】

いくつかの態様において、正常な生理学的条件下で、T細胞媒介性免疫応答は、T細胞受容体（TCR）による抗原認識によって開始され、共刺激シグナルおよび抑制シグナル（例えば、免疫チェックポイントタンパク質）のバランスによって調節される。免疫系は、自己免疫を防止する（すなわち、自己寛容）および免疫応答の間（例えば、病原性感染に対する攻撃の間）の過度の損傷から組織を保護する、免疫チェックポイントに依拠する。しかしながら、いくつかの場合では、これらの免疫調節タンパク質は、免疫系を回避するための機序として、腫瘍を含む疾患および病態において調節不全になる可能性がある。

20

【0069】

いくつかの態様において、公知のT細胞共刺激受容体の中にはCD28があり、CD28は、APC上に共に存在するリガンドB7-1（CD80）およびB7-2（CD86）に対するT細胞共刺激受容体である。これらの同じリガンドはまた、CD28に対するよりも高い親和性で阻害性T細胞受容体CTLA4（細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4）に結合することができ；CTLA-4への結合は、免疫応答を下方調節するよう作用する。同様に、CD80は、プログラム細胞死リガンド1（PD-L1）に結合することができる。PD-L1はまた、免疫活性化の負の調節因子でもあり、プログラム細胞死1（PD-1）受容体との相互作用を介して免疫応答を下方調節することができる。CD80のPD-L1への結合は、PD-L1とPD-1との間の相互作用を遮断することができ、それによって免疫応答を強化または増強することができる。したがって、いくつかの場合では、CD80とCD28およびPD-L1との相互作用は、重複効果および補完的效果をもたらす。

30

【0070】

いくつかの態様において、CD28およびPD-L1は、免疫応答の調節において補完的な役割を担い得る。これらの受容体の活性の増強または抑制は、炎症性および自己免疫性障害、がん、ならびにウイルス感染の治療に対する臨床的有意性を有する。しかしながら、いくつかの場合では、両受容体の共刺激効果に介入してそれを変化させる治療は、免疫シナプスの限局によって課せられる空間定位要件ならびにサイズ制限の制約を受ける。いくつかの局面において、抗体薬を含む既存の治療薬は、これらの相互作用の調節に關与する複数の標的タンパク質と同時に相互作用し得ない。加えて、いくつかの場合では、既存の治療薬は、免疫応答に拮抗（アンタゴナイズ）する能力だけを有し、免疫応答を刺激（アゴナイズ）する能力を有し得ない。追加的に、これらの2つの受容体のうちの一方または他方を独立して標的化する薬物の間の薬物動態の差異は、処置過程を通して、このような薬物の組み合わせの所望の血中濃度を適切に維持することに困難を生じる可能性がある。

40

【0071】

50

いくつかの態様において、提供されるバリエーションCD28ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、共刺激受容体CD28またはPD-L1およびいくつかの場合はCTLA-4を用いて誘導されるかまたはそれらと関連する免疫活性を調節（例えば、増強または低減）する。したがって、いくつかの態様において、提供されるポリペプチドは、CD28およびPD-L1の両方、ならびに、いくつかの場合はCTLA-4に対する、独立した結合親和性を有するバリエーションCD80を提供することによってこれらの制約を克服し、それによって、受容体による共刺激の補完的効果を刺激するまたはそれに拮抗する。また、これらのCD80バリエーションを製造する方法および使用する方法も提供される。

#### 【0072】

本明細書において言及される全ての刊行物（特許、特許出願、科学論文およびデータベースを含む）は、それぞれ個々の刊行物（特許、特許出願、科学論文およびデータベースを含む）が参照によって組み入れられると具体的にかつ個別に示されたかのように同程度に、参照によってその全体が全ての目的において本明細書に組み入れられる。本明細書に示されている定義が参照によって本明細書に組み入れられる特許、出願、公開出願および他の刊行物に示されている定義に反しているかまたは他に矛盾している場合、本明細書に示されている定義が参照によって本明細書に組み入れられる定義より優先される。

#### 【0073】

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

#### 【0074】

### 1. 定義

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

#### 【0075】

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

#### 【0076】

用語「親和性が改変された（親和性改変）」は、免疫グロブリンスーパーファミリドメインの文脈において使用される場合、親の野生型または未改変の（すなわち、親和性が改変されていない）IgSF対照ドメインと比較してその同族結合パートナー（あるいは「カウンター構造体」）のうちの少なくとも1つに対する結合親和性またはアビディティが（対応する野生型の親または未改変IgSFドメインと比べて）向上または低下するように変化したアミノ酸配列を有する哺乳動物免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメインを意味する。この文脈において、親和性が改変されたCD80 IgSFドメインが含まれる。いくつかの態様において、親和性改変IgSFドメインは、野生型または未改変のIgSFドメイン中に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれ以上のアミノ酸の差異（例えば、アミノ酸置換）を含有することができる。結合親和性またはアビディティの向上または低下は、フローサイトメトリーなどの周知の結合アッセイを使用して決定するこ

10

20

30

40

50

とができる。Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005)。また、Linsley et al., Immunity, 1: 7930801 (1994) も参照されたい。その同族結合パートナーに対するタンパク質の結合親和性またはアビディティの向上は、野生型IgSFドメイン対照よりも少なくとも10%大きい値、いくつかの態様において、野生型IgSFドメイン対照値よりも少なくとも20%、30%、40%、50%、100%、200%、300%、500%、1000%、5000%、または10000%大きい値になる向上である。その同族結合パートナーのうちの少なくとも1つに対するタンパク質の結合親和性またはアビディティの低下は、対照の90%以下であるが野生型IgSFドメイン対照値の10%以上の値、いくつかの態様において、野生型IgSFドメイン対照値の80%、70%、60%、50%、40%、30%、または20%以下であるが10%以上の値になる低下である。親和性が改変されたタンパク質は、アミノ酸残基の置換、付加、または欠失によって一次アミノ酸配列が変化している。用語「親和性改変IgSFドメイン（親和性改変IgSFドメイン）」は、親和性改変IgSFドメインが作製された任意の特定の出發組成物または方法のあらゆる条件を強要するものと解釈されるべきではない。したがって、本発明の親和性改変IgSFドメインについては、任意の特定の親和性改変プロセスによって野生型IgSFドメインが親和性改変IgSFドメインへと変換されるのに限定されない。親和性改変IgSFドメインポリペプチドは、例えば、野生型哺乳動物IgSFドメイン配列情報から開始して生成され、次いで、その同族結合パートナーに対する結合性についてインシリコでモデル化され、そして、最後に組換えまたは化学合成されて、主題の親和性改変IgSFドメイン組成物を生成することができる。別のほんの一例として、親和性改変IgSFドメインは、野生型IgSFドメインの部位特異的変異誘発によって作製することができる。したがって、親和性改変IgSFドメインは、任意の所与のプロセスによって生産されるが必ずしもその必要はない、生成物を表す。組換え法、化学合成、またはその組み合わせを含む様々な技術を用いてもよい。

#### 【0077】

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

#### 【0078】

用語「自家（の）」は、本明細書において使用される場合、同じ生物から取り出され、後に前記生物に注入または養子移入される、細胞または組織を意味する。自家の細胞または組織を、例えば、組換えDNA法によって、生物から取り出される天然の細胞または天然の組織とはもはや遺伝的に同一ではないように改変することができる。例えば、天然の自家T細胞を、膜貫通型免疫調節タンパク質および/またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する自家の改変細胞となるように組換えDNA技術によって遺伝的に改変することができ、これは、いくつかの場合では、T細胞またはTIL（腫瘍浸潤性リンパ球）を改変することを包含する。次いで、改変細胞を、天然のT細胞が単離された患者へ注入する。いくつかの態様において、生物は、ヒトまたはマウスである。

#### 【0079】

用語「結合親和性」および「結合アビディティ」は、本明細書において使用される場合、それぞれ、特異的結合条件下での、あるタンパク質のそのカウンター構造体に対する、特異的結合親和性および特異的結合アビディティを意味する。生化学速度論では、アビディティは、例えばCD80とそのカウンター構造体であるPD-L1、CD28および/またはCTLA-4との間のような、個々の非共有結合相互作用の複数の親和性の累積強度を指す。このように、アビディティは、単一の相互作用の強度を表す親和性とは異なる。親和性が改変されたCD80のIgSFドメインを含有するバリエーションCD80のそのカウンター構造体に対する結合親和性の向上または低下は、未改変CD80（例えば、天然または野生型IgSFドメイン（例えばIgVドメイン））を含有する未改変CD80の結合親和性と比べて決定される。結合親和性またはアビディティを決定するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005) を参照されたい。いくつかの態様において、バリエーションCD80（例えば、親和性改変

10

20

30

40

50

IgSFドメインを含有するCD80)は、フローサイトメトリーによって測定した場合に、例えば実施例6に記載される結合アッセイにおいて、未改変CD80対照よりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%大きい平均蛍光強度(MFI)値をもたらす結合親和性で、CD28、PD-L1および/またはCTLA-4に特異的に結合する。

#### 【0080】

用語「生物学的半減期」は、ある物質(例えば、本発明のバリエーションCD80ポリペプチドを含む免疫調節ポリペプチド)が、その薬理的または生理学的活性または濃度の半分を喪失するのに要する時間を指す。生物学的半減期は、物質の排除、排出、分解(例えば、酵素的分解)、または体内の特定の臓器もしくは組織における吸収および濃縮によって影響を受ける可能性がある。いくつかの態様において、生物学的半減期は、物質の血漿中濃度がその定常状態レベルの半分に達するのに要する時間(「血漿半減期」)を決定することによって評価することができる。本発明のポリペプチドを誘導体化してその生物学的半減期を延長するために使用することができるコンジュゲートは、当技術分野において公知であり、限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、XTEN(伸長組換えペプチド; WO 2013130683を参照のこと)、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、脂質(アシル化)、およびポリ-Pro-Ala-Ser(PAS)、ポリグルタミン酸(グルタミル化)を含む。

#### 【0081】

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

#### 【0082】

用語「総合して」または「総合的」は、インビトロアッセイにおいて2つ以上のバリエーションCD80ポリペプチドの存在によって誘導されるサイトカイン産生に関して使用される時、個々のバリエーションCD80ポリペプチドによって誘導されるサイトカイン産生に関係なくサイトカイン発現レベル全体を意味する。いくつかの態様において、アッセイされる

10

20

30

40

50

サイトカインは、例えば実施例7に記載されるインビトロ初代T細胞アッセイにおけるIFN-である。

【0083】

用語「同族結合パートナー」（「カウンター構造体（対抗構造体）」と互換的に使用される）は、ポリペプチド（例えば、バリエーションCD80のIgSFドメイン）に関して、言及されているポリペプチドが特異的結合条件下で特異的に結合する少なくとも1つの分子（典型的には、天然の哺乳動物タンパク質）を指す。いくつかの局面において、親和性改変IgSFドメインを含有するバリエーションCD80は、対応する天然または野生型CD80のカウンター構造体に、向上または低下した親和性で特異的に結合する。特異的結合条件下で認識されてその同族受容体に特異的に結合するリガンドの一種は、その受容体のカウンター構造体または同族結合パートナーの一例である。「細胞表面同族結合パートナー」は、哺乳動物細胞表面上に発現する同族結合パートナーである。「細胞表面分子種」は、免疫シナプス（IS）を形成する細胞（例えば、哺乳動物細胞）上に発現するまたは該細胞が発現する、免疫シナプスのリガンドの同族結合パートナーである。

10

【0084】

本明細書において使用される場合、「コンジュゲート」、「コンジュゲーション」またはそれらの文法上の変形は、当技術分野において公知の任意の接続または連結法によって、2つ以上の化合物と一緒に接続または連結して、別の化合物の形成をもたらすことを指す。それはまた、2つ以上の化合物と一緒に接続または連結することによって生成される化合物を指すこともできる。例えば、1つまたは複数の化学部分またはポリペプチドに直接的または間接的に連結されたバリエーションCD80ポリペプチドが例示的なコンジュゲートである。そのようなコンジュゲートは、融合タンパク質、化学的コンジュゲートによって生産されるもの、および任意の他の方法によって生産されるものを含む。

20

【0085】

用語「競合的結合」は、本明細書において使用される場合、あるタンパク質が、少なくとも2種の同族結合パートナーに特異的に結合することができるが、1つの同族結合パートナーの特異的結合が第二の同族結合パートナーの同時結合を阻害する（例えば、妨害するまたは妨げる）ことを意味する。したがって、いくつかの場合では、あるタンパク質が2つの同族結合パートナーに同時に結合することはできない。一般に、競合結合物は、特異的結合のための同じまたは重複した結合部位を含有するが、これは必須要件ではない。いくつかの態様において、競合的結合は、第二の同族結合パートナーの特異的結合に起因して、その同族結合パートナーの1つへのタンパク質の特異的結合の測定可能な（部分的または完全な）阻害を引き起こす。ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）などの競合的結合を定量する様々な方法が公知である。

30

【0086】

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

40

【0087】

タンパク質の位置に関する「対応する」という用語、例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸の位置が（例えば、配列表に示されている）開示されている配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸の位置に「対応する」という記述は、構造配列アライメントに基づいてまた

50



は標準的なアライメントアルゴリズム（例えば、GAPアルゴリズム）を使用して、開示されている配列とのアライメントによって同定される、ヌクレオチドまたはアミノ酸の位置を指す。例えば、本明細書に記載の構造アライメント法による、SEQ ID NO：28に示される野生型CD80の配列（ECDドメイン）またはSEQ ID NO：152もしくは372に示される配列（IgVドメイン）を有する参照配列とのアライメントによって、対応する残基を同定することができる。配列をアライメントすることによって、当業者は、例えば保存されているアミノ酸残基および同一のアミノ酸残基を規準として使用して、対応する残基を同定することができる。

【0088】

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

10

【0089】

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

20

【0090】

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

30

【0091】

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

40

【0092】

用語「有効量」または「治療有効量」は、単独（すなわち、単剤療法として）または追加の治療剤との組み合わせのいずれかでエキスピボ（患者由来の細胞との接触による）またはインピボ（患者への投与による）で投与されたとき、例えば、疾患の症状および/または病因を改善または排除することによって、疾患進行の統計的に有意な低下をもたらす

50

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

【0093】

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

【0094】

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

【0095】

用語「改変細胞（改変された細胞）」は、本明細書において使用される場合、ヒトによる介入（例えば、組換えDNA法またはウイルス形質導入法）によって遺伝的に修飾（改変）された哺乳動物細胞を指す。いくつかの態様において、細胞は、免疫細胞、例えばリンパ球（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）または抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）である。細胞は、患者由来の初代細胞であってもよいし、細胞株であってもよい。いくつかの態様において、本発明の改変細胞は、バリエントCD80が特異的に結合するCD28、PD-L1、および／もしくはCTLA-4を発現するT細胞、またはPD-L1を発現するAPCの免疫活性を調節するように改変された本発明のバリエントCD80ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、バリエントCD80は、膜貫通ドメイン（例えば、CD80膜貫通ドメイン）に連結されたIgVドメインを含有する細胞外ドメインまたはその一部分を含有し、任意で細胞内シグナル伝達ドメインを含有する、膜貫通型免疫調節タンパク質（本明細書で以降「TIP」と称される）である。いくつかの場合では、TIPは、異種の細胞質シグナル伝達ドメインまたはエンドドメインを含有するキメラ受容体としての形態をとる。いくつかの態様において、改変細胞は、本明細書に記載のとおり免疫調節タンパク質を発現および分泌することができる。提供される改変細胞の中には、改変されたT細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）をさらに含有する細胞もある。

【0096】

用語「改変されたT細胞」は、本明細書において使用される場合、ヒトによる介入（例えば、組換えDNA法またはウイルス形質導入法）によって遺伝的に修飾（改変）されたT細胞（例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞（あるいは、細胞傷害性Tリンパ球また

10

20

30

40

50

はCTL)、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、メモリーT細胞、または T細胞)を指す。改変されたT細胞は、該T細胞上に発現している本発明のバリエーションCD80膜貫通型免疫調節タンパク質(TIP)を含み、該TIPは、改変されたT細胞自体の免疫活性を調節するか、または該T細胞上に発現するバリエーションCD80が特異的に結合する哺乳動物細胞の免疫活性を調節するように改変されている。

【0097】

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

10

【0098】

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

20

【0099】

用語「半減期延長部分」は、ポリペプチド融合体または化学的コンジュゲートの一部分であって、そのように該部分にコンジュゲートされていないタンパク質の半減期と比較して哺乳動物血清中に循環するタンパク質の半減期を延長する部分を指す。いくつかの態様において、半減期は、1.2倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、もしくは6.0倍より大きく、または約1.2倍、約1.5倍、約2.0倍、約3.0倍、約4.0倍、約5.0倍、もしくは約6.0倍より大きく延長される。いくつかの態様において、半減期は、半減期延長部分を有さないタンパク質と比較して、インビボ投与後、6時間超、12時間超、24時間超、48時間超、72時間超、96時間超、または1週間超延長される。半減期は、タンパク質がその濃度、量、または活性の半分を喪失するのに要する時間を指す。半減期を、例えば、ELISAアッセイまたは活性アッセイを使用することによって決定することができる。例示的な半減期延長部分には、Fcドメイン、多量体化ドメイン、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、XTEN(伸長組換えペプチド; WO 2013130683を参照のこと)、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、脂質(アシル化)、およびポリ-Pro-Ala-Ser(PAS)、およびポリグルタミン酸(グルタミル化)が含まれる。

30

【0100】

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

40

【0101】

免疫グロブリン分子(Fcポリペプチドとも呼ばれる)のFc(結晶性断片)領域またはドメインは、主に免疫グロブリン重鎖の定常領域に相当し、かつ、抗体のエフェクター機能を含む種々の機能に関与している。Fcドメインは、免疫グロブリン分子のヒンジドメインの一部分または全てとCH2ドメインおよびCH3ドメインとを含有する。Fcドメインは、1つまたは複数のジスルフィド結合によって接続された2つのポリペプチド鎖の二量体を形成することができる。いくつかの態様において、Fcは、エフェクター機能を促進する活性が低減された(例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またそれより大きく低減された)バリエーションFcである。いくつかの態様において、Fc領域中のアミノ酸

50

置換への言及は、特定のSEQ ID NOを基準に記載されない限りは、EUNanバリングシステムによる言及である。EUNanバリングは、公知であり、最近更新されたIMGT Scientific Chart (IMGT (登録商標)、すなわちinternational ImMunoGeneTics information system (登録商標) [http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html) (作成日: 2001年5月17日、最終更新日: 2013年1月10日) およびKabat, E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991) に報告されているとおりのEUインデックスに従う。

#### 【0102】

免疫グロブリンFc融合体(「Fc融合体」)、例えば免疫調節Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンのFc領域に機能的に連結された1つまたは複数のポリペプチド(または1つまたは複数の低分子)を含む分子である。Fc融合体は、例えば、抗体のFc領域(薬物動態を促進する)およびバリエーションCD80ポリペプチドを含み得る。免疫グロブリンFc領域は、1つまたは複数のバリエーションCD80ポリペプチドまたは低分子(融合パートナー)に間接的または直接的に連結され得る。種々のリンカーが当技術分野において公知であり、任意でこれを使用して、Fcを融合パートナーに連結させてFc融合体を生成することができる。同一種のFc融合体を、二量体化して、Fc融合ホモ二量体を形成することも、非同種を使用して、Fc融合ヘテロ二量体を形成することもできる。いくつかの態様において、Fcは、哺乳動物Fc、例えばネズミまたはヒトFcである。

#### 【0103】

用語「宿主細胞」は、組換え発現ベクターによってコードされているタンパク質を発現させるために使用することができる細胞を指す。宿主細胞は、原核生物、例えば、大腸菌(*E. coli*)であることができるか、または、宿主細胞は、真核生物、例えば、単細胞真核生物(例えば、酵母または他の真菌)、植物細胞(例えば、タバコまたはトマト植物細胞)、動物細胞(例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞)またはハイブリドームであることができる。宿主細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはそれらの誘導体、例えば、無血清培地で成長するVeggie CHOおよび関連細胞株またはDHFR欠損であるCHO系統DX-B11が含まれる。いくつかの態様において、宿主細胞は、哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞)であってもよい。

#### 【0104】

用語「免疫グロブリン」(「Ig」と略記される)は、本明細書において使用される場合、5種のヒトクラスの抗体: IgA(サブクラスIgA1およびIgA2を含む)、IgD、IgE、IgG(サブクラスIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む)、およびIgMのいずれかを含む哺乳動物免疫グロブリンタンパク質を指す。該用語はまた、完全または部分的合成(例えば、組換えまたは化学合成)であるか天然に産生されるかにかかわらず全長未満である免疫グロブリン、例えば、抗原結合断片(Fab)、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を含有する可変断片(Fv)、1つの鎖中で一緒に連結されたV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を含有する単鎖可変断片(scFv)、ならびに他の抗体V領域断片(Fab', F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、dsFvダイアボディ、Fc、およびFdポリペプチド断片)を含む。ホモ二重特異性およびヘテロ二重特異性の二重特異性抗体は、該用語の範囲内に含まれる。

#### 【0105】

用語「免疫グロブリンスーパーファミリー」または「IgSF」は、本明細書において使用される場合、細胞の、認識、結合、または接着プロセスに関与する、細胞表面タンパク質および可溶性タンパク質の群を意味する。分子は、免疫グロブリン(すなわち、抗体)と共通の構造的特徴に基づいて、このスーパーファミリーのメンバーとして類別され; これらは全て、免疫グロブリンドメインまたはフォールドとして公知のドメインを保有する。IgSFのメンバーは、免疫系の、細胞表面抗原受容体、共受容体および共刺激分子、リンパ球への抗原提示に関与する分子、細胞接着分子、特定のサイトカイン受容体ならびに細胞内筋タンパク質を含む。これらは、通常、免疫系における役割と関連する。免疫シナプス

中のタンパク質は、IgSFのメンバーであることが多い。IgSFはまた、機能のような共通の特性に基づいて「サブファミリー」に分類することができる。このようなサブファミリーは、典型的には、4～30のIgSFメンバーからなる。

#### 【0106】

用語「IgSFドメイン」または「免疫グロブリンドメイン」または「Igドメイン」は、本明細書において使用される場合、IgSFタンパク質の構造ドメインを指す。Igドメインは、免疫グロブリン分子に因んで命名されている。これらは、約70～110アミノ酸を含有し、それらのサイズおよび機能に従って類別される。Igドメインは、逆平行鎖の2つのシートによって形成されるサンドイッチ様構造を有する、特徴的なIgフォールドを保有する。サンドイッチの内側の疎水性アミノ酸間の相互作用ならびにBおよびF鎖中のシステイン残基間で形成される高度に保存されているジスフィルド結合は、Igフォールドを安定化させる。Igドメインの一端は、抗体のそれらのリガンドに対する特異性に重要な相補性決定領域と呼ばれる部分を有する。Ig様ドメインは、IgV、IgC1、IgC2、またはIgIとして（クラスに）分類することができる。ほとんどのIgドメインは、可変（IgV）ドメインまたは定常（IgC）ドメインのいずれかである。9つの鎖を有するIgVドメインは、概して、7つの鎖を有するIgCドメインより長い。IgSFのいくつかのメンバーのIgドメインは、アミノ酸配列中のIgVドメインと似ているが、なおIgCドメインとサイズが類似している。これらは、IgC2ドメインと呼ばれ、一方で、標準的なIgCドメインは、IgC1ドメインと呼ばれる。T細胞受容体（TCR）鎖は、細胞外部分における2つのIgドメイン（1つはN末端におけるIgVドメインおよび1つは細胞膜に隣接するIgC1ドメイン）を含有する。CD80は、2つのIgドメイン：IgVおよびIgCを含有する。

#### 【0107】

用語「IgSF種」は、本明細書において使用される場合、同一のまたは実質的に同一の一次アミノ酸配列を有するIgSFメンバータンパク質の集団を意味する。各哺乳動物免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）メンバーは、そのIgSFメンバーに属する全てのIgSF種にユニークの同一性を規定する。したがって、各IgSFファミリーメンバーは、他のIgSFファミリーメンバーと比べてユニークであり、したがって、特定のIgSFファミリーメンバーの各種は、別のIgSFファミリーメンバー種と比べてユニークである。それにもかかわらず、同じIgSF種の分子間の相違が、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、および脂質化などの翻訳後修飾の差異が原因で生じ得る。さらに、遺伝子多型性が原因の単一のIgSF種内の小さな配列差異は、例えばタンパク質分解的切断が原因のIgSF種の野生型短縮形態と同様、単一のIgSF種内の別の形態の相違も成す。「細胞表面IgSF種」は、細胞（概して哺乳動物細胞）の表面に発現するIgSF種である。

#### 【0108】

用語「免疫活性」は、本明細書においてT細胞のような哺乳動物リンパ球の文脈で使用される場合、1つまたは複数の細胞生存、細胞増殖、サイトカイン産生（例えば、インターフェロン- $\gamma$ ）、またはT細胞傷害性活性を指す。いくつかの場合では、免疫活性は、ケモカインまたはインターロイキン等のサイトカインの発現を意味することができる。免疫活性の増強または抑制を決定するためのアッセイは、培養上清中のインターフェロン- $\gamma$  サイトカインレベルを測定するMLR（混合リンパ球反応）アッセイ（Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56）、SEB（ブドウ球菌エンテロトキシンB（staphylococcal enterotoxin B））T細胞刺激アッセイ（Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56）、および抗CD3 T細胞刺激アッセイ（Li and Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104）を含む。T細胞活性化は、IFN- $\gamma$  サイトカインの分泌と関連するので、これらのインビトロヒトT細胞アッセイからの培養上清中のIFN- $\gamma$  レベルの検出は、市販のELISAキットを使用してアッセイすることができる（Wu et al, Immunol Lett 2008 Apr 15; 117(1): 57-62）。免疫応答の誘導は、静止リンパ球と比べて免疫活性の増強をもたらす。本明細書において提供されるとおりの免疫調節タンパク質（例えば、親和性改変IgSFドメインを含有するバリエーションCD80ポリペプチド）は、いくつかの態様において、初代T細胞アッセイにおいて、野生型IgSFメンバーまたはIgSFド

メイン対照と比べてIFN- $\gamma$ （インターフェロン- $\gamma$ ）発現を増加させることができ、または、代替態様において減少させることができる。当業者は、IFN- $\gamma$  発現の増加を決定するために使用される初代T細胞アッセイのフォーマットが、IFN- $\gamma$  発現の減少についてアッセイするために採用されるフォーマットと異なることを認識するだろう。初代T細胞アッセイにおいてIFN- $\gamma$  発現を減少させる本発明の免疫調節タンパク質または親和性改変IgSFドメインの能力についてアッセイする際に、混合リンパ球反応（MLR）アッセイを実施例6に記載されるとおり使用することができる。好都合なことに、本発明の可溶性形態の親和性改変IgSFドメインを採用して、同じく実施例6に記載されるとおり、IFN- $\gamma$  発現に拮抗することによりその発現を減少させるその能力をMLRにおいて決定することができる。あるいは、初代T細胞アッセイにおいてIFN- $\gamma$  発現を増加させる本発明の免疫調節タンパク質または親和性改変IgSFドメインの能力についてアッセイする際に、同時固定アッセイを使用することができる。同時固定アッセイでは、T細胞受容体シグナル（いくつかの態様において、抗CD3抗体によって提供される）を同時固定された親和性改変IgSFドメイン、例えばバリエーションCD80と併用して、野生型IgSFドメイン対照と比べてIFN- $\gamma$  発現を増加させる能力を決定する。バリエーションCD80膜貫通型免疫調節タンパク質の活性を評価することを含め、改変細胞の免疫活性をアッセイする方法は、当技術分野において公知であり、限定されないが、抗原刺激後にT細胞を増殖させる能力、再刺激の非存在下でT細胞の増殖を持続する能力、および適切な動物モデルにおける抗がん活性を含む。アッセイはまた、標準的な $^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイ（例えば、Milone et al., (2009) Molecular Therapy 17: 1453-1464 を参照のこと）もしくはフローベース細胞傷害性アッセイ、またはインピーダンススペース細胞傷害性アッセイ（Peper et al. (2014) Journal of Immunological Methods, 405:192-198）を含む、細胞傷害性を評価するアッセイを含む。

10

20

#### 【0109】

「免疫調節ポリペプチド」は、免疫活性を調節するポリペプチドである。免疫応答の「調節」とは、免疫活性の増強または抑制のいずれかを意味する。免疫調節ポリペプチドは、単一のポリペプチド鎖であるか、または（例えば、鎖間ジスフィルド結合によって）互いに共有結合された少なくとも2つのポリペプチド鎖の多量体（二量体またはより高次の多量体）であることができる。したがって、単量体、二量体、およびより高次の多量体ポリペプチドは、その定義された用語の範囲内である。多量体ポリペプチドは、（同一のポリペプチド鎖の）ホモ多量体または（異なるポリペプチド鎖の）ヘテロ多量体であることができる。免疫調節ポリペプチドは、バリエーションCD80を含み得る。

30

#### 【0110】

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

#### 【0111】

CD80の「アイソフォーム」は、アミノ酸配列が異なる、複数の天然に存在するCD80ポリペプチドのうちの1つである。アイソフォームは、単一の遺伝子によって発現されるRNA転写産物のスプライスバリエーションの産物であることも、遺伝子重複から生じ得るような機能的に類似のタンパク質を生成する高度に類似するが異なる遺伝子の発現産物であることもできる。本明細書において使用される場合、CD80の「アイソフォーム」なる用語は、CD80遺伝子の異なるアレルの産物も指す。

40

#### 【0112】

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

50

含まれる。

【0113】

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

【0114】

用語「膜タンパク質」は、本明細書において使用される場合、生理的条件下で脂質二重層に直接または間接的に付着（結合）するタンパク質を意味する。膜を形成する脂質二重層は、生体膜、例えば真核生物（例えば、哺乳動物）の細胞膜または人工の（すなわち、人造の）膜、例えばリポソーム上に見いだされる膜であることができる。脂質二重層への膜タンパク質の結合は、共有結合による結合であるか、または非共有相互作用（例えば、疎水性相互作用もしくは静電相互作用）による結合であることができる。膜タンパク質は、内在性膜タンパク質または表在性膜タンパク質であることができる。表在性膜タンパク質である膜タンパク質は、脂質二重層に非共有相互作用により結合されるか、または内在性膜タンパク質に非共有相互作用により結合される。表在性膜タンパク質は、哺乳動物において生理的な範囲の条件下で表在性膜タンパク質が脂質二重層と相互作用するおよび/または脂質二重層から解離することができるように、脂質二重層への一時的な結合を形成する。表在性膜タンパク質とは対照的に、内在性膜タンパク質は、哺乳動物において生理的な範囲の条件下で内在性膜タンパク質が脂質二重層への結合から解離しないように、膜の脂質二重層への実質的に恒久的な結合を形成する。膜タンパク質は、脂質二重層の一層による膜への結合を形成することができる（モノトピック型）か、または膜の両方の層によって結合することができる（ポリトピック型）。1つの脂質二重層とだけ相互作用する内在性膜タンパク質は、「内在性モノトピック型タンパク質」である。脂質二重層の両方と相互作用する内在性膜タンパク質は、「内在性ポリトピック型タンパク質」である。あるいは、本明細書において「膜貫通型タンパク質」と称される。

【0115】

用語「調節」または「調節する」は、本明細書において免疫応答（例えば哺乳動物の免疫応答）の文脈で使用される場合、本発明のバリエーションCD80を含む免疫調節ポリペプチドの投与の結果としてまたは本発明の免疫調節タンパク質（例えば、バリエーションCD80膜貫通型免疫調節タンパク質）を発現する改変細胞の投与の結果として起こる、既存のまたは潜在的な免疫応答の任意の変化（例えば、増強または低減）を指す。したがって、調節は、バリエーションCD80を含む免疫調節タンパク質の投与の非存在下で起こるまたは存在する免疫応答と比較して、免疫応答の変化（例えば、増強または低減）を指す。そのような調節は、免疫細胞の免疫活性のある度合いもしくは程度の任意の誘導、活性化、抑制、または変化を含む。免疫細胞は、B細胞、T細胞、NK（ナチュラルキラー）細胞、NK T細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）、および非プロフェッショナル抗原提示細胞、ならびに炎症細胞（好中球、マクロファージ、単球、好酸球、および好塩基球）を含む。調節は、既存の免疫応答、発生段階にある免疫応答、潜在的な免疫応答に、または免疫応答を誘導する、調節する、それに影響を及ぼす、もしくは応答する能力に与えられる、任意の変化を含む。調節は、免疫応答の一部としての、免疫細胞における遺伝子、タンパク質および/または他の分子の発現および/または機能の任意の変化を含む。免疫応答の調節または免疫活性の調節は、例えば、以下を含む：免疫細胞の排除、欠失、または隔離；自己反応性リンパ球、抗原提示細胞、または炎症細胞のような他の細胞の機能的能力を調節することができる、免疫細胞の誘導または生成；免疫細胞における無応答状態の誘導（すなわち、アネルギー）；免疫細胞の活性または機能を増強または抑制すること（これらの細胞によって発現されるタンパク質のパターンを変化させることを非限定に含む）。例は、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、転写因子、キナーゼ、共刺激性分子、もしくは他の細胞表面受容体などの特定の分子クラスの産生および/もしくは分泌の変化、またはこれらの調節事象の任意の組み合わせを含む。調節を、例えば、初代T細胞アッセイにおける野生型または未改変CD80対照と比べたIFN-（インターフェロン）発現の変化

10

20

30

40

50

によって評価することができる (Zhao and Ji, Exp Cell Res. 2016 Jan1; 340(1) 132-138 を参照のこと)。調節を、例えば、野生型CD80膜貫通型タンパク質で改変された細胞と比べた、改変細胞の免疫活性の変化、例えば改変細胞の細胞傷害性活性の変化または改変細胞のサイトカイン分泌の変化によって、評価することができる。

【0116】

用語「多量体化ドメイン」は、第一のドメインと安定な多量体を形成する同じまたは異なる多量体化ドメインであることができる相補的多量体化ドメインを各々が含有する、ポリペプチド分子と1つまたは複数の追加のポリペプチド分子との安定な相互作用を促進するアミノ酸配列を指す。概して、ポリペプチドは、多量体化ドメインに直接的または間接的に接続される。例示的な多量体化ドメインは、免疫グロブリン配列またはその部分、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域、および適合性のタンパク質-タンパク質相互作用ドメインを含む。多量体化ドメインは、例えば、免疫グロブリン定常領域またはドメイン、例えば、IgG (IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブタイプを含む)、IgA、IgE、IgD およびIgMならびにその改変型由来の、Fcドメインまたはその部分であることができる。

【0117】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用され、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の核酸残基 (例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド) のポリマーを指す。別段の限定されない限り、該用語は、公知の天然ヌクレオチドの類似体を含む核酸、およびそれと類似の結合特性を有する核酸、および天然に存在するヌクレオチドと同様な様式で代謝される核酸を包含する。他に指定のない限り、特定の核酸配列はまた、明示的に示されている配列 (「参照配列」) だけでなく、保存的に改変されたそのバリエーション (例えば、縮重コドン置換) および相補的ヌクレオチド配列も暗黙のうちに包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された (または全ての) コドンの第三の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成してもよい。核酸またはポリヌクレオチドという用語は、遺伝子によってコードされているcDNAまたはmRNAを包含する。

【0118】

用語「分子種」は、本明細書において使用される場合、同一のまたは実質的に同一の一次アミノ酸配列を備えたタンパク質の集団を意味する。各哺乳動物免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) メンバーは、同一のまたは実質的に同一の分子種の集合体を規定する。したがって、例えば、ヒトCD80はIgSFメンバーであり、各ヒトCD80分子はCD80の一分子種である。同じ分子種の分子間の相違が、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、および脂質化のような翻訳後修飾の差異が原因で起こり得る。さらに、遺伝子多型性が原因の単一の分子種内の小さな配列差異は、例えばタンパク質分解的切断が原因の単一の分子種の野生型短縮形態と同様、単一の分子種内の別の形態の相違も成す。「細胞表面分子種」は、哺乳動物細胞の表面に発現する分子種である。各々がISを形成する2つの哺乳動物細胞のうちのうちの一方のみ又はもう一方のみに存在する (しかし両方ではない)、2つ以上の異なるタンパク質種は、互いに「シス」または「シス配置」にあると言われる。第一のものがISを形成する2つの哺乳動物細胞のうちの第一の細胞のみに存在し、第二のものがISを形成する2つの哺乳動物細胞のうちの第二の細胞のみに存在する、2つの異なるタンパク質種は、「トランス」または「トランス配置」にあると言われる。各々がISを形成する2つの哺乳動物細胞の両方に存在する、2つの異なるタンパク質種は、これらの細胞上でシス型およびトランス型の両配置にある。

【0119】

用語「非競合的結合」は、本明細書において使用される場合、少なくとも2つの同族結合パートナーに同時に特異的に結合するタンパク質の能力を意味する。したがって、タンパク質は、少なくとも2つの異なる同族結合パートナーに同時に結合することができるが、結合相互作用は、同じ期間である必要はないので、いくつかの場合では、タンパク質は、同族結合パートナーの1つにのみ特異的に結合される。いくつかの態様において、結合

10

20

30

40

50



は、特異的結合条件下で起こる。いくつかの態様において、同時結合は、1つの同族結合パートナーの結合が第二の同族結合パートナーへの同時結合を実質的に阻害しないようなものである。いくつかの態様において、非競合的結合は、タンパク質上のその結合部位への第二の同族結合パートナーの結合が、タンパク質上のその結合部位への第一の同族結合パートナーの結合に置き換わらないことを意味する。非競合的結合を評価する方法は、Perez de La Lastra et al., Immunology, 1999 Apr; 96(4): 663-670 に記載されている方法など、当技術分野において周知である。いくつかの場合では、非競合的相互作用において、第一の同族結合パートナーは、第二の同族結合パートナーの相互作用部位と重複しない相互作用部位で、第二の同族結合パートナーの結合が第一の同族結合パートナーの結合と直接干渉しないように、特異的に結合する。したがって、第二の同族結合パートナーの結合による同族結合パートナーの結合へのあらゆる影響は、第一の同族結合パートナーの結合との直接的な干渉以外の機序を介するものである。例えば、酵素-基質相互作用の状況では、非競合的阻害剤は、酵素の活性部位以外の部位に結合する。非競合的結合は、第二の同族結合パートナーが、第一の同族結合パートナーの結合と重複しない相互作用部位で特異的に結合するが、第一の相互作用部位が第一の同族結合パートナーに占有されているときだけ第二の相互作用部位に結合する、非競合的な結合相互作用を包含する。

10

#### 【0120】

用語「薬学的組成物」は、哺乳動物対象、しばしばヒトにおける、薬学的用途に好適な組成物を指す。薬学的組成物は、典型的には、有効量の活性剤（例えば、バリアントCD80を含む免疫調節ポリペプチドまたはバリアントCD80膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する改変細胞）と担体、賦形剤、または希釈剤とを含む。担体、賦形剤、または希釈剤は、それぞれ、典型的には、薬学的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤である。

20

#### 【0121】

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

30

#### 【0122】

用語「初代T細胞アッセイ」は、本明細書において使用される場合、インターフェロン-（「IFN-」）発現を測定するためのインビトロアッセイを指す。実施例6に記載されるアッセイのような様々なこのような初代T細胞アッセイが当技術分野において公知である。好ましい態様において、使用されるアッセイは、抗CD3同時固定アッセイである。このアッセイでは、初代T細胞が、追加の組換えタンパク質と共にまたはそれなしで固定された抗CD3によって刺激される。ある時点（通常24～72時間）で培養上清を収集する。別の態様において、使用されるアッセイは混合リンパ球反応（MLR）である。このアッセイでは、初代T細胞が、同種異系APCで刺激される。ある時点（通常24～72時間）で培養上清を収集する。標準的なELISA技術によって培養上清中のヒトIFN- レベルを測定する。市販のキットが供給業者から入手可能であり、製造業者の推奨に従ってアッセイを実施する。

40

#### 【0123】

用語「精製されている」は、核酸（例えば、本発明の免疫調節タンパク質をコードする核酸）に適用される場合、一般に、当技術分野において周知の分析技術によって決定したときに他の成分を実質的に含まない核酸またはポリペプチドを表す（例えば、精製されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、電気泳動ゲル、クロマトグラフ溶出液、および/または密度勾配遠心分離に供された媒体中で、離散バンドを形成する）。例えば、電気泳動ゲル中で基本的に1つのバンドを生じる核酸またはポリペプチドは、「精製されてい

50

る」。精製された本発明の核酸またはタンパク質は、少なくとも約50%純粋、通常、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、99%またはそれ以上純粋（例えば、重量パーセントまたはモルベース）である。

【0124】

用語「組換え」は、物質（例えば、核酸またはポリペプチド）がヒトの介入によって人工的に（すなわち、非天然に）変化していることを示す。該変化は、その天然の環境もしくは状態内のまたはそこから取り出された物質に対して実施することができる。例えば、「組換え核酸」は、例えば、クローニング、親和性改変、DNAシャッフリングまたは他の周知の分子生物学的手順の間に、核酸を組換えることによって製造されるものである。「組換えDNA分子」は、このような分子生物学的技術によって一緒に接合されたDNAのセグメントから構成される。用語「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」は、本明細書において使用される場合、組換えDNA分子を使用して発現されるタンパク質分子を指す。「組換え宿主細胞」は、組換え核酸を含有するおよび／もしくは発現する細胞であるか、またはそうではなく（例えば、組換えタンパク質（例えば、本明細書において提供される膜貫通型免疫調節タンパク質）をコードする核酸分子を細胞に導入することによって）遺伝子工学により改変された細胞である。真核生物における転写制御シグナルは、「プロモーター」および「エンハンサー」エレメントを含む。プロモーターおよびエンハンサーは、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用する短いDNA配列アレイからなる。プロモーターおよびエンハンサーエレメントは、酵母、昆虫および哺乳動物細胞ならびにウイルス中の遺伝子を含め様々な真核生物源から単離されている（類似した制御エレメント、すなわち、プロモーターはまた原核生物中にも見いだされる）。特定のプロモーターおよびエンハンサーの選択は、関心対象のタンパク質を発現させるためにどんな細胞タイプが使用されるべきであるかに依存する。用語「機能的な組み合わせにある」、「機能的な順序にある」および「機能的に連結されている」は、本明細書において使用される場合、所与の遺伝子の転写および／または所望のタンパク質分子の合成を指令することが可能な核酸分子が産生される様式または配向での核酸配列の連結を指す。

【0125】

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

【0126】

用語「選択性」は、1つの基質（例えば1つの同族結合パートナー）に対する対象タンパク質またはポリペプチドの特異的結合の、別の基質（例えば異なる同族結合パートナー）に対する当該対象タンパク質の特異的結合と比較しての優先度を指す。選択性は、対象タンパク質と第一の基質（例えば第一の同族結合パートナー）との結合活性（例えば、結合親和性）（例えば、 $K_{d1}$ ）と、同じ対象タンパク質と第二の同族結合パートナーとの結合活性（例えば、結合親和性）（例えば、 $K_{d2}$ ）との比率として反映することができる。

【0127】

用語「配列同一性」は、本明細書において使用される場合、遺伝子またはタンパク質間の、それぞれヌクレオチドまたはアミノ酸レベルでの配列同一性を指す。「配列同一性」は、アミノ酸レベルでのタンパク質間の同一性の尺度およびヌクレオチドレベルでの核酸

10

20

30

40

50

間の同一性の尺度である。タンパク質の配列同一性は、配列を整列したときの各配列中の所与の位置におけるアミノ酸配列を比較することによって決定され得る。同様に、核酸の配列同一性は、配列を整列したときの各配列中の所与の位置におけるヌクレオチド配列を比較することによって決定され得る。比較のための配列の整列（アライメント）のための方法は、当技術分野において周知であり、そのような方法には、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTAが含まれる。BLASTアルゴリズムは、配列同一性パーセントを計算し、2つの配列間の類似性の統計分析を実施する。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）（NCBI）のウェブサイトを通じて公的に入手可能である。

【0128】

10

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

【0129】

20

用語「種」は、ポリペプチドまたは核酸に関して本明細書において使用される場合、同一のまたは実質的に同一の配列を有する分子の集団を意味する。同じ種であるポリペプチド間の違いが、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、および脂質化等の翻訳後修飾の差異が原因で起こり得る。完全長種とアミノ末端またはカルボキシ末端がわずか1、2、または3アミノ酸残基だけ異なる（または差異をコードする）わずかに短縮されたポリペプチド配列は、単一種の配列であると見なされる。そのような微小不均一性は、製造されたタンパク質の共通の特徴である。

【0130】

30

用語「特異的結合断片」は、本明細書において完全長野生型哺乳動物CD80ポリペプチドまたはそのIgVもしくはIgCドメインに関して使用される場合、IgVおよび/またはIgCドメインの部分配列を有し、かつ、インビトロおよび/またはインビボで哺乳動物CD28、哺乳動物PD-L1、および/または哺乳動物CTLA-4（例えば、ヒトまたはネズミCD28、PD-L1、および/またはCTLA-4）に特異的に結合する、ポリペプチドを意味する。いくつかの態様において、CD80 IgVまたはCD80 IgCの特異的結合断片は、完全長野生型配列の配列長の少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%である。バリエーションCD80を形成させるために、特異的結合断片の配列を変化させることができる。

【0131】

40

用語「特異的に結合する」は、本明細書において使用される場合、その親和性またはアビディティが、十分な統計的サイズのランダムペプチドまたはポリペプチドの集合体に対する同じタンパク質の平均親和性またはアビディティの少なくとも5倍大きく、しかし場合により少なくとも10、20、30、40、50、100、250または500倍大きく、またはさらに少なくとも1000倍大きくなるように、特異的結合条件下で、標的タンパク質に結合するタンパク質の能力を意味する。特異的に結合するタンパク質は、単一の標的分子のみに結合する必要はないが、標的と非標的（例えば、パラログまたはオーソログ）との間の立体配置の類似性に起因して非標的分子に特異的に結合し得る。当業者は、異なる動物種における同じ機能を有する分子（すなわち、オーソログ）への特異的結合または標的分子と実質的に類似のエピトープを有する非標的分子（例えば、パラログ）への特異的結合が、可能であり、かつ、固有の非標的（例えば、ランダムポリペプチド）の統計的に有効な集合体に対して決定される結合の特異性を損なわないことを認識するだろう。したがって、本発明のポリペプチドは、交差反応性に起因して、複数の別個の標的分子種に特異的に

50

結合し得る。固相ELISAイムノアッセイまたはピアコア（Biacore）測定を使用して、2つのタンパク質間の特異的結合を決定することができる。概して、2つの結合タンパク質間の相互作用は、 $1 \times 10^{-5}$  M未満、しばしば $1 \times 10^{-12}$  Mまでの低さの解離定数（Kd）を有する。本開示の特定の態様において、2つの結合タンパク質間の相互作用は、 $1 \times 10^{-6}$  M、 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  Mまたは $1 \times 10^{-11}$  Mの解離定数を有する。

【0132】

ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞に関して、用語「表面発現する」または「表面発現」は、当該ポリペプチドが膜タンパク質として発現することを意味する。いくつかの態様において、膜タンパク質は、膜貫通型タンパク質である。

10

【0133】

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

【0134】

用語「標的化部分（ターゲティング部分）」は、本明細書において使用される場合、バリアントCD80を含むポリペプチドに共有結合もしくは非共有結合により結合されるか、またはそれを物理的にカプセル化する、組成物を指す。標的化部分は、細胞表面受容体（例えば、B7ファミリーメンバーPD-L1）、または腫瘍抗原（例えば、腫瘍特異的抗原（TSA）もしくは腫瘍関連抗原（TAA）、例えばB7-H6）のような所望のカウンター構造体に対して特異的結合親和性を有する。典型的には、所望のカウンター構造体は、特定の組織または細胞タイプ上に局在化される。標的化部分は、抗体、抗原結合断片（Fab）、 $V_H$ および $V_L$ を含有する可変断片（Fv）、1つの鎖中で一緒に連結された $V_H$ および $V_L$ を含有する単鎖可変断片（scFv）、ならびに他の抗体V領域断片、例えばFab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、dsFvダイアボディ、ナノボディ、可溶性受容体、受容体リガンド、親和性成熟された受容体もしくはリガンド、ならびに低分子（500ダルトン）組成物（例えば、特異的結合受容体組成物）を含む。標的化部分はまた、本発明のポリペプチドをカプセル化するリボソームの脂質膜に共有結合または非共有結合により結合（付着）させることもできる。

20

【0135】

本明細書において使用される場合、用語「膜貫通型タンパク質」は脂質二重層を実質的にまたは完全に貫通する膜タンパク質を意味し、脂質二重層は、例えば、哺乳動物細胞などの生体膜中に、またはリボソームなどの人工構築物中に見いだされる。膜貫通型タンパク質は、脂質二重層に統合されかつその統合が生理的条件下で熱力学的に安定である、膜貫通ドメイン（「膜貫通ドメイン」）を含む。膜貫通ドメインは概して、膜貫通ドメインの疎水性が、タンパク質における水性環境（例えば、細胞質ゾル、細胞外流体）と相互作用する領域と比較して高いことに基づいて、幾つもの市販の生命情報科学ソフトウェアアプリケーションを介して、膜貫通ドメインのアミノ酸配列から予測可能である。膜貫通ドメインは多くの場合、膜を貫通する疎水性ヘリックスである。膜貫通型タンパク質は、脂質二重層の両層を1回または複数回貫通していてもよい。本明細書に記載される提供される膜貫通型免疫調節タンパク質は、膜貫通型タンパク質に含まれる。本発明の膜貫通型免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインに加えて、エクドメインをさらに含み、いくつかの態様においてはエンドドメインをさらに含む。

30

40

【0136】

疾患または障害の「治療」または「（治）療法」という用語は、本明細書において使用される場合、本発明の治療用組成物（例えば、免疫調節タンパク質または改変細胞を含有するもの）を、単独、または本明細書に記載されるとおりの別の化合物との組み合わせのいずれかで投与することによる臨床または診断症状のいずれかの低減、停止、または排除によって証明される、疾患または障害の進行を遅延、中断、または反転させることを意味する。「治療する」または「治療」は、急性もしくは慢性疾患もしくは障害における症状の重症度の低下、または再発率の低下（例えば、自己免疫疾患経過を再発するまたは寛解

50

する場合のような)、または自己免疫疾患の炎症的側面の場合の炎症の低減も意味する。がんの文脈において本明細書で使用される場合、がんの「治療」またはがんを「阻害する」またはがんの「阻害」という用語は、限定されないが、Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST) のような標準的な基準によって測定した場合の、腫瘍成長率の統計的に有意な低下、腫瘍成長の停止、または腫瘍の、サイズ、質量、代謝活性もしくは体積の低下、または無増悪生存率 (PFS) もしくは全生存率 (OS) の統計的に有意な向上のうちの少なくとも1つを指す。疾患もしくは障害を「予防する」または疾患もしくは障害の「予防」は、本発明の文脈において使用される場合、疾患もしくは障害の出現もしくは発症または疾患もしくは障害の症状の一部もしくは全てを予防するか、または疾患もしくは障害の発症の可能性を低下させるための、本発明の免疫調節ポリペプチドまたは改変細胞を単独または別の化合物との組み合わせのいずれかで投与することを指す。

10

#### 【0137】

用語「腫瘍特異的抗原」または「TSA」は、本明細書において使用される場合、哺乳動物対象の腫瘍細胞上に主に存在するが一般に哺乳動物対象の正常細胞上には見いだされないカウンター構造体を指す。腫瘍特異的抗原は、腫瘍細胞のみに存在する必要はないが、抗腫瘍治療薬 (例えば、本発明の免疫調節ポリペプチド) で標的化できかつ腫瘍の影響から哺乳動物を予防または治療することを提供できるように、腫瘍特異的抗原を有する特定の哺乳動物の細胞の割合が十分に高いかまたは腫瘍の表面の腫瘍特異的抗原のレベルが十分に高い。いくつかの態様において、腫瘍を有する哺乳動物由来の細胞のランダム統計試料では、TSAを提示する細胞の少なくとも50%ががん性である。他の態様において、TSAを提示する細胞の少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、または99%ががん性である。

20

#### 【0138】

用語「バリエーション」(また「改変された」または「変異体」)は、バリエーションCD80に関して使用される場合、ヒト介入によって作製されたCD80、例えば哺乳動物 (例えば、ヒトまたはネズミ) CD80を意味する。バリエーションCD80は、未改変または野生型CD80と比べて変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドである。バリエーションCD80は、野生型CD80アイソフォーム配列と1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、付加、またはそれらの組み合わせだけ異なるポリペプチドである。本明細書における目的のために、バリエーションCD80は、少なくとも1つの親和性が改変されたドメインを含有し、それによってアミノ酸差異のうちの1つまたは複数がIgSFドメイン (例えば、IgVドメイン) において生じる。バリエーションCD80は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれより多いアミノ酸差異、例えばアミノ酸置換を含有することができる。バリエーションCD80ポリペプチドは、概して、対応する野生型または未改変CD80 (例えばSEQ ID NO:1の配列)、その成熟配列または細胞外ドメインもしくはそのIgSFドメインを含有する部分に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い配列同一性を示す。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:152、またはSEQ ID NO:372に示される配列を含む対応する野生型または未改変CD80に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い配列同一性を示す。天然には存在しないアミノ酸も天然に存在するアミノ酸も許容される置換または付加の範囲内に含まれる。バリエーションCD80は、任意の特定の製造方法に限定されることはなく、例えば、デノボ化学合成、デノボ組換えDNA技術、またはそれらの組み合わせを含む。本発明のバリエーションCD80は、哺乳動物種のCD28、PD-L1、および/またはCTLA-4のうちの少なくとも1つまたは複数に特異的に結合する。いくつかの態様において、アミノ酸配列の変化は、未改変または野生型CD80タンパク質と比較して、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合親和性またはアビディティの変化 (すなわち、向上または低下) をもたらす。結合親和性またはアビディティの向

30

40

50

上または低下を、フローサイトメトリーなどの周知の結合アッセイを使用して決定することができる。Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005)。また、Linsley et al., Immunity, 1: 7930801 (1994)も参照のこと。CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対するバリエーションCD80の結合親和性またはアビディティの向上は、未改変または野生型CD80の値よりも少なくとも5%大きい値への向上であることができ、いくつかの態様においては、未改変または野生型CD80対照値の値よりも少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、100%より大きい値への向上であることができる。CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対するCD80の結合親和性またはアビディティの低下は、未改変または野生型CD80対照値の95%以下の値までの低下であり、いくつかの態様においては、未改変または野生型CD80対照値の結合親和性またはアビディティの80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%以下、または検出不可能の値までの低下である。バリエーションCD80ポリペプチドは、アミノ酸残基の置換、付加、または欠失によって一次アミノ酸配列が変化している。バリエーションCD80ポリペプチドの文脈における用語「バリエーション」は、バリエーションCD80が作製される任意の特定の出発組成物または方法のあらゆる条件を強要するものと解釈されるべきではない。バリエーションCD80は、例えば、野生型哺乳動物CD80配列情報から開始して生成され、次いで、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合性についてインシリコでモデル化され、そして、最後に組換え合成または化学合成されて、バリエーションCD80が生成されることができる。別のほんの一例として、バリエーションCD80は、未改変または野生型CD80の部位特異的変異誘発によって作製することができる。したがって、バリエーションCD80は、組成物を表すが、必ずしも任意の所与のプロセスによって生産される生成物である必要はない。組換え法、化学合成、またはそれらの組み合わせを含む多種多様な技術を採用してよい。

#### 【0139】

用語「野生型」または「自然(natural)」または「天然(native)」は、本明細書において使用される場合、核酸分子、タンパク質(例えば、CD80)、IgSFメンバー、宿主細胞などの生物学的材料と共に用いられ、天然に見いだされかつヒトの介入によって改変されていないものを指す。

#### 【0140】

### II. バリエーションCD80ポリペプチド

1つまたは複数のCD80同族結合パートナーに対する結合活性または親和性が変化(向上または低下)しているバリエーションCD80ポリペプチドが本明細書に提供される。いくつかの態様において、CD80同族結合パートナーは、CD28、PD-L1、またはCTLA-4である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメイン(IgD)において、野生型もしくは未改変CD80ポリペプチド、または野生型もしくは未改変CD80のIgDを含有する部分、またはその特異的結合断片と比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば1つまたは複数の置換(あるいは、「変異」または「交換」)、欠失、または付加を含有する。

#### 【0141】

したがって、提供されるバリエーションCD80ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換)がIgDにあるバリエーションIgD(本明細書で以降「vIgD」と呼ばれる)であるかまたはそれを含む。

#### 【0142】

いくつかの態様において、IgDは、IgVドメインもしくはIgC(例えば、IgC2)ドメイン、またはIgVドメインもしくはIgC(例えば、IgC2)ドメインの特異的結合断片、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、IgDは、単にIgVであることも、細胞外ドメイン(ECD)全体を含むIgVおよびIgCの組み合わせであることも、CD80のIgDドメインの任意の組み合わせであることもできる。表2は、CD80のIgVまたはIgC領域に対応する例示的な残基を提供する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸改変(例えば、置換)がIgVドメインもしくはIgCドメイ

ンまたはそれらの特異的結合断片にある、IgVドメイン、もしくはIgCドメイン、またはその特異的結合断片を含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、アミノ酸改変（例えば、置換）の少なくとも1つがIgVドメインまたはその特異的結合断片にある、IgVドメインまたはその特異的結合断片を含有する。いくつかの態様において、変化したIgVドメインまたはIgCドメインは、変化した結合活性または親和性によって親和性が改変されたIgSFドメインである。

【0143】

いくつかの態様において、バリエーションは、未改変CD80配列の配列と比較して、もう1つのIgSFドメインが改変されている。いくつかの態様において、未改変CD80配列は、野生型CD80である。いくつかの態様において、未改変または野生型CD80は、天然CD80またはそのオーソログの配列を有する。いくつかの態様において、未改変CD80は、1つまたは複数のIgSFドメインを含有するCD80の細胞外ドメイン（ECD）またはその一部分であるかまたはそれを含む（表2を参照のこと）。いくつかの態様において、未改変または野生型CD80ポリペプチドの細胞外ドメインは、IgVドメインおよびIgCドメインを含む。しかしながら、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインおよびIgCドメインの両方を含む必要はない。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片を含むかまたはそれから本質的になる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgCドメインまたはその特異的結合断片を含むかまたはそれから本質的になる。いくつかの態様において、バリエーションCD80は、可溶性であり、かつ、膜貫通ドメインを欠く。いくつかの態様において、バリエーションCD80はさらに膜貫通ドメインを含み、いくつかの場合では、細胞質ドメインも含む。

【0144】

いくつかの態様において、野生型または未改変CD80ポリペプチドは、限定されないが、ヒト、マウス、カニクイザル、またはラットCD80ポリペプチドのような哺乳動物CD80ポリペプチドである。いくつかの態様において、野生型または未改変CD80配列は、ヒトのものである。

【0145】

いくつかの態様において、野生型または未改変CD80ポリペプチドは、(i) SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列またはシグナル配列を欠くその成熟形態を有するか、(ii) SEQ ID NO:1に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を示すアミノ酸配列またはその成熟形態を有するか、あるいは(iii) IgVドメインもしくはIgCドメインまたはそれらの特異的結合断片を含有する(i)または(ii)の一部分である。

【0146】

いくつかの態様において、野生型または未改変CD80ポリペプチドは、CD80の細胞外ドメインまたはその一部分であるかまたはそれを含む。例えば、いくつかの態様において、未改変または野生型CD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列、またはそのオーソログを含む。例えば、未改変または野生型CD80ポリペプチドは、(i) SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列を含むことができるか、(ii) SEQ ID NO:28に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができるか、あるいは(iii) IgVドメインもしくはIgCドメインを含む(i)もしくは(ii)の特異的結合断片である。いくつかの態様において、CD80の野生型または未改変細胞外ドメインは、1つまたは複数のCD80同族結合タンパク質、例えばCD28、PD-L1、またはCTLA-4のうちの1つまたは複数と結合することができる。

【0147】

いくつかの態様において、野生型または未改変CD80ポリペプチドは、IgVドメインもしくはIgCドメインまたはそれらの特異的結合断片を含有する。いくつかの態様において、野生型または未改変CD80ポリペプチドのIgVドメインは、SEQ ID NO:152もしくは372に示されるアミノ酸配列、またはそのオーソログを含む。例えば、未改変または野生型CD

80ポリペプチドのIgVドメインは、(i) SEQ ID NO:152もしくは372に示されるアミノ酸配列を含有することができるか、(ii) SEQ ID NO:152もしくは372に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有することができるか、あるいは(iii) (i)もしくは(ii)の特異的結合断片である。いくつかの態様において、野生型または未改変IgVドメインは、1つまたは複数のCD80同族結合タンパク質、例えばCD28、PD-L1、またはCTLA-4のうちの1つまたは複数と結合することができる。

【0148】

いくつかの態様において、野生型または未改変CD80ポリペプチドのIgCドメインは、SEQ ID NO:1の残基145~230もしくは154~232として示されるアミノ酸配列、またはそのオーソログを含む。例えば、未改変または野生型CD80ポリペプチドのIgCドメインは、(i) SEQ ID NO:1の残基145~230もしくは154~232として示されるアミノ酸配列を含有することができるか、(ii) SEQ ID NO:1の残基145~230もしくは154~232に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有することができるか、あるいは(iii) (i)もしくは(ii)の特異的結合断片である。いくつかの態様において、野生型または未改変IgCドメインは、1つまたは複数のCD80同族結合タンパク質と結合することができる。

【0149】

いくつかの態様において、野生型または未改変CD80ポリペプチドは、CD80の特異的結合断片、例えばIgVドメインまたはIgCドメインの特異的結合断片を含有する。いくつかの態様において、特異的結合断片は、CD28、PD-L1、および/またはCTLA 4と結合することができる。特異的結合断片は、少なくとも50アミノ酸、例えば少なくとも60、70、80、90、100、または110アミノ酸の長さを有することができる。いくつかの態様において、IgVドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO:1のアミノ酸35~135または37~138として示されるIgVドメインの長さの少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%であるアミノ酸配列を含有する。いくつかの態様において、IgCドメインの特異的結合断片は、SEQ ID NO:1のアミノ酸145~230または154~232として示されるIgCドメインの長さの少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%であるアミノ酸配列を含む。

【0150】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、1つまたは複数の親和性が改変されたIgSFドメインを含むECDドメインまたはその一部分を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVまたはIgCドメインの少なくとも1つが1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換)を含有する、IgVドメインもしくはIgCドメイン、またはIgVドメインの特異的結合断片もしくはIgCドメインの特異的結合断片を含むことができる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインおよびIgCドメイン、またはIgVドメインの特異的結合断片およびIgCドメインの特異的結合断片を含むことができる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、完全長IgVドメインを含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、完全長IgCドメインを含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインの特異的結合断片を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgCドメインの特異的結合断片を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、完全長IgVドメインおよび完全長IgCドメインを含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、完全長IgVドメインおよびIgCドメインの特異的結合断片を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインの特異的結合断片および完全長IgCドメインを含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインの特異的結合断片およびIgCドメインの特異的結合断片を含む。

10

20

30

40

50



## 【0151】

そのような態様のいずれかにおいて、バリエーションCD80ポリペプチドのうちの1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、CD80ポリペプチドドメインのいずれか1つまたは複数の位置に位置することができる。例えば、いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、バリエーションCD80ポリペプチドの細胞外ドメインに位置する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgVドメインまたはIgVドメインの特異的結合断片に位置する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgCドメインまたはIgCドメインの特異的結合断片に位置する。

## 【0152】

概して、ポリペプチドの種々の属性の各々は、以下に別々に開示される（例えば、可溶性および膜結合ポリペプチド、CD28、PD-L1、およびCTLA-4に対するCD80の親和性、1ポリペプチド鎖当たりの違いの数、連結されたポリペプチド鎖の数、1バリエーションCD80当たりのアミノ酸変更の数および性質、など）。しかしながら、当業者に明らかであり、任意の特定のポリペプチドは、これらの独立した属性の組み合わせを含むことができる。IgSFドメインのドメイン構成を説明するために使用されるSEQ ID NOとして示される特定の配列への言及を含めたアミノ酸についての言及は、例示を目的としており、提供される態様の範囲を限定することを意味していないことが理解されよう。ポリペプチドおよびそのドメインの説明は、類似の分子との相同性分析および整列に基づいて理論的に導出されることが理解されよう。したがって、正確な遺伝子座にはばらつきがあり得、必ずしもタンパク質ごとと同じとは限らない。よって、特定のIgSFドメイン、例えば特定のIgVドメインまたはIgCドメインは、数アミノ酸（例えば、1、2、3または4個）長いまたは短い場合がある。

## 【0153】

さらに、以下に考察するとおりの本発明の種々の態様は、上に開示したとおりの定義済みの用語の意味内でしばしば提供される。それゆえ、特定の定義において記載される態様は、定義済みの用語が本明細書に記載の種々の局面および属性の考察において利用されるとき、参照によって組み入れられると解釈されるべきである。したがって、見出し、種々の局面および態様の提示の順序、ならびに各々独立した属性の別々の開示は、本開示の範囲に限定されることを意味するものではない。

## 【0154】

## 例示的な改変

野生型または未改変CD80ポリペプチドに含有されるIgSFドメインと比較して、少なくとも1つの親和性が改変されたIgSFドメイン（例えば、IgVまたはIgC）またはその特異的結合断片を含有するバリエーションCD80ポリペプチドであって、1つまたは複数のリガンドCD28、PD-L1、またはCTLA-4に対する結合活性または親和性が野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して変化（向上または低下）しているバリエーションCD80ポリペプチドが本明細書に提供される。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、例えば固相ELISA免疫測定法、フローサイトメトリーまたはBiacoreアッセイによって決定した場合に、野生型または未改変CD80ポリペプチド対照配列の場合とは異なる、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合親和性を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28、PD L1、および/またはCTLA-4に対して低下した結合親和性を有する。CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4は、哺乳動物タンパク質、例えばヒタンパク質またはネズミタンパク質であることができる。

## 【0155】

同族結合パートナーの各々に対する結合親和性は、独立している；すなわち、いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28、PD-L1、およびCTLA-4の1つ、2つまたは3つに対して向上した結

【 0 1 5 6 】

10

【 0 1 5 7 】

20

【 0 1 5 8 】

30

【 0 1 5 9 】

40

【 0 1 6 0 】

50

トCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28およびCTLA-4に対して向上した結合親和性、ならびにPD-L1に対して低下した結合親和性を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28およびPD-L1に対して低下した結合親和性、ならびにCTLA-4に対して向上した結合親和性を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28に対して低下した結合親和性、ならびにPD-L1およびCTLA-4に対して向上した結合親和性を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28、CTLA-4、およびPD-L1に対して低下した結合親和性を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28に対して低下した結合親和性、ならびにPD-L1およびCTLA-4に対して向上した結合親和性を有する。

10

【0161】

いくつかの態様において、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する向上したまたはより高い結合親和性を有するバリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合親和性が、野生型または未改変CD80ポリペプチド対照と比較して、少なくとも約5%、例えば少なくとも約10%、15%、20%、25%、35%、または50%向上しているだろう。いくつかの態様において、向上した結合親和性は、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より高い。そのような例では、野生型または未改変CD80ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を含有しないこと以外は、バリエーションCD80ポリペプチドと同じ配列を有する。

20

【0162】

いくつかの態様において、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する低下または低減した結合親和性を有するバリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチド対照と比較して、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対して少なくとも5%、例えば少なくとも約10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれより大きい結合親和性の低下を有するだろう。いくつかの態様において、結合親和性の低下は、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より大きい低下である。そのような例では、野生型または未改変CD80ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を含有しないこと以外は、バリエーションCD80ポリペプチドと同じ配列を有する。

30

【0163】

いくつかの態様において、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する前述の態様のいずれかの平衡解離定数 ( $K_d$ ) は、 $1 \times 10^{-5}$  M、 $1 \times 10^{-6}$  M、 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  Mまたは $1 \times 10^{-11}$  M、または $1 \times 10^{-12}$  M未満であることができる。

40

【0164】

野生型または未改変CD80配列は、本明細書に記載のバリエーションCD80ポリペプチドを生成するために、必ずしも出発組成物として使用される必要はない。それゆえ、用語「置換」の使用は、提供される態様がバリエーションCD80ポリペプチドの特定の製造法に限定されることを暗示するものではない。バリエーションCD80ポリペプチドは、例えば、デノボペプチド合成によって製造されることができ、したがって、置換をコードするようコドンを変更するという意味で、必ずしも「置換」を必要とするわけではない。この原則はまた、アミノ酸残基の用語「付加」および「欠失」まで拡張され、これも同じく特定の製造法を暗示するものではない。バリエーションCD80ポリペプチドが設計または作製される手段は、任

50

意の特定の方法に限定されない。しかしながら、いくつかの態様において、野生型または未改変CD80をコードする核酸は、野生型または未改変CD80遺伝物質から変異誘発され、実施例に開示される方法または当業者に公知の他の方法に従って、所望の特異的結合親和性についておよび/またはIFN- 発現もしくは他の機能的活性の誘導についてスクリーニングされる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、いくつかの公的に利用可能なデータベースで利用可能なタンパク質または核酸配列を利用してデノボ合成され、次いで、その後スクリーニングされる。国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）は、そのような情報を提供し、そして、そのウェブサイトは、先に考察したとおりのUniProtKBデータベースと同じくインターネットを介して公的にアクセス可能である。

10

**【 0 1 6 5 】**

他に規定のない限り、本開示を通して示すとおり、アミノ酸置換は、以下のとおり、SEQ ID NO:28に示される未改変ECD配列の位置、または該当する場合はSEQ ID NO:152もしくは372（注釈や慣習に応じて、SEQ ID NO:28のそれぞれ1～101番目または1～107番目の残基を含有する）に示される未改変IgV配列の位置のナンバリングに対応するアミノ酸位置番号によって指定される。

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTIRYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKN  
RTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPPTPSISD  
FEIPTSNIIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTT  
NHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN (SEQ ID NO:28)

20

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTIRYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKN  
RTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT (SEQ ID NO:152)

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTIRYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKN  
RTIFDITNNLSIVIQALRPSDEGTYECVVLKYEKDGFKREHLAEVTLVKAD (SEQ ID  
NO:372)

30

**【 0 1 6 6 】**

CD80ポリペプチド（そのIgSFドメイン（例えば、IgV）を含有するその一部分を含む）における改変（例えば、アミノ酸置換）の対応する位置を、例えばSEQ ID NO:28またはSEQ ID NO:152もしくはSEQ ID NO:372を有する参照配列とのアライメントによって同定することは当業者のレベルの範囲内である。本開示にわたる改変の記載において、アミノ酸位置が中央に表示され、対応する未改変（例えば、野生型）アミノ酸が番号の前に記載され、同定されたバリエーションのアミノ酸置換が番号の後に記載される。改変が該位置の欠失である場合は「del」と表示され、改変が該位置における挿入である場合は「ins」と表示される。

40

**【 0 1 6 7 】**

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80配列に1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、野生型または未改変CD80配列のエクトドメイン（例えば細胞外ドメイン）にあることができる。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgVドメインまたはその特異的結合断片にある。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）は、IgCドメインまたはその特異的結合断片にある。バリエーションCD80ポリペプチドのいくつかの態様において、1つ

50

または複数のアミノ酸改変（例えば、置換）のいくつかは、IgVドメインまたはその特異的結合断片にあり、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）のいくつかは、IgCドメインまたはその特異的結合断片にある。

【0168】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。改変（例えば、置換）は、IgVドメインまたはIgCドメインにあることができる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgVドメインまたはその特異的結合断片に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、IgCドメインまたはその特異的結合断片に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、野生型または未改変CD80ポリペプチドまたはその特異的結合断片と、例えばSEQ ID NO:28、152、または372のアミノ酸配列と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。

10

【0169】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置4、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、24、25、27、28、29、30、31、33、36、37、38、40、41、42、43、44、47、48、50、52、53、54、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、72、74、76、77、80、81、83、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、99、102、103、104、107、108、109、110、114、115、116、117、118、120、121、122、126、127、128、129、130、133、137、140、142、143、144、148、149、152、154、160、162、164、168、169、174、175、177、178、183、178、185、188、190、192、193、または199に対応する、未改変CD80またはその特異的結合断片における1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、そのようなバリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、またはCTLA-4のうちの1つまたは複数に対する結合親和性が、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して変化している。例えば、いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合親和性が野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合親和性が、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して低下している。

20

30

【0170】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

40

V4M, K9E, E10R, V11S, A12G, A12T, A12V, T13N, L14A, S15V,  
 S15F, C16S, C16G, C16L, G17W, H18L, H18R, H18Y, V20L, S21P, V22A, E24G, L25P,  
 Q27R, T28A, T28S, R29C, R29D, R29H, R29V, I30V, Y31F, Y31H, Y31L, Q33H, K36E,  
 K36G, K37E, K37Q, M38I, M38L, M38T, M38V, L40M, T41A, T41G, T41D, T41I, M42T,  
 M43I, M43Q, M43R, M43V, S44P, M47T, N48D, N48I, W50G, E52G, Y53C, K54M, F59L,  
 F59S, D60V, I61N, T62S, N63S, N64S, L65H, S66H, I67F, I67T, V68A, V68M, I69T, L70Q,  
 L70P, L70R, L72P, P74L, D76G, E77G, E77K, Y80N, E81A, E81R, E81V, V83A, V83I, L85I,  
 L85R, K86E, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90L, D90N, A91E, A91G,  
 A91S, A91T, F92L, F92N, F92P, F92Y, K93I, K93E, K93Q, K93R, K93V, R94G, R94L, R94F,  
 E95K, H96R, L97R, E99D, E99G, L102S, S103L, S103P, V104A, V104L, D107N, F108L,  
 P109S, P109H, T110A, S114T, D115G, F116S, F116L, E117V, E117G, I118V, I118A, I118T,  
 T120S, S121P, N122S, I126L, I126V, I127T, C128Y, C128R, S129L, S129P, T130A, G133D,  
 P137L, S140T, L142S, E143G, N144D, N144S, L148S, N149D, N149S, N152T, T154I, T154A,  
 E160G, E162G, Y164H, S168G, K169E, K169I, K169S, M174T, M174V, T175A, N177S,  
 H178R, L183H, K185E, H188D, H188Q, R190S, N192D, Q193L, または T199S

10

20

から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリ  
 アントCD80ポリペプチドは、

V4M, K9E, E10R, V11S, A12G, A12T, A12V, T13N, L14A, S15V,  
 S15F, C16S, C16G, C16L, G17W, H18L, H18R, H18Y, V20L, S21P, V22A, E24G, L25P,  
 Q27R, T28A, T28S, R29C, R29D, R29H, R29V, I30V, Y31F, Y31H, Y31L, Q33H, K36E,  
 K36G, K37E, K37Q, M38I, M38L, M38T, M38V, L40M, T41A, T41G, T41D, T41I, M42T,  
 M43I, M43Q, M43R, M43V, S44P, M47T, N48D, N48I, W50G, E52G, Y53C, K54M, F59L,  
 F59S, D60V, I61N, T62S, N63S, N64S, L65H, S66H, I67F, I67T, V68A, V68M, I69T, L70Q,  
 L70P, L70R, L72P, P74L, D76G, E77G, E77K, Y80N, E81A, E81R, E81V, V83A, V83I, L85I,  
 L85R, K86E, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90L, D90N, A91E, A91G,  
 A91S, A91T, F92L, F92N, F92P, F92Y, K93I, K93E, K93Q, K93R, K93V, R94G, R94L, R94F,  
 E95K, H96R, L97R, E99D, E99G, L102S, S103L, S103P, V104A, V104L, D107N, F108L,  
 P109S, P109H, T110A, S114T, D115G, F116S, F116L, E117V, E117G, I118V, I118A, I118T,  
 T120S, S121P, N122S, I126L, I126V, I127T, C128Y, C128R, S129L, S129P, T130A, G133D,  
 P137L, S140T, L142S, E143G, N144D, N144S, L148S, N149D, N149S, N152T, T154I, T154A,  
 E160G, E162G, Y164H, S168G, K169E, K169I, K169S, M174T, M174V, T175A, N177S,  
 H178R, L183H, K185E, H188D, H188Q, R190S, N192D, Q193L, T199S

30

40

またはその保守的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換  
 を有する。

【 0 1 7 1 】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、

50

L70Q/A91G, L70Q/A91G/T130A, L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A,  
V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/T120S/T130A,  
V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A, S44P/L70Q/A91G/T130A,  
L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A, A91G/T120S/T130A, L70R/A91G/T120S/T130A,  
L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A, L70Q/Y87N/A91G/T130A,  
T28S/L70Q/A91G/E95K/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A,  
K36E/I67T/L70Q/A91G/T120S/T130A/N152T, E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A,  
K37E/F59S/L70Q/A91G/T120S/T130A, A91G/S103P, K89E/T130A,  
D60V/A91G/T120S/T130A, K54M/A91G/T120S,  
M38T/L70Q/E77G/A91G/T120S/T130A/N152T, R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/T130A,  
Y31H/T41G/L70Q/A91G/T120S/T130A, V68A/T110A, S66H/D90G/T110A/F116L,

10

20

30

40

50

R29H/E52G/T120S/T130A, A91G/L102S, I67T/L70Q/A91G/T120S,  
L70Q/A91G/T110A/T120S/T130A,  
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/T120S/T130A, V22A/L70Q/S121P,  
A12V/S15F/Y31H/T41G/T130A/P137L/N152T, I67F/L70R/E88G/A91G/T120S/T130A,  
E24G/L25P/L70Q/T120S, A91G/F92L/F108L/T120S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S, 10  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S,  
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P  
/K93V/R94L/H96R/N149S/C182S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S, R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G, T41I/A91G, 20  
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,  
K36G/K37Q/M38I/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S,  
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K36G/K37Q/M38I/L40M,  
R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,  
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,  
R29V/Y31F/K36G/M38L/M43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G,  
V68M/L70P/L72P/K86E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/I127T/T130A/K169E, 30  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/T130A/M174T,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/H188D, 40

10

20

30

40

50



H18R/R29D/Y31L/Q33H/K36G/K37E/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91  
T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/E143G/K169E/M174V/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/I127T/T130A/H188D, 10  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120  
S/I127T/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/F108L/T120S/T130A/K169E/H188D, 20  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/I127T/C128Y/T130A/H188D, 30  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/T130A/K169E,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93I  
/R94L/L97R/T130A, 40

10

20

30

40

50

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93I  
/R94L/L97R/T130A/L148S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/I61N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V  
/R94F/V104A/T120S/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/F92P/K93V/R94F/I118  
V/T130A, 10  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/T175A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/F116S/T130A/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/L142S/H188D,  
C16S/H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T110A/H188D, 20  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/A91G/T120S/I127T/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/D76G/A91G/S103L/T120S/I127T/T  
130A, DELTAQ33/Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/S129L/H188D,  
K9E/E10R/V11S/A12G/T13N/K14A/S15V/C16L/G17W/H18Y/Y53C/L70Q/D90G/T130A/N14  
9D/N152T/H188D, 30  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D, K89E/K93E/T130A,  
S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N48I/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T  
/F92P/K93V/R94L/P109H/I126L/K169I,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/P74L/Y80N/E81V/L85R/K89N/A91  
T/F92P/K93V/R94L/L97R,  
S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/P74L/Y80N/E81V/L85R/K89N/D90  
N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A/N149S/E162G, 40

H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/N149S/R190S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/P74L/Y80N/E81V/L85R/K89N/A91  
T/F92P/K93V/R94L/T130A/R190S,  
C16G/V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/D76G/E81V/L85R/K8  
9N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169I/H178R/N192D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/E117V/I118T/N149S/S168G/H188Q,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N64S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94F/I118T/T130A/N149S/K169I,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/D115G/I118T/T130A/G133D/N149S, S129P, A91G/S129P,  
I69T/L70Q/A91G/T120S, Y31H/S129P,  
T28A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/V104L/T130A/N149S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L97R/N149S/H188Q,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L97R/N149S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A/N149S/T154I,  
A12G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/ L97R/T130A/L183H,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93

10

20

30

40

50

40

40

P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/I61N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V  
/R94F/V104A/I118V/T120S/I126V/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/I118V/T120S/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/T175A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/L142S/H188D,  
C16S/H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T110A/I118V/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/D76G/A91G/S103L/I118V/T120S/I1  
27T/T130A, Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E,  
Y53C/L70Q/D90G/T130A/N149D/N152T/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/N149S

10

20

である。

30

【 0 1 7 2 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置4、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、24、25、27、28、29、31、33、36、37、38、40、41、42、43、44、47、48、50、52、53、54、59、60、61、62、63、64、66、67、68、69、70、72、74、76、77、80、81、83、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、99、102、103、104、108、109、110、115、116、117、118、120、121、122、126、127、128、129、130、133、137、140、142、143、144、148、149、152、154、160、162、168、169、174、175、177、178、183、178、188、190、192、または193に対応する、未改変CD80またはその特異的結合断片における1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、そのようなバリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、またはCTLA-4のうちの1つまたは複数に対する結合親和性が、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して変化している。例えば、いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合親和性が、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4に対する結合親和性が、野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して低下している。

40

【 0 1 7 3 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

50

V4M, K9E, E10R, V11S, A12G, A12T, A12V, T13N, L14A, S15V,  
 S15F, C16S, C16G, C16L, G17W, H18L, H18R, H18Y, V20L, S21P, V22A, E24G, L25P,  
 Q27R, T28A, T28S, R29C, R29D, R29H, R29V, Y31F, Y31H, Y31L, Q33H, K36E, K36G,  
 K37E, K37Q, M38I, M38L, M38T, M38V, L40M, T41A, T41G, T41D, T41I, M42T, M43I,  
 M43Q, M43R, M43V, S44P, M47T, N48I, W50G, E52G, Y53C, K54M, F59L, F59S, D60V,  
 I61N, T62S, N63S, N64S, S66H, I67F, I67T, V68A, V68M, I69T, L70Q, L70P, L70R, L72P,  
 P74L, D76G, E77G, E77K, Y80N, E81A, E81R, E81V, V83A, V83I, L85I, L85R, K86E, Y87N,  
 E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90L, D90N, A91E, A91G, A91S, A91T, F92L,  
 F92N, F92P, F92Y, K93I, K93E, K93Q, K93R, K93V, R94G, R94L, R94F, E95K, H96R, L97R,  
 E99G, L102S, S103L, S103P, V104A, V104L, F108L, P109S, P109H, T110A, D115G, F116S,  
 F116L, E117V, E117G, I118V, I118A, I118T, T120S, S121P, N122S, I126L, I127T, C128Y,  
 C128R, S129L, S129P, T130A, G133D, P137L, S140T, L142S, E143G, N144S, L148S, N149D,  
 N149S, N152T, T154I, T154A, E160G, E162G, S168G, K169E, K169I, K169S, M174T,  
 M174V, T175A, N177S, H178R, L183H, H188D, H188Q, R190S, N192D, Q193L

10

20

から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

V4M, K9E, E10R, V11S, A12G, A12T, A12V, T13N, L14A, S15V,  
 S15F, C16S, C16G, C16L, G17W, H18L, H18R, H18Y, V20L, S21P, V22A, E24G, L25P,  
 Q27R, T28A, T28S, R29C, R29D, R29H, R29V, Y31F, Y31H, Y31L, Q33H, K36E, K36G,  
 K37E, K37Q, M38I, M38L, M38T, M38V, L40M, T41A, T41G, T41D, T41I, M42T, M43I,  
 M43Q, M43R, M43V, S44P, M47T, N48I, W50G, E52G, Y53C, K54M, F59L, F59S, D60V,  
 I61N, T62S, N63S, N64S, S66H, I67F, I67T, V68A, V68M, I69T, L70Q, L70P, L70R, L72P,  
 P74L, D76G, E77G, E77K, Y80N, E81A, E81R, E81V, V83A, V83I, L85I, L85R, K86E, Y87N,  
 E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90L, D90N, A91E, A91G, A91S, A91T, F92L,  
 F92N, F92P, F92Y, K93I, K93E, K93Q, K93R, K93V, R94G, R94L, R94F, E95K, H96R, L97R,  
 E99G, L102S, S103L, S103P, V104A, V104L, F108L, P109S, P109H, T110A, D115G, F116S,  
 F116L, E117V, E117G, I118V, I118A, I118T, T120S, S121P, N122S, I126L, I127T, C128Y,  
 C128R, S129L, S129P, T130A, G133D, P137L, S140T, L142S, E143G, N144S, L148S, N149D,  
 N149S, N152T, T154I, T154A, E160G, E162G, S168G, K169E, K169I, K169S, M174T,  
 M174V, T175A, H178R, H178R, L183H, H188D, H188Q, R190S, N192D, Q193L

30

40

またはその保守的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。

【 0 1 7 4 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置30、65、107、114、164、185、または199に対応する、未改変CD80またはその特異的結合断片における1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、I30V、N48

50

D、L65H、E99D、D107N、S114T、I126V、N144D、Y164H、およびT199Sから選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、N48D、L65H、E99D、D107N、S114T、I126V、N144D、Y164H、K185E、T199S、またはその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。

#### 【0175】

保存的アミノ酸置換は、野生型または未変換アミノ酸以外の置換アミノ酸と同じクラスのアミノ酸に属する任意のアミノ酸である。アミノ酸のクラスは、脂肪族（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン）、ヒドロキシルまたは硫黄含有（セリン、システイン、トレオニン、およびメチオニン）、環状（プロリン）、芳香族（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）、塩基性（ヒスチジン、リジン、およびアルギニン）、および酸性/アミド（アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、およびグルタミン）である。したがって、例えば、V4M置換の保存的アミノ酸置換には、V4S、V4C、およびV4Tアミノ酸置換が含まれる。

#### 【0176】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、表1に列挙されている置換（変異）のいずれかを含む。表1はまた、野生型CD80または例示的なバリエーションCD80ポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはIgVドメインについて、SEQ ID NOを参照することにより例示的な配列を提供する。表示のとおり、所与のドメインに対応する正確な遺伝子座または残基は、例えばドメインを同定または分類するために使用される方法に応じて異なり得る。また、いくつかの場合では、所与のドメイン（例えば、IgV）のN末端側および/またはC末端側の隣接アミノ酸も、例えば発現されたときにドメインの適切なフォールディングを確実にするために、バリエーションIgSFポリペプチドの配列に含めることができる。したがって、表1におけるSEQ ID NOの例示は、限定されるものと解釈されるべきではないことが理解されよう。例えば、バリエーションCD80ポリペプチドの特定のドメイン（例えば、IgVドメイン）は、それぞれのSEQ ID NOに示されるアミノ酸配列よりも数アミノ酸長いかまたは短く、例えば1～10アミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、または7アミノ酸長いかまたは短いことができる。

#### 【0177】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、表1に列挙されている細胞外ドメイン（ECD）配列のいずれか（すなわち、SEQ ID NO:55～108、280～346、414～475のうちのいずれか1つ）を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、表1に列挙されている細胞外ドメイン（ECD）配列のうちのいずれか（すなわち、SEQ ID NO:55～108、280～346、414～475のうちのいずれか1つ）に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示すポリペプチド配列を含み、かつ、野生型または未変換CD80には存在しないアミノ酸改変（例えば、置換）を含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、表1に列挙されている細胞外ドメイン（ECD）配列のうちのいずれか（すなわち、SEQ ID NO:55～108、280～346、414～475のうちのいずれか1つ）の特異的結合断片を含み、かつ、野生型または未変換CD80には存在しないアミノ酸改変（例えば、置換）を含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、表1に列挙されているIgV配列のいずれか（すなわち、SEQ ID NO:153～195、347、373～386、476～477のいずれか1つ）を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、表1に列挙されているIgV配列のいずれか（すなわち、SEQ ID NO:153～195、347、373～386、476～477のいずれか1つ）に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示すポリペプチド配列を含み、かつ、野生型または未変換C

10

20

30

40

50



D80には存在しないアミノ酸改変（例えば、置換）を含有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、表1に列挙されているIgV配列のいずれか（すなわち、SEQ ID NO:153～195、347、373～386、476～477のいずれか1つ）の特異的結合断片を含み、かつ、野生型または未改変CD80には存在しないアミノ酸置換（例えば、置換）を含有する。

【0178】

表1はまた、野生型CD80または例示的なバリエーションCD80ポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはIgVドメインについてSEQ ID NOを参照することによる例示的な配列を提供する。表示のとおり、所与のドメインに対応する正確な遺伝子座または残基は、例えばドメインを同定または分類するために使用される方法に応じて異なり得る。また、いくつかの場合では、所与のドメイン（例えば、ECD）の隣接したN末端および/またはC末端アミノ酸もまた、バリエーションIgSFポリペプチドの配列に、例えば発現されたときにドメインの適切なフォールディングを確実にするために含めることができる。したがって、表1におけるSEQ ID NOの例示は、限定されるものと解釈されるべきではないことが理解されよう。例えば、バリエーションCD80ポリペプチドの特定のドメイン（例えば、IgVドメイン）は、それぞれのSEQ ID NOに示されるアミノ酸配列よりも数アミノ酸長いまたは短く、例えば1～10アミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、または7アミノ酸長いまたは短いことができる。

【0179】

（表1）例示的なバリエーションCD80ポリペプチド

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	28	152, 372
L70Q/A91G	55	153, 374
L70Q/A91G/T130A	56	
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A	57	
V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A	58	154
L70Q/A91G/T120S/T130A	59	
V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A	60	155
S44P/L70Q/A91G/T130A	61	156
L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A	62	
A91G/T120S/T130A	63	157
L70R/A91G/T120S/T130A	64	158
L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A	65	159
L70Q/Y87N/A91G/T130A	66	160
T28S/L70Q/A91G/E95K/T120S/T130A	67	161
N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A	68	162
K36E/I67T/L70Q/A91G/T120S/T130A/N152T	69	163
E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A	70	164
K37E/F59S/L70Q/A91G/T120S/T130A	71	165
A91G/S103P	72	378
K89E/T130A	73	166, 385
A91G	74	154, 375
D60V/A91G/T120S/T130A	75	167
K54M/A91G/T120S	76	168
M38T/L70Q/E77G/A91G/T120S/T130A/N152T	77	169
R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/T130A	78	170
Y31H/T41G/L70Q/A91G/T120S/T130A	79	171
V68A/T110A	80	172
S66H/D90G/T110A/F116L	81	173
R29H/E52G/T120S/T130A	82	174
A91G/L102S	83	386
I67T/L70Q/A91G/T120S	84	175
L70Q/A91G/T110A/T120S/T130A	85	
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/T120S/T130A	86	176
V22A/L70Q/S121P	87	177
A12V/S15F/Y31H/T41G/T130A/P137L/N152T	88	178
I67F/L70R/E88G/A91G/T120S/T130A	89	179
E24G/L25P/L70Q/T120S	90	180
A91G/F92L/F108L/T120S	91	181
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S	92	182
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S	93	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/	94	183

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S		
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/H96R/N149S/C182S	95	184
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/N149S	96	
R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	97	185, 376
T41I/A91G	98	186, 377
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S	99	
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	100	187, 373
K36G/K37Q/M38I/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E9 9G/T130A/N149S	101	188
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	102	189, 379
K36G/K37Q/M38I/L40M	103	190, 380
K36G	104	191, 381
R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	105	192
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	106	193
R29V/Y31F/K36G/M38L/M43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F9 2N/K93Q/R94G	107	194, 382
V68M/L70P/L72P/K86E	108	195, 383
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E	280	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A	281	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E	282	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/M174T	283	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/H188D	284	
H18R/R29D/Y31L/Q33H/K36G/K37E/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/ E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E/H188 D	285	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/E143G/K169E/M1 74V/H188D	286	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A	287	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/H188D	288	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E	289	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A	290	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L85R/K89N/A91T/ F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E/H188D	291	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/F108L/T120S/T130A/K169E/H188D	292	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E/H188D	293	

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A/H188D		
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E	294	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E/H188D	295	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/C128Y/T130A/H188D	296	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94F/T130A/K169E	297	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A	298	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E	299	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L97R/T130A	300	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L97R/T130A/L148S	301	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E	302	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/I61N/E81V/L85R/K 89N/A91T/F92P/K93V/R94F/V104A/T120S/T130A	303	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ F92P/K93V/R94F/I118V/T130A	304	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/T62S/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/T175A	305	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/F116S/T130A/H188D	306	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/L142S/H188D	307	
C16S/H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T110A/H188D	308	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/A91G/T120S/I127T /T130A/H188D	309	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/D76G/A91G/ S103L/T120S/I127T/T130A	310	
DELTAQ33/Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/ T130A/K169E	311	
T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E	312	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/S129L/H188D	313	
K9E/E10R/V11S/A12G/T13N/K14A/S15V/C16L/G17W/H18Y/Y53C/L 70Q/ D90G/T130A/N149D/N152T/H188D	314	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D	315	
K89E/K93E/T130A	316	
S21P/ R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/ N48I/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/ P109H/I126L/K169I	317	

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/ P74L/Y80N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L97R	318	347, 384
S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/P74L/Y80N/E 81V/L85R/K89N/D90N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A/N149S/E162G	319	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A	320	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A/N149S/R190S	321	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/P74L/Y80N/ E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/ T130A/R190S	322	
C16G/V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M /D76G/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/T130A/S140T /N149S/K169I/H178R/N192D	323	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94F/E117V/I118T/N149S/S168G/H188Q	324	
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A	325	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N64S/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94F/ I118T/T130A/N149S/K169I	326	
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/D115G/I118T/T130A/G133D/N14 9S	327	
S129P	328	
A91G/S129P	329	
I69T/L70Q/A91G/T120S	330	
Y31H/S129P	331	
T28A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/ V104L/T130A/N149S	332	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L97R/N149S/H188Q	333	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L97R/N149S	334	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/ T130A/N149S/T154I	335	
A12G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/ L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/ L97R/T130A/L183H	336	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S	337	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L	338	
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/ I118T/T130A/N149S	339	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/T130A/N149S	340	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/T130A/N149S/K169I	341	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/R94F/T130A/N149S/K169I	342	

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
I118T/C128R	343	
Q27R/R29C/M42T/S129P/E160G	344	
S129P/T154A	345	
S21P/L70Q/D90G/T120S/T130A	346	
L70Q/A91G/N144D	414	
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E	415	
V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	416	
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	417	
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A	418	
V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A	419	
L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A	420	
A91G/I118V/T120S/T130A	421	
L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S	422	
L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A	423	
T28S/L70Q/A91G/E95K/I118V/T120S/I126V/T130A/K169E	424	
N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A	425	
K36E/I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T	426	
E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E	427	
K37E/F59S/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K185E	428	
D60V/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	429	
K54M/L70Q/A91G/Y164H/T120S	430	
M38T/L70Q/E77G/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T	431	
Y31H/T41G/M43L/L70Q/A91G/I118V/T120S/I126V/T130A	432	
L65H/D90G/T110A/F116L	433	
R29H/E52G/D90N/I118V/T120S/T130A	434	
I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S	436	
L70Q/A91G/T110A/I118V/T120S/T130A	437	
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/I118V/T120S/I126V/T130A	438	
A12V/S15F/Y31H/M38L/T41G/M43L/D90N/T130A/P137L/N149D/N152T	439	
I67F/L70R/E88G/A91G/I118V/T120S/T130A	440	
E24G/L25P/L70Q/A91G/I118V/T120S/N152T	441	
A91G/F92L/F108L/I118V/T120S	442	
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S	443	
K36G/K37Q/M38I/L40M/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S	444	
K36G/L40M	445	476, 477
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E	446	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A	447	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E	448	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/M174T	449	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N48D/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D	450	

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
H18R/R29D/Y31L/Q33H/K36G/K37E/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D	451	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/E143G/K169E/M174V/H188D	452	
R29D/I30V/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D	453	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D	454	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E	455	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A	456	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E/H188D	457	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/F108L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D	458	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/N149D/K169E/H188D	459	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D	460	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/C128Y/T130A/H188D	461	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99D/T130A	462	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E	463	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/I61N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94F/V104A/I118V/T120S/I126V/T130A	464	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94F/I118V/T120S/T130A	465	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/T175A	466	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/L142S/H188D	467	
C16S/H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T110A/I118V/H188D	468	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D	469	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/D76G/A91G/S103L/I118V/T120S/I127T/T130A	470	
Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E	471	
T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E	472	
Y53C/L70Q/D90G/T130A/N149D/N152T/H188D	473	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D	474	
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A/N149S	475	

10

20

30

40

## 【 0 1 8 0 】

いくつかの態様において バリアントCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置12、18、20、29、31、36、40、41、43、52、59、60、63、67、70、77、81、87、88、89、90、91、92、93、107、109、114、117、118、120、122、127、130、144、169、178または199に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリアントCD80ポリペプチドは、

A12T, H18L, V20L, R29H,

Y31H, K36G, L40M, T41G, T41I, M43V, E52G, F59L, D60V, N63S, I67T, L70Q, L70R,  
E77K, E81A, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90K, D90N, A91G, A91S, F92Y, K93R,  
D107N, P109S, S114T, E117G, I118A, I118T, I118V, T120S, I127T, T130A, N144D, K169E,  
H178R, または T199S

から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

A12T, H18L, V20L, R29H, Y31H, K36G, L40M, T41G, T41I,

M43V, E52G, F59L, D60V, N63S, I67T, L70Q, L70R, E77K, E81A, Y87N, E88D, E88G,  
K89E, K89R, D90K, D90N, A91G, A91S, F92Y, K93R, D107N, P109S, S114T, E117G, I118A,  
I118T, I118V, T120S, I127T, T130A, N144D, K169E, H178R, もしくは T199S

またはその保存的アミノ酸置換から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T, V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A,

V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A,

R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M, T41I/A91G,

E52G/L70/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E,

D60V/A91G/T120S/T130A, D60V/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,

L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A,

L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A, L70Q/Y87N/A91G/T130A, L70Q/A91G,

L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A,

L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A,

L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E, L70Q/A91G/T120S/T130A,

L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, L70R/A91G/T120S/T130A,

L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,

K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28のエクトドメインに対する親和性および/またはCD28に対する選択性が、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。

【0181】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置12、18、21、22、28、29、31、33、36、38、40、41、42、43、47、48、59、64、67、68、70、77、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、97、104、10



9、115、117、118、120、122、126、130、133、140、144、148、149、168、169、177、183、188または193に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、A12G, A12T, H18L, S21P, V22A, T28A,

R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, L40M, T41A, T41G, M42T, M43R, M43V, M47T, N48I, F59L, N64S, I67T, V68A, V68M, L70Q, E77K, E81V, L85R, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90N, A91G, A91T, F92P, F92Y, K93R, K93V, R94F, R94L, L97R, V104L, P109H, P109S, D115G, E117V, I118T, I118V, T120S, N122S, I126L, T130A, G133D, S140T, N144S, L148S, N149S, S168G, K169I, K169S, N177S, L183H, H188Q, R190S および Q193L

10

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、A12T, H18L, R29D, R29H, Y31H,

Y31L, Q33H, K36G, M38I, L40M, T41A, T41G, M42T, M43R, M43V, M47T, F59L, I67T, L70Q, E77K, E81V, L85R, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90N, A91G, A91T, F92P, F92Y, K93R, K93V, R94L, P109S, I118T, I118V, T120S, N122S, N144S, L148S, N149S, および N178S

20

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。

【 0 1 8 2 】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S,

30

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M, I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,

40

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, A91G,

H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93

V/R94L/T130A/N149S/R190S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/E117V/I118T/N149S/S168G/H188Q,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N64S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94F/ I118T/T130A/N149S/K169I,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/D115G/I118T/T130A/G133D/N149S,  
T28A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/ V104L/T130A/N149S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L97R/N149S/H188Q, K89E/T130A, K89E/K93E/T130A,  
S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N48I/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T  
/F92P/K93V/R94L/S21P/ N48I/V68A/P109H/I126L/K169I,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/N149S,  
A12G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/ L97R/T130A/L183H,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/ I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I, または  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/T130A/N149S/K169I

10

20

30

40

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、PD-L1に対する親和性および/またはPD-L1に対する選択性が、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。

【 0 1 8 3 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置12、18、36、40、43、59、77、88、89、90、91、92、93、109、118、122、または177に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

50

A12T, H18L, K36G, M43V, F59L, E77K, E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, P109S, I118T, N112S, および N177S

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、  
A12T, H18L, K36G, L40M,

M43V, F59L, E77K, E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, P109S, I118T, N112S, および N177S

10

ならびにその保存的変異からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、  
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T, K36G, K36G/L40M,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N112S/N177S, または

K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N112S/N177S

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28のエクトドメインおよびPD-L1のエクトドメインに対する親和性が、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。

20

【 0 1 8 4 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置4、29、31、36、40、41、52、67、68、70、87、88、89、90、91、92、93、107、109、110、118、120、130、144、または169に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

V4M, R29H, Y31H, K36G, L40M, T41G, E52G, I67T,

30

V68A, L70Q, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90K, D90N, A91G, F92Y, K93R, D107N, P109S, T110A, I118V, T120S, T130A, N144D, および K169E

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

V4M, R29H, Y31H, K36G, L40M, T41I, T41G, E52G, I67T, I69T, V68A, L70Q, Y87N, E88D,

E88G, K89E, K89R, D90K, D90N, A91G, F92Y, K93R, D107N, P109S, T110A, I118V, T120S,

T130A, N144D, および K169E

40

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A, V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M, T41I/A91G, E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E, I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, V68A/T110A, L70Q/A91G, L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, L70Q/A91G/T130A, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, A91G/I118V/T120S/T130A, A91G/T120S/T130A または I69T/L70Q/A91G/T120S

10

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CTLA-4のエクトドメインに対する親和性および/または選択性が、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置36、40、52、70、88、89、90、91、92、93、107、118、120、130、144、または169に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、K36G, L40M, E52G, L70Q, E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, D107N, I118V, T120S, T130A, N144D, および K169E

20

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、K36G, L40M, E52G, L70Q, E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, D107N, I118V, T120S, T130A N144D, および K169E

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、K36G, K36G/L40M, E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E, L70Q/A91G, L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

30

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28のエクトドメインおよびCTLA-4のエクトドメインに対する親和性が、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。

#### 【 0 1 8 5 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置29、31、36、40、41、67、70、87、88、89、90、91、92、93、109、118、120、122、130、または178に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、R29H, Y31H, K36G, L40M, T41G, I67T, L70Q, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90N, D90K, A91G, F92Y, K93R, P109S, I118V, T120S

40

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

50

R29H, Y31H, K36G, L40M, T41G, I67T, L70Q, Y87N, E88D, E88G, K89E,  
K89R, D90N, D90K, A91G, F92Y, K93R, P109S, I118V, T120S

およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M, I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

10

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、PD-L1のエクトドメインおよびCTLA-4のエクトドメインに対する親和性が、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。

#### 【0186】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置36、40、88、89、90、91、92、または93に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、K36G、L40M、E88D、K89R、D90K、A91G、F92Y、およびK93Rからなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、K36G、L40M、E88D、K89R、D90K、A91G、F92Y、K93R、およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、K36G, K36G/L40M, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

20

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28のエクトドメイン、PD-L1のエクトドメイン、およびCTLA-4のエクトドメインに対する親和性が、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して向上している。

30

#### 【0187】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置12、18、29、31、33、36、38、40、41、42、43、47、48、63、59、64、67、68、70、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、97、104、109、114、115、117、118、120、122、126、127、130、133、140、144、148、149、168、169、177、183、188または193に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、A12G, A12T, H18L, S21P, V22A, T28A,

R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, L0M, T41A, T41G, M42T, M43R, M43V, M47T, N48I, F59L, N63S, N64S, I67T, V68A, V68M, L70Q, E77K, E81A, E81V, L85R, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, D90K, D90N, A91G, A91T, F92P, F92Y, K93R, K93V, R94F, R94L, L97R, S103L, S103P, V104L, P109H, P109S, D115G, E117V, I118T, S114T, I118V, T120S, N122S, I126L, I127T, T130A, G133D, S140T, N144S, L148S, N149S, S168G, K169I, K169S, N177S, L183H, H188Q, R190S および Q193L

40

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、

50

R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, T41G, M42T, M43R, M47T, N63S, I67T, L70Q, E81A, E81V, L85R, Y87N, E88G, K89E, K89N, D90N, A91G, A91T, F92P, K93V, R94L, P109S, S114T, I118V, I118T, T120S, I127T, T130A, N144S, L148S, および N149S ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、 N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A, L70Q/Y87N/A91G/T120S/I127T/T130A

10

である。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94 L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94 L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93 V/R94L/L148S/N149S,

20

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94 L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M, I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, A91G,

H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93 V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,

30

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93 V/R94L/T130A/N149S/R190S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94 F/E117V/I118T/N149S/S168G/H188Q,

V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92 P/K93V/R94L/T130A,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N64S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93 V/R94F/ I118T/T130A/N149S/K169I,

40

V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92

P/K93V/R94L/D115G/I118T/T130A/G133D/N149S,  
 T28A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/ V104L/T130A/N149S,  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/L97R/N149S/H188Q, K89E/T130A, K89E/K93E/T130A,  
 S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N48I/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T  
 /F92P/K93V/R94L/S21P/ N48I/V68A/P109H/I126L/K169I, 10  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
 P/K93V/R94L/T130A,  
 H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/T130A/N149S,  
 A12G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
 P/K93V/R94L/ L97R/T130A/L183H,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94 20  
 L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
 L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L,  
 V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
 V/R94L/ I118T/T130A/N149S,  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
 L/I118T/T130A/N149S, 30  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
 L/I118T/T130A/N149S/K169I, または  
 R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
 F/T130A/N149S/K169I

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、例えばSEQ ID NO:  
 28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比  
 較して、CD28のエクトドメインまたはPD-L1のエクトドメインに対する親和性が向上し  
 ており、かつCTLA-4のエクトドメインに対する親和性が低下している。 40

#### 【 0 1 8 8 】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置63  
 、70、81、87、91、114、118、120、127、または130に対応する、1つまたは複数  
 のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80  
 ポリペプチドは、  
 N63S, L70Q, E81A, Y87N, A91G, S114T, I118V, T120S, I127T, および T130A

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様にお  
 いて、バリエーションCD80ポリペプチドは、  
 N63S, L70Q, E81A, Y87N, A91G, S114T, I118V, T120S, I127T, および T130A 50

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S,

10

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,

N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, または

L70Q/Y87N/A91G/T120S/I127T/T130A

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、例えばSEQ ID NO: 28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28のエクトドメインに対する親和性が向上しており、かつCTLA-4のエクトドメインに対する親和性が低下している。

20

#### 【0189】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置12、18、29、31、33、36、38、40、41、42、43、47、48、59、64、67、68、70、77、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、97、104、109、115、117、118、120、122、126、130、133、140、144、148、149、168、169、177、183、188または193に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、A12G, A12T, H18L, S21P, V22A, T28A,

30

R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, L40M, T41A, T41G, M42T, M43R, M47T, M43V, N48I, F59L, N64S, I67T, V68A, V68M, L70Q, E77K, E81V, L85R, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90N, A91G, A91T, F92P, F92Y, K93V, R94F, R94L, L97R, S103L, S103P, V104L, P109H, P109S, D115G, E117V, I118T, I118V, T120S, N122S, I126L, T130A, G133D, S140T, N144S, L148S, N149S, S168G, K169I, K169S, N177S, L183H, H188Q, R190S および Q193L

40

からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、R29D, R29H, Y31H, Y31L,

Q33H, K36G, M38I, T41A, T41G, M42T, M43R, M47T, I67T, L70Q, E81V, L85R, Y87N, E88G, K89E, K89N, D90N, A91G, A91T, F92P, K93V, R94L, P109S, I118T, I118V, T120S, N144S, L148S, および N149S

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

50



R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,

I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, または I67T/L70Q/A91G/T120S

である。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、  
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M,  
I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, A91G,

H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/N149S/R190S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/E117V/I118T/N149S/S168G/H188Q,

V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,

10

20

30

40

50

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N64S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94F/ I118T/T130A/N149S/K169I,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/D115G/I118T/T130A/G133D/N149S,  
T28A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/ V104L/T130A/N149S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L97R/N149S/H188Q, K89E/T130A, K89E/K93E/T130A,  
S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N48I/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T  
/F92P/K93V/R94L/S21P/ N48I/V68A/P109H/I126L/K169I,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/N149S,  
A12G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/ L97R/T130A/L183H,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/ I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I, または  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/T130A/N149S/K169I

10

20

30

40

である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、例えばSEQ ID NO: 28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、PD-L1のエクトドメインに対する親和性が向上しており、かつCTLA-4のエクトドメインに対する親和性が低下している。

#### 【0190】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、SEQ ID NO:28の位置70、81、87、91、または120に対応する、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換）を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、L70Q、Y87N、A91G、およびT120Sからなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、L70Q、Y87N、A91G

50

、およびT120S、ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、例えばSEQ ID NO:28、152、または372に示される配列を含む野生型または未改変CD80ポリペプチドと比較して、CD28のエクトドメインおよびPD-L1のエクトドメインに対する親和性が向上しており、かつCTLA-4のエクトドメインに対する親和性が低下している。

【0191】

### III. バリエーションポリペプチドのフォーマット

vIgDを含有する本明細書に提供されるバリエーションCD80を含む免疫調節ポリペプチドは、例えば、可溶性タンパク質、融合体もしくはコンジュゲート、膜結合型タンパク質、分泌タンパク質として、または感染性物質における送達のため、多種多様な方法でフォーマットされることができる。いくつかの態様において、特定のフォーマットを所望の治療用途向けに選択することができる。いくつかの場合では、バリエーションCD80ポリペプチドを含む免疫調節ポリペプチドは、その同族結合パートナー（例えば、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4）の活性に拮抗するかまたはそれを遮断するフォーマットで提供される。いくつかの態様において、CTLA-4に対する拮抗作用は、腫瘍における免疫を促進するのに有用であり得る。いくつかの態様において、CD28に対する拮抗作用は、炎症または自己免疫を治療するのに有用であり得る。いくつかの場合では、バリエーションCD80ポリペプチドを含む免疫調節ポリペプチドは、その同族結合パートナー（例えば、CD28、PD-L1、および/またはCTLA-4）の活性を作動させるまたは刺激するフォーマットで提供される。いくつかの態様において、CTLA-4に対する作動作用は、炎症または自己免疫を治療するのに有用であり得る。いくつかの態様において、CD28に対する作動作用は、腫瘍を治療するのに有用であり得る。当業者は、例えば1つまたは複数の特異的同族結合パートナーに拮抗するかまたはそれを作動させるための特定のフォーマットの活性を容易に決定することができる。そのような活性を評価するための例示的な方法は、実施例を含め、本明細書において提供される。

【0192】

いくつかの局面において、CD80のvIgDを含む免疫調節タンパク質であって、可溶性である、例えば、Fc鎖に融合されている該タンパク質が提供される。いくつかの局面において、1つまたは複数の追加のIgSFドメイン（例えば、1つまたは複数の追加のvIgD）は、本明細書において提供されるとおりのCD80のvIgDに連結され得る（本明細書で以降「スタック」または「スタックされた」免疫調節タンパク質と呼ばれる）。いくつかの態様において、提供される免疫調節タンパク質のモジュールフォーマットは、複数のカウンター構造体（複数の同族結合パートナー）の活性を調節するための、免疫調節タンパク質を改変または生成するためのフレキシビリティを提供する。いくつかの態様において、そのような「スタック」分子を、可溶性フォーマットで提供することができ、いくつかの場合では、膜結合または分泌タンパク質として提供してもよい。いくつかの態様において、バリエーションCD80免疫調節タンパク質は、例えば対象に投与されたときに、例えばvIgDを特定の環境または細胞に標的化または局在化するために、リガンド（例えば、抗原）に特異的に結合する標的化物質または部分（例えば、抗体または他の結合分子）に直接的または間接的に連結されたCD80のvIgDを含有するコンジュゲートとして提供される。いくつかの態様において、標的化物質、例えば、抗体または他の結合分子は、腫瘍抗原に結合し、それによってvIgDを含有するバリエーションCD80を腫瘍微小環境に局在化し、例えば、腫瘍微小環境に特異的な腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）の活性を調節する。

【0193】

いくつかの態様において、提供される免疫調節タンパク質は、細胞において発現され、かつ、改変細胞治療（ECT）の一部として提供される。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、細胞、例えば免疫細胞（例えば、T細胞または抗原提示細胞）において、膜結合形態で発現し、それによって、膜貫通型免疫調節タンパク質（本明細書で以降「TIP」とも呼ばれる）を提供する。いくつかの態様において、TIPによって認識さ

10

20

30

40

50

れる同族結合パートナーに応じて、TIPを発現する改変細胞は、他の改変細胞および/または内因性T細胞に陽性または陰性のいずれかの共刺激シグナルを提供することによって、同族結合パートナーを作動させることができる。いくつかの局面において、バリエーションCD80ポリペプチドは、細胞、例えば免疫細胞（例えば、T細胞または抗原提示細胞）において分泌形態で発現し、それによって、例えば細胞が対象に投与されたときに、分泌または可溶性形態のバリエーションCD80ポリペプチド（本明細書で以降「SIP」とも呼ばれる）を産生する。いくつかの局面において、SIPは、それが分泌される環境（例えば、腫瘍微小環境）において、同族結合パートナーに拮抗することができる。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、バリエーションポリペプチドのTIPまたはSIPとしての細胞中への送達または発現のために、対象への投与によって、細胞、例えば免疫細胞（例えば、T細胞または抗原提示細胞）にインビボで感染することができる感染性物質（例えば、ウイルス性または細菌性物質）中で発現される。

10

#### 【0194】

いくつかの態様において、可溶性免疫調節ポリペプチド、例えばvIgDを含有するバリエーションCD80は、提供されるコンジュゲートのいずれか1つまたは任意の組み合わせ（例えば、標的化部分）にそれ自体コンジュゲートされることができるリボソーム内にカプセル化されることができる。いくつかの態様において、本発明の可溶性または膜結合型免疫調節ポリペプチドは、脱グリコシル化されている。より具体的な態様において、バリエーションCD80配列が脱グリコシル化されている。さらにより具体的な態様において、バリエーションCD80のIgVおよび/またはIgC（例えば、IgC2）ドメインが脱グリコシル化されている。

20

#### 【0195】

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

#### 【0196】

##### A. 可溶性タンパク質

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドを含有する免疫調節タンパク質は、可溶性タンパク質である。当業者であれば、細胞表面タンパク質が、典型的には、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞外ドメイン（ECD）を有すること、ならびに、細胞外ドメインまたはその免疫学的に活性な配列を使用してそのようなタンパク質の可溶性形態を製造することができることを認識するだろう。したがって、いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドを含有する免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインまたは膜貫通ドメインの一部分を欠いている。いくつかの態様において、バリエーションCD80を含有する免疫調節タンパク質は、細胞内（細胞質）ドメインを欠いているか、または細胞内ドメインの一部分を欠いている。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドを含有する免疫調節タンパク質は、アミノ酸改変を含有するIgVドメインおよび/もしくはIgC（例えば、IgC2）ドメインまたはその特異的結合断片を含有するECDドメインまたはその一部分を含有するvIgD部分のみ含有する。

30

#### 【0197】

いくつかの態様において、バリエーションCD80を含む免疫調節ポリペプチドは、本発明の1つまたは複数のバリエーションCD80ポリペプチドを含むことができる。いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、正確に1、2、3、4、5つのバリエーションCD80配列を含む。いくつかの態様において、バリエーションCD80配列のうちの少なくとも2つは、同一のバリエーションCD80配列である。

40

#### 【0198】

いくつかの態様において、提供される免疫調節ポリペプチドは、CD80の2つ以上のvIgD配列を含む。ポリペプチド鎖内の複数のバリエーションCD80ポリペプチドは、互いに同一（すなわち、同種）または非同ー（すなわち、異種）のバリエーションCD80配列であることができる。単一のポリペプチド鎖の態様に加えて、いくつかの態様において、本発明のポリペプチドの2つ、3つ、4つ、またはより多くは、共有結合または非共有結合により互いに結合していてもよい。したがって、単量体、二量体、およびより高次の（例えば、3、4、5、またはより高次の）多量体タンパク質が本明細書において提供される。いくつかの態

50

様において、例えば正確に2つの本発明のポリペプチドが、共有結合または非共有結合により互いに結合して二量体を形成することができる。いくつかの態様において、結合は、鎖間システインジスルフィド結合を介してなされる。本発明の2つ以上のポリペプチドを含む組成物は、同一種もしくは実質的に同一種のポリペプチド（例えば、ホモ二量体）または非同一种のポリペプチド（例えば、ヘテロ二量体）の組成物であることができる。本発明の複数の連結されたポリペプチドを有する組成物は、上に述べたとおり、各ポリペプチド鎖に1つまたは複数の同一のまたは同一ではない本発明のバリエーションCD80ポリペプチドを有することができる。

【0199】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、免疫グロブリンFcに結合されたバリエーションCD80ポリペプチドを含む（「免疫調節Fc融合体」、例えば、CD80 vIgD-Fc融合体とも称される「バリエーションCD80-Fc融合体」をもたらす）。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドの結合は、FcのN末端における結合である。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドの結合は、FcのC末端における結合である。いくつかの態様において、2つ以上の（同じまたは異なる）CD80バリエーションポリペプチドが独立してN末端およびC末端に結合される。

【0200】

いくつかの態様において、Fcは、ネズミFcまたはヒトFcである。いくつかの態様において、Fcは、哺乳動物またはヒトのIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域である。いくつかの態様において、Fcは、IgG1、例えばヒトIgG1に由来する。いくつかの態様において、Fcは、SEQ ID NO:226に示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:226に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0201】

いくつかの態様において、Fc領域は、その正常な機能の1つまたは複数を変える（例えば、低減させる）別の改変を含有する。概して、Fc領域は、免疫グロブリンの主な機能である抗原結合能に加えてエフェクター機能、例えば補体依存性細胞傷害性（CDC）および抗体依存性細胞傷害性（ADCC）に関与する。追加的に、Fc領域に存在するFcRn配列は、インビボFcRn受容体への結合によってインビボ半減期を延長させることによって、血清中のIgGレベルを調節する役割を果たす。いくつかの態様において、そのような機能は、提供されるFc融合タンパク質と使用するために、Fcにおいて低減または改変されることができる。

【0202】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるCD80-Fcバリエーション融合体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸改変を導入し、それによってFc領域バリエーションを生成し得る。いくつかの態様において、Fc領域バリエーションは、エフェクター機能が低下している。エフェクター機能を変えることができるFc配列に対する変化または変異の多くの例がある。例えば、WO 00/42072、WO 2006019447、WO 2012125850、WO 2015/107026、US 2016/0017041およびShields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) は、FcRに対する結合性が改善されたまたは低下した例示的なFcバリエーションを記載している。それらの刊行物の内容は、参照によって具体的に本明細書に組み入れられる。

【0203】

いくつかの態様において、提供されるバリエーションCD80-Fc融合体は、CD80-Fcバリエーション融合体のインビボ半減期が重要であるが一定のエフェクター機能（例えば、CDCおよびADCC）が不要であるかまたは有害である用途のための望ましい候補となる、低下したエフェクター機能を示すFc領域を含む。インビトロおよび/またはインビボ細胞傷害性アッセイを実行して、CDCおよび/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを実行して、CD80-Fcバリエーション融合体がFcR結合を欠いている（よっておそらくADCC活性を欠いている）がFcRn結合能を保持している

ことを確かめることができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、Fc RI IIのみを発現するが、一方で、単球は、Fc RI、Fc RIIおよびFc RIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) の464ページの表3にまとめられている。関心対象の分子のADCC活性を評価するインビトロアッセイの非限定例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986) を参照のこと）およびHellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 米国特許第5,821,337号（Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987) を参照のこと）に記載されている。あるいは、非放射アッセイ法を採用してもよい（例えば、フローサイトメトリー用のACT1（商標）非放射細胞傷害性アッセイ（CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; および CytoTox 96（商標）非放射細胞毒性アッセイ（Promega, Madison, Wis.）を参照のこと）。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞を含む。代替的に、または追加的に、関心対象の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998) に開示されているものなどの動物モデルで評価してもよい。また、C1q結合アッセイを行って、CD80-Fcバリエーション融合体がC1qに結合できないこと、よってCDC活性を欠いていることを確認してもよい。例えば、WO 2006/029879およびWO 2005/100402におけるC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施してよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); および Cragg, M. S. and M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004) を参照のこと）。また、当技術分野において公知の方法を使用してFcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定を実施することもできる（例えば、Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006) を参照のこと）。

#### 【0204】

エフェクター機能が低下しているCD80-Fcバリエーション融合体には、EUナンバリングによるFc領域の残基238、265、269、270、297、327、および329のうちの1つまたは複数の置換を有するもの（米国特許第6,737,056号）が含まれる。そのようなFc変異体には、残基265および297がアラニンに置換されたいわゆる「DANA」Fc変異体（米国特許第7,332,581号）を含む、EUナンバリングによるアミノ酸位置265、269、270、297、および327のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体が含まれる。

#### 【0205】

いくつかの態様において、CD80-Fcバリエーション融合体のFc領域は、位置234、235、236、237、238、239、270、297、298、325、および329（EUナンバリングによって表示される）におけるアミノ酸のうちのいずれか1つまたは複数が天然Fc領域と比較して異なるアミノ酸で置換されている、Fc領域を有する。そのようなFc領域の改変は、上記の改変に限定されず、例えば、*Current Opinion in Biotechnology* (2009) 20 (6), 685-691に記載されている脱グリコシル化されている鎖（N297A および

N297Q）、IgG1-N297G, IgG1-L234A/L235A, IgG1-L234A/L235E/G237A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/ S267K, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, ならびに IgG4-L236E

等の改変；WO 2008/092117に記載されているG236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R、およびN325LL328Rのような改変；位置233、234、235、および237（EUナンバリングによって表示される）におけるアミノ酸挿入；ならびにWO 2000/04

2072に記載されている部位における改変を含む。

【0206】

FcRに対する結合性が改善されたまたは低下したある特定のFcバリエーションが記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号；WO 2004/056312、WO 2006019447およびShields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) を参照のこと）。

【0207】

いくつかの態様において、半減期を延長させるおよび/または新生児Fc受容体（FcRn）への結合を改善する1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションFc領域を含む、CD80-Fcバリエーション融合体が提供される。半減期が延長されたおよびFcRnに対する結合性が改善された抗体は、US2005/0014934A1（Hinton et al.）またはWO 2015107026に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つまたは複数の置換をその中に有するFc領域を含む。そのようなFcバリエーションは、EUナンバリングによるFc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434の1つまたは複数に置換、例えば、Fc領域の残基434の置換を有するもの（米国特許第7,371,826号）を含む。

10

【0208】

いくつかの態様において、CD80-Fcバリエーション融合体のFc領域は、1つまたは複数のアミノ酸置換E356DおよびM358Lを含む。いくつかの態様において、CD80-Fcバリエーション融合体のFc領域は、1つまたは複数のアミノ酸置換C220S、C226S、C229Sを含む。いくつかの態様において、CD80バリエーション融合体のFc領域は、1つまたは複数のアミノ酸置換R292CおよびV302Cを含む。また、Fc領域バリエーションの他の例に関して、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；およびWO 94/29351も参照されたい。

20

【0209】

いくつかの態様において、例えば、米国特許第6,194,551号、WO 99/51642、およびIdusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000) に記載されているとおり、低下したC1q結合および/または補体依存性細胞傷害性（CDC）をもたらす改変がFc領域でなされる。

【0210】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むバリエーションFc領域を含むCD80-Fcバリエーション融合体であって、バリエーションFc領域がIgG1、例えばヒトIgG1に由来する、CD80-Fcバリエーション融合体が提供される。いくつかの態様において、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:226に示されるアミノ酸配列に由来する。いくつかの態様において、Fcは、SEQ ID NO:226のナンバリングによるN82G（EUナンバリングによるN297Gに対応する）である少なくとも1つのアミノ酸置換を含有する。いくつかの態様において、Fcは、SEQ ID NO:226のナンバリングによるR77CまたはV87C（EUナンバリングによるR292CまたはV302Cに対応する）である少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含有する。いくつかの態様において、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:226のナンバリングによるC5S（EUナンバリングによるC220Sに対応する）アミノ酸改変をさらに含む。例えば、いくつかの態様において、バリエーションFc領域は、以下のアミノ酸改変を含む：SEQ ID NO:226を基準にN82Gおよびアミノ酸改変C5S、R77C、またはV87Cのうちの1つまたは複数。

30

40

【0211】

いくつかの態様において、バリエーションFc領域を含むCD80-Fcバリエーション融合体であって、バリエーションFcが、SEQ ID NO:389、392～394、および413のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO: 389、392～394、および413のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはより高い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、CD80-Fcバリエーション融合体が提供される。

50

## 【0212】

いくつかの態様において、Fcは、IgG2、例えばヒトIgG2に由来する。いくつかの態様において、Fcは、SEQ ID NO:227に示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:227に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはより高い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

## 【0213】

いくつかの態様において、Fcは、SEQ ID NO:411に示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:411に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはより高い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、IgG4 Fcは、ヒトIgG4のCH3ドメインがヒトIgG1のCH3ドメインで置換されておりかつ阻害された凝集体形成を示す安定化されたFc、ヒトIgG4のCH3およびCH2ドメインがそれぞれヒトIgG1のCH3およびCH2ドメインで置換されている抗体、またはヒトIgG4のKabatらによって提唱されているEUインデックスで示される位置409におけるアルギニンがリジンで置換されておりかつ阻害された凝集体形成を示す抗体である（例えば、米国特許第8,911,726号を参照のこと）。いくつかの態様において、Fcは、Fabアーム交換によって治療用抗体と内因性IgG4との間の組換えを防止すると示されている、S228P変異を含有するIgG4である（例えば、Labrijin et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27 (8) 767-771を参照のこと）。いくつかの態様において、Fcは、SEQ ID NO:412に示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:412に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはより高い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

## 【0214】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、Fc配列に直接連結されている。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、例えばリンカーを介して、Fc配列に間接的に連結されている。いくつかの態様において、1つまたは複数の「ペプチドリinker」がバリエーションCD80ポリペプチドとFcドメインを連結する。いくつかの態様において、ペプチドリinkerは、単一アミノ酸残基またはそれより大きい長さであることができる。いくつかの態様において、ペプチドリinkerは、少なくとも1つのアミノ酸残基を有するが、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸残基長より長くはない。いくつかの態様において、リンカーは、（一文字アミノ酸コードで）GGGGS（「4GS」）または4GSリンカーの多量体、例えば2つ、3つ、4つ、または5つの4GSリンカーの繰り返しである。

## 【0215】

いくつかの態様において、バリエーションCD80-Fc融合タンパク質は、Fcドメインに連結された2つのバリエーションCD80 Fcポリペプチドによって形成される二量体である。いくつかの具体的な態様において、同一または実質的に同一种（3またはより少ないN末端またはC末端アミノ酸配列差異を許す）のCD80-Fcバリエーション融合ポリペプチドは、二量体化されて、ホモ二量体を生み出す。いくつかの態様において、二量体は、2つのバリエーションCD80 Fcポリペプチドが同じであるホモ二量体である。あるいは、異なる種のCD80-Fc バリエーション融合ポリペプチドは、二量体化されて、ヘテロ二量体を生成することができる。したがって、いくつかの態様において、二量体は、2つのバリエーションCD80 Fcポリペプチドが異なるヘテロ二量体である。

## 【0216】

また、バリエーションCD80-Fc融合タンパク質をコードする核酸分子が提供される。いくつかの態様において、Fc融合タンパク質の産生のために、バリエーションCD80-Fc融合タンパク質をコードする核酸分子が適切な発現ベクター内に挿入される。得られたバリエーションCD80-Fc融合タンパク質を、発現で形質転換された宿主細胞中で発現させることができ、そこで、Fc部分間で形成された鎖間ジスルフィド結合によってFcドメイン間のアセンブリが起こって、二価のバリエーションCD80-Fc融合タンパク質のような二量体が生成する。



## 【0217】

得られたFc融合タンパク質を、プロテインAまたはプロテインGカラム上での親和性クロマトグラフィーによって容易に精製することができる。ヘテロ二量体の生成のために、精製のための追加の工程が必要である可能性がある。例えば、異なるバリエーションCD80ポリペプチドをコードする2つの核酸で細胞を形質転換する場合、Fcドメインを担持するバリエーションCD80分子が同じくジスルフィド連結されたホモ二量体として発現するので、ヘテロ二量体の形成は、生化学的に達成されなければならない。したがって、ホモ二量体は、鎖間ジスルフィドの破壊が有利に働く条件下で低減されることができるが、鎖間ジスルフィドには影響を及ぼさない。いくつかの場合では、異なるバリエーションCD80 Fc単量体を、当量で混合し、酸化して、ホモ二量体とヘテロ二量体の混合物を形成する。この混合物の成分は、クロマトグラフ技術によって分離される。あるいは、このタイプのヘテロ二量体の形成は、下記のノブイントゥーホール (knob-into-hole) 法を使用してバリエーションCD80ポリペプチドを含有するFc融合分子を遺伝子改変および発現させることによって、バイアスを掛けることができる。

10

## 【0218】

## B. 追加のIgSFドメインを有するスタック分子

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、1つまたは複数の他の免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) ドメインに直接的または間接的に連結された本明細書において提供されるバリエーションCD80ポリペプチドのいずれかを含有することができる (「スタックされた」免疫調節タンパク質構築物、また「II型」免疫調節タンパク質とも呼ばれる)。いくつかの局面において、これは、2つ以上、例えば3つ以上の同族結合パートナーと結合することによって免疫シナプスの多標的化調節を提供する、固有のマルチドメイン免疫調節タンパク質を作製することができる。

20

## 【0219】

いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、バリエーションCD80ドメインと野生型IgSFファミリーメンバーに見いだされない別のIgSFファミリーメンバー (例えば、哺乳動物IgSFファミリーメンバー) の、1つまたは複数の他の親和性が改変されたおよび/または親和性が改変されていないIgSFドメイン配列との組み合わせ (「非野生型組み合わせ」) および/または配置 (「非野生型配置」または「非野生型順列 (permutation)」) を含む。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) ドメインを含有し、そこで、IgSFドメインの少なくとも1つは、提供される説明に係るバリエーションCD80 IgSFドメイン (CD80のvIgD) である。

30

## 【0220】

いくつかの態様において、追加のIgSFドメインの配列は、野生型または未改変IgSFドメインと比較して1つまたは複数のアミノ酸改変 (例えば、置換) を含有する、改変されたIgSFドメインであることができる。いくつかの態様において、IgSFドメインは、親和性が改変されていなくてもよい (例えば、野生型)、親和性が改変されていてもよい。いくつかの態様において、未改変または野生型IgSFドメインは、マウス、ラット、カニクイザル、もしくはヒト起源、またはそれらの組み合わせ由来であることができる。いくつかの態様において、追加のIgSFドメインは、表2に示されるIgSFファミリーメンバーのIgSFドメインであることができる。いくつかの態様において、追加のIgSFドメインは、表2に示されるIgSFファミリーメンバーに含有されるIgSFドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変 (例えば、置換) を含有する親和性改変IgSFドメインであることができる。

40

## 【0221】

いくつかの態様において、追加のIgSFドメインは、以下から選択されるファミリーのIgSFファミリーメンバーに含有される、親和性が改変されたまたは改変されていないIgSFドメインである: シグナル制御タンパク質 (SIRP) ファミリー、骨髄細胞に発現するトリガー受容体様 (TREML) ファミリー、がん胎児性抗原関連細胞接着分子 (CEACAM) ファミリー、シアル酸結合Ig様レクチン (SIGLEC) ファミリー、ブチロフィリンファミリー

50

、B7ファミリー、CD28ファミリー、Vセットおよび免疫グロブリンドメイン含有（VSIG）ファミリー、Vセット膜貫通ドメイン（VSTM）ファミリー、主要組織適合複合体（MHC）ファミリー、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAM）ファミリー、白血球免疫グロブリン様受容体（LIR）、ネクチン（Nec）ファミリー、ネクチン様（NECL）ファミリー、ポリオウイルス受容体関連（PVR）ファミリー、天然細胞傷害誘発受容体（NCR）ファミリー、T細胞免疫グロブリンおよびムチン（TIM）ファミリー、またはキラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）ファミリー。いくつかの態様において、追加のIgSFドメインは独立して、CD80（B7-1）、CD86（B7-2）、CD274（PD-L1、B7-H1）、PDCD1LG2（PD-L2、CD273）、ICOSLG（B7RP1、CD275、ICOSL、B7-H2）、CD276（B7-H3）、VTCN1（B7-H4）、CD28、CTLA4、PDCD1（PD-1）、ICOS、BTLA（CD272）、CD4、CD8A（CD8）、CD8B（CD8）、LAG3、HAVCR2（TIM-3）、CEACAM1、TIGIT、PVR（CD155）、PVRL2（CD112）、CD226、CD2、CD160、CD200、CD200R1（CD200R）、およびNC R3（NKP30）からなる群より選択されるIgSFタンパク質に由来する。

#### 【0222】

表2の1列目は、その特定のIgSFメンバーについての名称および場合によりいくつかの可能な別名を提供する。2列目は、uniprot.orgでインターネットを介してアクセス可能な公表されているデータベースである、UniProtKBデータベースのタンパク質識別子を提供し、場合によってはGenBank番号を提供する。Universal Protein Resource（UniProt）は、タンパク質配列および注釈データ用の包括的リソースである。UniProtデータベースは、UniProt Knowledgebase（UniProtKB）を含む。UniProtは、欧州バイオインフォマティクス研究所（European Bioinformatics Institute）（EMBL-EBI）、SIBスイスバイオインフォマティクス研究所（SIB Swiss Institute of Bioinformatics）とタンパク質情報リソース（Protein Information Resource）（PIR）の間の共同組織であり、米国国立保健研究所（U.S. National Institutes of Health（NIH））の助成金によって主に支援されている。GenBankは、NIHの遺伝子配列データベースであり、全ての公に入手可能なDNA配列が注釈付きで集められている（Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41(D1):D36-42）。3列目は、表示のIgSFドメインが位置している領域を提供する。該領域は、ドメインが範囲を規定している残基を包含する範囲として特定される。3列目はまた、特定されたIgSF領域のIgSFドメインクラスを示す。4列目は、表示の追加のドメインが位置している領域を提供する（シグナルペプチド、S；細胞外ドメイン、E；膜貫通ドメイン、T；細胞質ドメイン、C）。ドメインの記載は、当該ドメインの同定または分類に用いた方法に応じて異なりうることを、および異なる源から別々に同定されうることを理解されたい。表2のドメインに対応する残基の記載は、例示的なものにすぎず、アミノ酸数個（例えば、1個、2個、3個、または4個）分長いまたは短い場合がある。5列目は、列挙されたIgSFメンバーのうちのいくつか（すなわち、その細胞表面同族結合パートナーのうちのいくつか）を示す。

#### 【0223】

（表2）本開示のIgSFメンバー

10

20

30

40

50

IgSF メンバー (別名)	UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF 領域 &ドメイン クラス	他の ドメイン	細胞表面 同族結合 パートナー	IgSF メンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
CD80 (B7-1)	NP_005182.1  P33681	35-135, 35-138, 37-138,または 35-141 IgV, 145-230または 154-232 IgC	S: 1-34, E: 35-242, T: 243-263, C: 264-288	CD28, CTLA-4, PD-L1	SEQ ID NO: 1 (35-288)	SEQ ID NO: 253	SEQ ID NO: 28
CD86 (B7-2)	P42081.2	33-131 IgV, 150-225 IgC2	S: 1-23, E: 24-247, T: 248-268, C: 269-329	CD28, CTLA-4	SEQ ID NO: 2 (24-329)	SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 29
CD274 (PD-L1, B7-H1)	Q9NZQ7.1	24-130 IgV, 133-225 IgC2	S: 1-18, E: 19-238, T: 239-259, C: 260-290	PD-1, B7-1	SEQ ID NO: 3 (19-290)	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 30
PDCD1LG 2 (PD-L2, CD273)	Q9BQ51.2	21-118 IgV, 122-203 IgC2	S: 1-19, E: 20-220, T: 221-241, C: 242-273	PD-1, RGMb	SEQ ID NO: 4 (20-273)	SEQ ID NO: 256	SEQ ID NO: 31

10

20

30

40

50

IgSF メンバー (別名)	UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF 領域 &ドメイン クラス	他の ドメイン	細胞表面 同族結合 パートナー	IgSF メンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)	O75144.2	19-129 IgV, 141-227 IgC2	S: 1-18, E: 19-256, T: 257-277, C: 278-302	ICOS, CD28, CTLA-4	SEQ ID NO: 5 (19-302)	SEQ ID NO: 257	SEQ ID NO: 32
CD276 (B7-H3)	Q5ZPR3.1	29-139 IgV, 145-238 IgC2, 243-357 IgV, 367-453 IgC	S: 1-28, E: 29-466, T: 467-487, C: 488-534		SEQ ID NO: 6 (29-534)	SEQ ID NO: 258	SEQ ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3.1	35-146 IgV, 153-241 IgV	S: 1-24, E: 25-259, T: 260-280, C: 281-282		SEQ ID NO: 7 (25-282)	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 34
CD28	P10747.1	28-137 IgV	S: 1-18, E: 19-152, T: 153-179, C: 180-220	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 8 (19-220)	SEQ ID NO: 260	SEQ ID NO: 35
CTLA-4	P16410.3	39-140 IgV	S: 1-35, E: 36-161, T: 162-182, C: 183-223	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 9 (36-223)	SEQ ID NO: 261	SEQ ID NO: 36
PDCD1 (PD-1)	Q15116.3	35-145 IgV	S: 1-20, E: 21-170, T: 171-191, C: 192-288	PD-L1, PD-L2	SEQ ID NO: 10 (21-288)	SEQ ID NO: 262	SEQ ID NO: 37
ICOS	Q9Y6W8.1	30-132 IgV	S: 1-20, E: 21-140, T: 141-161, C: 162-199	B7RP1	SEQ ID NO: 11 (21-199)	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 38
BTLA (CD272)	Q7Z6A9.3	31-132 IgV	S: 1-30, E: 31-157, T: 158-178, C: 179-289	HVEM	SEQ ID NO: 12 (31-289)	SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 39
CD4	P01730.1	26-125 IgV, 126-203 IgC2, 204-317 IgC2, 317-389 IgC2	S: 1-25, E: 26-396, T: 397-418, C: 419-458	MHC クラス II	SEQ ID NO: 13 (26-458)	SEQ ID NO: 265	SEQ ID NO: 40
CD8A (CD8- $\alpha$ )	P01732.1	22-135 IgV	S: 1-21, E: 22-182, T: 183-203, C: 204-235	MHC クラス I	SEQ ID NO: 14 (22-235)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 41
CD8B (CD8- $\beta$ )	P10966.1	22-132 IgV	S: 1-21, E: 22-170, T: 171-191, C: 192-210	MHC クラス I	SEQ ID NO: 15 (22-210)	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 42

10

20

30

40

50

IgSF メンバー (別名)	UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF 領域 &ドメイン クラス	他の ドメイン	細胞表面 同族結合 パートナー	IgSF メンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
LAG3	P18627.5	37-167 IgV, 168-252 IgC2, 265-343 IgC2, 349-419 IgC2	S: 1-28, E: 29-450, T: 451-471, C: 472-525	MHC クラス II	SEQ ID NO: 16 (29-525)	SEQ ID NO: 268	SEQ ID NO: 43
HAVCR2 (TIM-3)	Q8TDQ0.3	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-202, T: 203-223, C: 224-301	CEACAM-1, ホスファチジル セリン,ガレクチン -9,HMGB1	SEQ ID NO: 17 (22-301)	SEQ ID NO: 269	SEQ ID NO: 44
CEACAM 1	P13688.2	35-142 IgV, 145-232 IgC2, 237-317 IgC2, 323-413 IgC	S: 1-34, E: 35-428, T: 429-452, C: 453-526	TIM-3	SEQ ID NO: 18 (35-526)	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 45
TIGIT	Q495A1.1	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-141, T: 142-162, C: 163-244	CD155, CD112	SEQ ID NO: 19 (22-244)	SEQ ID NO: 271	SEQ ID NO: 46
PVR (CD155)	P15151.2	24-139 IgV, 145-237 IgC2, 244-328 IgC2	S: 1-20, E: 21-343, T: 344-367, C: 368-417	TIGIT, CD226, CD96, ポリオウイルス	SEQ ID NO: 20 (21-417)	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 47
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32-156 IgV, 162-256 IgC2, 261-345 IgC2	S: 1-31, E: 32-360, T: 361-381, C: 382-538	TIGIT, CD226, CD112R	SEQ ID NO: 21 (32-538)	SEQ ID NO: 273	SEQ ID NO: 48
CD226	Q15762.2	19-126 IgC2, 135-239 IgC2	S: 1-18, E: 19-254, T: 255-275, C: 276-336	CD155, CD112	SEQ ID NO: 22 (19-336)	SEQ ID NO: 274	SEQ ID NO: 49
CD2	P06729.2	25-128 IgV, 129-209 IgC2	S: 1-24, E: 25-209, T: 210-235, C: 236-351	CD58	SEQ ID NO: 23 (25-351)	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 50
CD160	O95971.1	27-122 IgV	S: 1-26 E: 27-122	HVEM, MHC ファミリーの タンパク質	SEQ ID NO: 24 (27-159)	SEQ ID NO: 276	SEQ ID NO: 51
CD200	P41217.4	31-141 IgV, 142-232 IgC2	S: 1-30, E: 31-232, T: 233-259, C: 260-278	CD200R	SEQ ID NO: 25 (31-278)	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 52
CD200R1 (CD200R)	Q8TD46.2	53-139 IgV, 140-228 IgC2	S: 1-28, E: 29-243, T: 244-264, C: 265-325	CD200	SEQ ID NO: 26 (29-325)	SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 53

10

20

30

40

50

IgSF メンバー (別名)	UniProtKB タンパク質 識別子	IgSF 領域 &ドメイン クラス	他の ドメイン	細胞表面 同族結合 パートナー	IgSF メンバーアミノ酸配列 (SEQ ID NO)		
					前駆体 (成熟残基)	成熟	ECD
NCR3 (NKp30)	O14931.1	19-126 IgC-様	S: 1-18, E: 19-135, T: 136-156, C: 157-201	B7-H6	SEQ ID NO:27 (19-201)	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 54
VSIG8	Q5VU13	22-141 IgV 1 146-257 IgV 2	S: 1-21 E: 22-263 T: 264-284 C: 285-414	VISTA	SEQ ID NO: 348 (22-414)	SEQ ID NO: 349	SEQ ID NO: 350

10

## 【 0 2 2 4 】

「スタックされた」免疫調節タンパク質構築物に存在するそのような親和性が改変されていないまたは親和性が改変されたIgSFドメイン（非野生型組み合わせまたは非野生型配置にかかわらず）の数は、少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つ、そして、いくつかの態様において、正確に2つ、3つ、4つ、または5つのIgSFドメインである（それによって、親和性改変IgSFドメインの数の決定は、あらゆるその非特異的結合分割配列および/または実質的に免疫学的に不活性なその分割配列を無視する）。

20

## 【 0 2 2 5 】

本明細書において提供されるスタックされた免疫調節タンパク質のいくつかの態様において、IgSFドメインの数は、少なくとも2つであり、ここで、親和性改変IgSFドメインの数および親和性が改変されていないIgSFドメインの数は、各々独立して、少なくとも0、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つである。したがって、親和性改変IgSFドメインの数および親和性が改変されていないIgSFドメインの数はそれぞれ（親和性改変IgSFドメイン：親和性が改変されていないIgSFドメイン）、正確にまたは少なくとも2:0（親和性改変された：野生型）、0:2、2:1、1:2、2:2、2:3、3:2、2:4、4:2、1:1、1:3、3:1、1:4、4:1、1:5、または5:1であることができる。

## 【 0 2 2 6 】

スタックされた免疫調節タンパク質のいくつかの態様において、親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインの少なくとも2つは、同一のIgSFドメインである。

30

## 【 0 2 2 7 】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるスタックされた免疫調節タンパク質は、単一のIgSFメンバー由来であるが非野生型配置（あるいは、「順列」）の、少なくとも2つの親和性が改変されたおよび/または親和性が改変されていないIgSFドメインを含む。非野生型配置または順列の1つの実例は、IgSFドメイン配列が本明細書において提供されるとおりのバリエーションIgSFドメインの供給源として役立つ野生型CD80に見いだされるものと比べて、非野生型系列の親和性が改変されたおよび/または親和性が改変されていないIgSFドメイン配列を含む本発明の免疫調節タンパク質である。したがって、一例では、免疫調節タンパク質は、親和性が改変されていない形態および/または親和性が改変されている形態にかかわらず、膜貫通ドメインの近位にあるIgVおよび膜貫通ドメインの遠位にあるIgCを含むことができる。また、親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインの非野生型組み合わせおよび非野生型配置の両方が本明細書において提供される免疫調節タンパク質に存在することも、提供される主題の範囲内である。

40

## 【 0 2 2 8 】

スタックされた免疫調節タンパク質のいくつかの態様において、親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインは、同一ではない（すなわち、

50

異なる) IgSFドメインである。同一ではない親和性改変IgSFドメインは、特異的結合条件下で、異なる同族結合パートナーと特異的に結合し、かつ、これらが改変される野生型または未改変IgSFドメインが同じあったか否かに関係なく「非同一」である。したがって、例えば、免疫調節タンパク質における少なくとも2つの同一ではないIgSFドメインの非野生型組み合わせは、起源が1つのCD80に由来しかつ固有である少なくとも1つのIgSFドメイン配列、および、起源がCD80ではない別のIgSFファミリーメンバーに由来しかつ固有である第二のIgSFドメイン配列の少なくとも1つを含むことができ、ここで、免疫調節タンパク質のIgSFドメインは、親和性が改変されていない形態および/または親和性が改変されている形態である。しかしながら、代替態様において、2つの同一ではないIgSFドメインは、同じIgSFドメイン配列を起源とするが、少なくとも1つは、これらが異なる同族結合パートナーに特異的に結合するように親和性が改変されている。

10

#### 【0229】

いくつかの態様において、提供される免疫調節タンパク質は、バリエーションCD80ポリペプチドを含有することに加えて、少なくとも2、3、4、5または6つの追加の免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメイン(例えば、表2に示されているIgSFファミリーメンバーのIgDドメイン)も含有する。いくつかの態様において、提供される免疫調節タンパク質は、少なくとも1つの追加のIgSFドメイン(例えば、第二のIgSFドメイン)を含有し、当該少なくとも1つの追加のまたは第二のIgSFドメインは、SEQ ID NO:1~27および348のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列に含有される野生型または未改変IgSFドメインまたはその特異的結合断片に示されるIgSFドメインである。いくつかの態様において、野生型または未改変IgSFドメインは、IgVドメインまたはIgCドメイン、例えばIgC1またはIgC2ドメインである。

20

#### 【0230】

いくつかの態様において、提供される免疫調節タンパク質はまた、バリエーションCD80ポリペプチドを含有することに加えて、野生型または未改変IgSFドメイン内のIgSFドメイン、例えば表2に示されるIgSFファミリーメンバー内のIgSFドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換、欠失または変異)を含有するvIgDである、少なくとも1つの追加のIgSFドメイン(例えば、第二のIgSFドメイン)を含有する。いくつかの態様において、追加のまたは第二の親和性が改変されたIgSFドメインは、SEQ ID NO:1~27および348のいずれかに示されるアミノ酸配列に含有される野生型または未改変IgSFドメインまたはその特異的結合断片に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはより高い配列同一性を含む。いくつかの態様において、野生型または未改変IgSFドメインは、IgVドメインまたはIgCドメイン、例えばIgC1またはIgC2ドメインである。いくつかの態様において、追加のまたは第二のIgSFドメインは、親和性が改変されたIgVドメインまたはIgCドメインである。

30

#### 【0231】

いくつかの態様において、1つまたは複数の追加のIgSFドメイン(例えば、第二のIgSFドメイン)は、腫瘍抗原と結合するかまたは腫瘍抗原を認識する別のIgSFファミリーメンバーのIgSFドメイン(例えば、IgV)である。そのような態様において、IgSFファミリーメンバーは、腫瘍局在化部分として役立ち、それによってCD80のvIgDを腫瘍微小環境内で免疫細胞に極めて接近させる。いくつかの態様において、追加のIgSFドメイン(例えば、第二のIgSFドメイン)は、腫瘍細胞上に発現されるB7-H6と結合するかまたはB7-H6を認識するNkp30のIgSFドメインである。いくつかの態様において、少なくとも1つの追加の(例えば、第二の)IgSFドメイン、例えばNkp30は、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば、置換、欠失、または付加)を含有するvIgDである。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変は、B7-H6に対する結合親和性および/または選択性を、未改変IgSFドメイン(例えば、Nkp30)と比較して、例えば、少なくともまたは少なくとも約1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍向上させる。中でも、例示的なポリペプチドは、SEQ ID NO:54に示さ

40

50

れる位置に対応するNKp30細胞外ドメインの位置を基準に変異L30V/A60V/S64P/S86Gを含有する、NKp30バリエーションである。

【 0 2 3 2 】

表3～5は、本明細書に提供されるスタック構築物において使用することができる1つまたは複数の親和性が改変されたIgSFドメインを含有する例示的なポリペプチドを提供する。

【 0 2 3 3 】

( 表 3 ) 例示的なバリエーションICOSLポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	32	196
N52S	109	197
N52H	110	198
N52D	111	199
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	200
N52H/N57Y/Q100P	113	201
N52S/Y146C/Y152C	114	
N52H/C198R	115	
N52H/C140D/T225A	116	
N52H/C198R/T225A	117	
N52H/K92R	118	202
N52H/S99G	119	203
N52Y	120	204
N57Y	121	205
N57Y/Q100P	122	206
N52S/S130G/Y152C	123	
N52S/Y152C	124	
N52S/C198R	125	
N52Y/N57Y/Y152C	126	
N52Y/N57Y/H129P/C198R	127	
N52H/L161P/C198R	128	
N52S/T113E	129	
S54A	130	207
N52D/S54P	131	208
N52K/L208P	132	209
N52S/Y152H	133	
N52D/V151A	134	
N52H/I143T	135	
N52S/L80P	136	210
F120S/Y152H/N201S	137	
N52S/R75Q/L203P	138	211
N52S/D158G	139	
N52D/Q133H	140	
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R	141	212
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	142	213
N52S/G103E	239	240
N52H/C140del/T225A	478	

【 0 2 3 4 】

( 表 4 ) 例示的なバリエーションNKp30ポリペプチド

10

20

30

40

50



変異	ECD SEQ ID NO	IgC-様ドメイン SEQ ID NO
野生型	54	214
L30V/A60V/S64P/S86G	143	215
L30V	144	216
A60V	145	217
S64P	146	218
S86G	147	219

## 【 0 2 3 5 】

(表5) 例示的なバリエーションCD86ポリペプチド

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	29	220
Q35H/H90L/Q102H	148	221
Q35H	149	222
H90L	150	223
Q102H	151	224

## 【 0 2 3 6 】

いくつかの態様において、CD80のvIgDおよび別のIgSFファミリーメンバー由来の1つまたは複数の追加のIgSFドメイン（例えば、第二のバリエーションIgSFドメイン）を含む、2つ以上のIgSFドメインは、共有結合または非共有結合により連結されている。スタックされた免疫調節タンパク質ポリペプチド鎖内の複数の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されたIgSFドメインは、互いに直接共有結合により連結されている必要はない。いくつかの態様において、2つ以上のIgSFドメインは、直接的に、または、例えばリンカーを介して間接的に連結されている。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸残基の介在範囲は、IgSFドメインを互いに間接的に共有結合させる。連結は、N末端からC末端の残基を介するものであることができる。いくつかの態様において、連結は、IgSFドメインのN末端またはC末端に位置していないアミノ酸残基の側鎖を介してなされることができる。したがって、連結は、末端もしくは内部アミノ酸残基またはその組み合わせを介してなされることができる。

## 【 0 2 3 7 】

いくつかの態様において、1つまたは複数の「ペプチドリンカー」が、CD80のvIgDと追加のIgSFドメイン（例えば、第二のバリエーションIgSFドメイン）とを連結させる。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、単一アミノ酸残基またはそれより大きい長さであることができる。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのアミノ酸残基を有するが、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸残基長より長くはない。いくつかの態様において、リンカーは（一文字アミノ酸コードで）：GGGGS（「4GS」）または4GSリンカーの多量体、例えば2、3、4、または5つの4GSリンカーの繰り返しである。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、（GGGGS）<sub>2</sub>または（GGGGS）<sub>3</sub>である。いくつかの態様において、リンカーはまた、一連のアラニン残基を、単独でまたは別のペプチドリンカー（例えば、4GSリンカーまたはその多量体）に加えて含むことができる。いくつかの態様において、各々の一連のアラニン残基の数は、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアラニンである。

## 【 0 2 3 8 】

いくつかの態様において、親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されたIgSFドメインは、第一および/または第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されたIgSFドメインのN末端および/またはC末端に挿入された「野生型ペプチド

リンカー」によって連結されている。これらのリンカーは、リーディング配列（親和性が改変されていないまたは親和性が改変されたIgSFドメインのN末端）またはトレーリング配列（親和性が改変されていないまたは親和性が改変されたIgSFドメインのC末端）、およびIgSFのIgフォールドの構造予測のすぐ外側に及ぶ野生型に存在する配列とも呼ばれる。いくつかの態様において、「野生型リンカー」は、野生型タンパク質のアミノ酸配列における、シグナル配列の後であるが、IgSFドメイン（例えば画定されたIgVドメイン）の前に存在する、アミノ酸配列である。いくつかの態様において、「野生型」リンカーは、野生型タンパク質のアミノ酸配列における、IgSFドメインの直後（例えば画定されたIgVドメインの直後）であるがIgCドメインの前に存在する、アミノ酸配列である。これらのリンカー配列は、隣接するIgSFドメインの適切なフォールディングおよび機能に寄与することができる。いくつかの態様において、第一のIgSFドメインのN末端に挿入されたリーディングペプチドリンカー、ならびに/または、第一の親和性が改変されていないおよび/もしくは親和性が改変されているIgSFドメインのC末端に挿入されたトレーリング配列が存在する。いくつかの態様において、第二のIgSFドメインのN末端に挿入された第二のリーディングペプチドリンカー、ならびに/または、第二の親和性が改変されていないおよび/もしくは親和性が改変されているIgSFドメインのC末端に挿入された第二のトレーリング配列が存在する。第一および第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが同じ親タンパク質に由来しかつ同じ配向で接続されるとき、第一および第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメイン間の野生型ペプチドリンカーは重複しない。例えば、第一のトレーリング野生型ペプチドリンカーおよび第二のリーディング野生型ペプチドリンカーが同じであるとき、II型免疫調節タンパク質は、第一のトレーリング野生型ペプチドリンカーも第二のリーディング野生型ペプチドリンカーも含まない。

#### 【0239】

いくつかの態様において、II型免疫調節タンパク質は、第一の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインのN末端に挿入された第一のリーディング野生型ペプチドリンカーを含み、ここで、第一のリーディング野生型ペプチドリンカーは、第一の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列由来の少なくとも5つ（例えば、少なくともおよそ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のいずれか）の連続アミノ酸を親IgSFドメインと直前のドメイン（例えば、シグナルペプチドまたはIgSFドメイン）との間に含む。いくつかの態様において、第一のリーディング野生型ペプチドリンカーは、第一の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列全体を親IgSFドメインと直前のドメイン（例えば、シグナルペプチドまたはIgSFドメイン）との間に含む。

#### 【0240】

いくつかの態様において、II型免疫調節タンパク質は、第一の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインのC末端に挿入された第一のトレーリング野生型ペプチドリンカーをさらに含み、ここで、第一のトレーリング野生型ペプチドリンカーは、第一の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列由来の少なくとも5つ（例えば、少なくともおよそ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のいずれか）の連続アミノ酸を親IgSFドメインと直後のドメイン（例えば、IgSFドメインまたは膜貫通ドメイン）との間に含む。いくつかの態様において、第一のトレーリング野生型ペプチドリンカーは、第一の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列全体を親IgSFドメインと直後のドメイン（例えば、IgSFドメインまたは膜貫通ドメイン）との間に含む。

#### 【0241】

いくつかの態様において、II型免疫調節タンパク質は、第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインのN末端に挿入された第二のリーデ

10

20

30

40

50

ィング野生型ペプチドリンカーをさらに含み、ここで、第二のリーディング野生型ペプチドリンカーは、第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列由来の少なくとも5つ（例えば、少なくともおよそ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のいずれか）の連続アミノ酸を親IgSFドメインと直前のドメイン（例えば、シグナルペプチドまたはIgSFドメイン）との間に含む。いくつかの態様において、第二のリーディング野生型ペプチドリンカーは、第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列全体を親IgSFドメインと直前のドメイン（例えば、シグナルペプチドまたはIgSFドメイン）との間に含む。

【0242】

いくつかの態様において、II型免疫調節タンパク質は、第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインのC末端に挿入された第二のトレーリング野生型ペプチドリンカーをさらに含み、ここで、第二のトレーリング野生型ペプチドリンカーは、第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列由来の少なくとも5つ（例えば、少なくともおよそ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のいずれか）の連続アミノ酸を親IgSFドメインと直後のドメイン（例えば、IgSFドメインまたは膜貫通ドメイン）との間に含む。いくつかの態様において、第二のトレーリング野生型ペプチドリンカーは、第二の親和性が改変されていないおよび/または親和性が改変されているIgSFドメインが由来する野生型タンパク質中の介在配列全体を親IgSFドメインと直後のドメイン（例えば、IgSFドメインまたは膜貫通ドメイン）との間に含む。

【0243】

CD80 IgSFドメインを含有するII型タンパク質についての例示的なトレーリング配列は、SEQ ID NO:232に示されるアミノ酸配列を含有し得る。CD80 IgSFドメインを含有するII型タンパク質についての例示的なトレーリング配列は、SEQ ID NO:231、232、および371に示される。ICOSL IgSFドメインを含有するII型タンパク質についての例示的なトレーリング配列は、SEQ ID NO:233および234に示される。CD86 IgSFドメインを含有するII型タンパク質についての例示的なリーディング配列およびトレーリング配列は、SEQ ID NO:236～238に示される。NKp30 IgSFドメインを含有するII型タンパク質についての例示的なトレーリング配列は、SEQ ID NO:235に示される。

【0244】

いくつかの態様において、CD80のvIgDおよび別のIgSFファミリーメンバー由来の1つまたは複数の追加のIgSFドメイン（例えば、第二のバリエーションIgSFドメイン）を含む、2つ以上のIgSFドメインは、Fcに連結または結合されて、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質を形成する。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドおよび第二のIgSFドメインは、独立して、直接的または間接的に、FcサブユニットのN末端またはC末端に連結されている。いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドおよび第二のIgSFドメインが直接的または間接的に連結されており、かつ、バリエーションCD80または第二のIgSFドメインのうちの1つもまた直接的または間接的にFcサブユニットのN末端またはC末端に連結されている。いくつかの態様において、Fcへの連結は、ペプチドリンカー（例えば、上記のようなペプチドリンカー）を介した連結である。いくつかの態様において、バリエーションCD80と第二のIgSFドメインとの間の連結は、ペプチドリンカー（例えば、上記のようなペプチドリンカー）を介した連結である。いくつかの態様において、CD80のvIgD、1つまたは複数の追加のIgSFドメイン、およびFcドメインは、図4に示されるとおりの多数の配置のいずれかで一緒に連結されていることができる。例示的な配置が実施例に記載されている。

【0245】

いくつかの態様において、スタックされた免疫調節タンパク質は、2つのスタックされた免疫調節Fc融合ポリペプチドによって形成される二量体である。また、スタックされた免疫調節タンパク質のいずれかをコードする核酸分子も提供される。いくつかの態様にお

10

20

30

40

50

いて、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質を、二量体Fc融合タンパク質の生成に従って、例えば上記のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドの、発現によって、またはいくつかの場合では、共発現によって、細胞で産生させることができる。

【0246】

いくつかの態様において、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質は、各Fcサブユニットが二価、各サブユニットが一価、または一方のサブユニットが二価および他方が四価である。

【0247】

いくつかの態様において、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質は、ホモ二量体マルチドメインスタックFcタンパク質である。いくつかの態様において、二量体マルチドメインスタック免疫調節タンパク質は、第一のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドおよび第二のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチド（該第一および第二のポリペプチドは同じである）を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドのFc部分は、上記のような任意のFcであることができる。

【0248】

いくつかの態様において、マルチドメインスタック分子は、2つの異なるFcポリペプチドを含むヘテロ二量体であって、少なくとも1つが、少なくとも1つのバリエーションCD80ポリペプチドおよび/または少なくとも1つの第二のIgSFドメイン（例えば、第二のバリエーションIgSFドメイン）を含有するFcポリペプチドである、ヘテロ二量体である。いくつかの態様において、マルチドメインスタック分子は、バリエーションCD80および第二のIgSFドメインを含有する第一のFcポリペプチドならびにバリエーションCD80および第二のIgSFドメインを含有する第二のFcポリペプチドを含有する。いくつかの態様において、マルチドメインスタック分子は、バリエーションCD80ポリペプチドおよび第二のIgSFドメインを含有する第一のFcポリペプチドならびにバリエーションCD80ポリペプチドまたは第二のIgSFドメインのいずれにも連結されていない第二のFcポリペプチドを含有する。

【0249】

いくつかの態様において、マルチドメインスタック分子は、1、2、3、4、またはより多くのバリエーションCD80ポリペプチドおよび1、2、3、4、またはそれより多くの第二のIgSFドメインを含有する第一のFcポリペプチドを含有し、第一のスタックFcポリペプチドにおけるIgSFドメインの総数が2、3、4、5、6、またはそれより多い。そのような態様の一例では、第二のスタックFcポリペプチドは、1、2、3、4、またはそれより多くのバリエーションCD80ポリペプチドおよび1、2、3、4、またはそれより多くの第二のIgSFドメインを含有し、第一のスタックFcポリペプチドにおけるIgSFドメインの総数が2、3、4、5、6、またはそれより多い。そのような態様の別の例では、第二のFcポリペプチドは、バリエーションCD80ポリペプチドまたは第二のIgSFドメインのいずれにも連結されていない。

【0250】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体スタック分子は、第一のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドおよび第二のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドを含有し、該第一および該第二のポリペプチドが異なる。いくつかの態様において、ヘテロ二量体スタック分子は、第一のバリエーションCD80ポリペプチドおよび/または第二のIgSFドメイン（例えば、第二のバリエーションIgSFドメイン）を含有する第一のFcサブユニット、ならびに第一のバリエーションCD80ポリペプチドまたは第二のIgSFドメインのその他のものを含有する第二のFcサブユニットを含有する。いくつかの態様において、ヘテロ二量体スタック分子は、第一のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドおよび第二のスタック免疫調節Fc融合ポリペプチドを含有し、該第一および該第二のポリペプチドが異なる。いくつかの態様において、ヘテロ二量体スタック分子は、第一のバリエーションCD80ポリペプチドおよび/または第二のIgSFドメイン（例えば、第二のバリエーションIgSFドメイン）を含有する第一のFcサブユニットと、第一のバリエーションCD80ポリペプチドおよび第二のIgSFドメイン（例えば、第二のバリエーションIgSFドメイン）の両方を含有するが第一のFcサブユニットとは異なる配向または配置の第二のFcサブユニットとを含有する。

10

20

30

40

50

## 【0251】

いくつかの態様において、第一および第二のスタックされた免疫調節Fc融合ポリペプチドのうち的一方または両方のFcドメインは、Fc分子の界面がヘテロ二量体化を容易にしかつ/または促進するよう改変されるような、改変（例えば、置換）を含む。いくつかの態様において、改変は、第一のFcポリペプチドへの突起（ノブ）および第二のFcポリペプチドへの空洞（ホール）の導入を含み、これにより、突起が空洞内に位置付け可能となることで第一のFc含有ポリペプチドと第二のFc含有ポリペプチドの複合体化を促進する。ポリペプチド内に突起または空洞を作り出すための交換および/または改変のために標的化されたアミノ酸は、典型的には、第二のポリペプチドの界面にある1つまたは複数のアミノ酸と相互作用または接触する界面アミノ酸である。

10

## 【0252】

いくつかの態様において、突起（ホール）アミノ酸を含有するよう改変される第一のポリペプチドは、天然または元来のアミノ酸を、第一のポリペプチドの界面から突出しておりそれゆえ第二のポリペプチドの隣接界面にある補償的空洞（ホール）に位置付け可能な少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸で、交換したものを含む。ほとんどの場合、交換アミノ酸は、元来のアミノ酸残基よりも大きな側鎖体積を有するものである。当業者であれば、突起を作り出す理想的な交換アミノ酸であるものを特定するために、アミノ酸残基の特性をどのように決定および/または評価すればよいかを知っている。いくつかの態様において、突起の形成のための交換残基は、天然に存在するアミノ酸残基であり、例えば、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、またはトリプトファン（W）を含む。いくつかの例では、交換のために特定される元来の残基は、小さな側鎖を有するアミノ酸残基、例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、トレオニン、またはバリンである。

20

## 【0253】

いくつかの態様において、空洞（ホール）を含有するよう改変される第二のポリペプチドは、天然または元来のアミノ酸を、第二のポリペプチドの界面から凹設されしたがって第一のポリペプチドの界面からの対応する突起を収容できる少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸で、交換したものを含むものである。ほとんどの場合、交換アミノ酸は、元来のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有するものである。当業者であれば、空洞の形成のための理想的な交換残基であるものを特定するために、アミノ酸残基の特性をどのように決定および/または評価すればよいかを知っている。概して、空洞の形成のための交換残基は、天然に存在するアミノ酸であり、例えば、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）およびバリン（V）を含む。いくつかの例では、交換のために特定される元来のアミノ酸は、大きな側鎖を有するアミノ酸、例えば、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファンである。

30

## 【0254】

ヒトIgG1のCH3界面は、例えば、各表面から1090 Å 2埋没した、4つの逆平行の鎖上に位置する各ドメイン上の16の残基に関わる（例えば、Deisenhofer et al. (1981) *Biochemistry*, 20:2361-2370; Miller et al., (1990) *J Mol. Biol.*, 216, 965-973; Ridgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9: 617-621; 米国特許第5,731,168号を参照のこと）。突起または空洞を作り出すためのCH3ドメインの改変は、例えば、米国特許第5,731,168号；国際特許出願WO 98/50431およびWO 2005/063816；ならびにRidgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9: 617-621に記載されている。いくつかの例では、突起または空洞を作り出すためのCH3ドメインの改変は、典型的には、2つの中央の逆平行の鎖上に位置する残基に標的化される。その目的は、作製された突起が、パートナーCH3ドメイン内の補償的空洞によって収容されるのではなく、周囲の溶媒に突出することによって収容される可能性があるリスクを最小限に抑えることである。

40

## 【0255】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、「ノブ鎖」のCH3ドメインにT366W変異を、「ホール鎖」のCH3ドメインにT366S、L368A、Y407V変異を含有する。いく

50

つかの場合では、CH3ドメイン間の追加の鎖間ジスルフィド架橋 (Merchant, A. M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681) を、例えば、Y349C変異を「ノブ」または「ホール」鎖のCH3ドメインに、E356C変異またはS354C変異をその他の鎖のCH3ドメインに導入することによって使用することもできる。いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインのうち的一方にS354C、T366W変異を、2つのCH3ドメインの他方にY349C、T366S、L368A、Y407V変異を含有する。いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインのうち的一方にE356C、T366W変異を、2つのCH3ドメインの他方にY349C、T366S、L368A、Y407V変異を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインのうち的一方にY349C、T366W変異を、2つのCH3ドメインの他方にE356C、T366S、L368A、Y407V変異を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインのうち的一方にY349C、T366W変異を、2つのCH3ドメインの他方にS354C、T366S、L368A、Y407V変異を含む。他のノブインホール技術の例は、例えば、EP 1 870 459 A1に記載のとおり、当技術分野において公知である。

#### 【0256】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子のFcサブユニットは、追加的には、1つまたは複数の他のFc変異、例えば上記のいずれかを含有することができる。いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、エフェクター機能を低減する変異を有するFcサブユニットを含有する。

#### 【0257】

いくつかの態様において、CH3突起/空洞改変を含有するFcバリエーションを、スタックされた免疫調節ポリペプチドのどこかに、しかし典型的には、そのN末端またはC末端を介して、第一のおよび/または第二のスタックされた免疫調節ポリペプチドのN末端またはC末端に接続して、例えば融合ポリペプチドを形成することができる。連結は、直接的であることも、リンカーを介した間接的であることもできる。典型的には、ノブ分子およびホール分子は、CH3突起改変を含有するFcバリエーションに連結された第一のスタックされた免疫調節ポリペプチドと、CH3空洞改変を含有するFcバリエーションに連結された第二のスタックされた免疫調節ポリペプチドとの共発現によって生成される。

#### 【0258】

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

いくつかの態様において、IgSFファミリーのIgドメイン (vIgD) のバリエーションを含む免疫調節タンパク質である本明細書において提供されるバリエーションポリペプチドを、部分、例えばエフェクター部分、例えば別のタンパク質と、直接的または間接的に、コンジュゲートまたは融合して、コンジュゲート (「IgSFコンジュゲート」) を形成することができる。いくつかの態様において、結合は、共有結合または非共有結合 (例えば、ビオチン-ストレプトアビジン非共有相互作用を介したもの) であることができる。CD80-Fcバリエーション融合体のいくつかの態様において、任意の2つ以上の前述のコンジュゲートのいずれか1つまたは組み合わせを、FcまたはバリエーションCD80ポリペプチドまたは両方に結合させることができる。

#### 【0259】

いくつかの態様において、部分は、標的化部分、低分子薬 (500ダルトンモル質量未満の非ポリペプチド薬)、毒素、細胞増殖抑制剤、細胞傷害剤、免疫抑制剤、診断目的に好適な放射性物質、治療目的の放射性金属イオン、プロドラッグ活性化酵素、生物学的半減期を延長させる物質、または診断用もしくは検出可能物質であることができる。

#### 【0260】

いくつかの態様において、エフェクター部分は、細胞傷害性、細胞増殖抑制またはさもないければいくらかの治療的恩恵を提供する治療用物質、例えばがん治療用物質である。いくつかの態様において、エフェクター部分は、標的化部分または作用物質、例えば、細胞表面抗原、例えば腫瘍細胞の表面上の抗原を標的化する作用物質である。いくつかの態様において、エフェクター部分は、検出可能シグナルを直接的または間接的のいずれかで生

10

20

30

40

50

成することができる標識である。いくつかの態様において、エフェクター部分は、毒素である。いくつかの態様において、エフェクター部分は、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子またはナノ粒子である。

#### 【0261】

いくつかの態様において、同じであっても異なってもよい1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれより多いエフェクター部分は、バリエーションポリペプチドまたはタンパク質にコンジュゲートされ、連結されまたは融合されて、IgSFコンジュゲートを形成する。いくつかの態様において、そのようなエフェクター部分を、当技術分野において公知でかつ後述される種々の分子生物学的または化学的コンジュゲーションおよび連結法を使用して、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質に結合させることができる。いくつかの態様において、リンカー、例えばペプチドリリンカー、切断可能リンカー、非切断可能リンカー、またはコンジュゲーション反応を助けるリンカーを使用して、エフェクター部分をバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質に連結するまたはコンジュゲートすることができる。

10

#### 【0262】

いくつかの態様において、IgSFコンジュゲートは、以下の成分：（タンパク質またはポリペプチド）、 $(L)_q$ および（エフェクター部分） $m$ を含み、ここで、タンパク質またはポリペプチドは、記載のとおり1つまたは複数の同族カウター構造体リガンドと結合することができる記載のバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質のいずれかであり； $L$ は、タンパク質またはポリペプチドを部分に連結するためのリンカーであり； $m$ は、少なくとも1であり； $q$ は、0以上であり；得られたIgSFコンジュゲートは、1つまたは複数のカウター構造体リガンドに結合する。特定の態様において、 $m$ は、1～4であり、そして、 $q$ は、0～8である。

20

#### 【0263】

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

30

#### 【0264】

いくつかの態様において、標的化物質は、対象への投与後に、腫瘍細胞と結合するか、または腫瘍細胞の近く（例えば、腫瘍血管系または腫瘍微小環境）に結合することができる。標的化物質は、がん細胞の表面上の受容体またはリガンドに結合し得る。本発明の別の局面において、非がん性細胞または組織に特異的である標的化物質が選択される。例えば、標的化物質は、特定の細胞または組織上に通常存在する分子に特異的であることができる。さらに、いくつかの態様において、同じ分子が正常細胞およびがん細胞上に存在することができる。種々の細胞成分および分子が公知である。例えば、標的化物質がEGFRに特異的である場合、得られたIgSFコンジュゲートは、EGFRを発現するがん細胞もEGFRを発現する正常な皮膚上皮細胞も標的化することができる。それゆえ、いくつかの態様において、本発明のIgSFコンジュゲートは、2つの別々の機序（がん細胞および非がん細胞を標的化する）によって働くことができる。

40

#### 【0265】

本明細書に開示される本発明の種々の局面において、本発明のIgSFコンジュゲートは、細胞成分、例えば腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、寄生生物由来の抗原と結合する/標的化することができる、標的化物質を含

50

む。いくつかの局面において、細胞成分、抗原または分子は各々、標的化物質の所望の標的を意味するために使用することができる。例えば、種々の態様において、標的化物質は、上皮成長因子受容体 (EGFR、ErbB-1、HER1)、ErbB-2 (HER2/neu)、ErbB-3/HER3、ErbB-4/HER4、EGFRリガンドファミリー；インスリン様成長因子受容体 (IGFR) ファミリー、IGF結合タンパク質 (IGFBP)、IGFRリガンドファミリー；血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) ファミリー、PDGFRリガンドファミリー；線維芽細胞成長因子受容体 (FGFR) ファミリー、FGFRリガンドファミリー、血管内皮成長因子受容体 (VEGFR) ファミリー、VEGFファミリー；HGF受容体ファミリー；TRK受容体ファミリー；エフリン (EPH) 受容体ファミリー；AXL受容体ファミリー；白血球チロシンキナーゼ (LTK) 受容体ファミリー；TIE受容体ファミリー、アンジオポエチン1,2；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 (ROR) 受容体ファミリー、例えば、ROR1；CD171 (L1CAM)；B7-H6 (NCR3LG1)；PD-L1、腫瘍グリコシル化抗原、例えば、sTnまたはTn、例えばMUC1のsTn Ag；LHR (LHCGR)；ホスファチジルセリン、ジスコイジンドメイン受容体 (DDR) ファミリー；RET受容体ファミリー；KLG受容体ファミリー；RYK受容体ファミリー；MuSK受容体ファミリー；トランスフォーミング成長因子- (TGF-) 受容体、TGF-；サイトカイン受容体、クラスI (ヘマトポエチンファミリー) およびクラスII (インターフェロン/IL-10ファミリー) 受容体、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体スーパーファミリー (TNFRSF)、死受容体ファミリー；がん-精巢 (CT) 抗原、系列特異的抗原、分化抗原、アルファ-アクチニン-4、ARTCI、切断点クラスタ領域-アベルソン (Abelson) (Bcr-abl) 融合産物、B-RAF、カスパーゼ-5 (CASP-5)、カスパーゼ-8 (CASP-8)、-カ

10

20

30

40

50

テニン (CTNBN1)、細胞分裂周期27 (CDC27)、サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、CDKN2A、COA-1、dek-can融合タンパク質、EFTUD-2、伸長因子2 (ELF2)、Etsバリエーション遺伝子6/急性骨髄性白血病1遺伝子ETS (ETC6-AML1) 融合タンパク質、フィブロネクチン (FN)、例えば、フィブロネクチンの外部ドメインA (EDA)、GPNMB、低密度脂質受容体/GDP-Lフコース：-Dガラクトース2--Lフコシルトランスフェラーゼ (LDLR/FUT) 融合タンパク質、HLA-A2遺伝子における2ドメインのヘリックスの残基170におけるHLA-A2.アルギニン-イソロイシン交換 (HLA-A\*201-R170I)、HLA-A1、熱ショックタンパク質70-2変異型 (HSP70-2M)、K1AA0205、MART2、黒色腫遍在性変異型1、2、3 (MUM-1、2、3)、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)、ネオ-PAP、ミオシンクラスI、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARアルファ融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、K-ras (KRAS2)、N-ras (NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPDI、SYT-SSX1または-SSX2融合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE、BAGK-1、BAGE-2,3,4,5、GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8、GnT-V (異常なN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV、MGAT5)、HERV-K-MEL、KK-LC、KM-HN-1、LAGE、LAGE-1、黒色腫上のCTL認識抗原 (CAMEL)、MAGE-A1 (MAGE-1)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、ムチン1 (MUC1)、MART-1/Melan-A (MLANA)、gp100、gp100/Pmel17 (SILV)、チロシナーゼ (TYR)、TRP-1、HAGE、NA-88、NY-ESO-1、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1,2,3,4、TRP2-INT2、がん胎児性抗原 (CEA)、カリクレイン4、マンマグロビン-A、OAI、前立腺特異抗原 (PSA)、TRP-1/gp75、TRP-2、アディポフィリン、黒色腫には存在しないインターフェロン誘導性タンパク質2 (AIM-2)、BING-4、CPSF、サイクリンDI、上皮細胞接着分子 (Ep-CAM)、EphA3、線維芽細胞成長因子-5 (FGF-5)、糖タンパク質250 (gp250)、EGFR (ERBB1)、HER-2/neu (ERBB2)、インターロイキン13受容体2鎖 (IL13R2)、IL-6受容体、腸カルボキシルエステラーゼ (iCE)、アルファ-フェトタンパク質 (AFP)、M-CSF、mdm-2、MUC1、p53 (TP53)、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAPI、サバイピン (BIRC5)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、テロメラーゼ、ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1)、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIPI、CTAGE-1、CSAGE、MMAI、CAGE、BORIS、HOM-TES-85、AF1



5q14、HCA661、LDHC、MORC、SGY-I、SPOI 1、TPXI、NY-SAR-35、FTHL17、NXF2、TDRDI、TEX15、FATE、TPTE、免疫グロブリンイディオタイプ、ベンスジョーンズ (Bence-Jones) タンパク質、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、CD40、CD30、CD20、CD19、CD33、がん抗原72-4 (CA 72-4)、がん抗原15-3 (CA 15-3)、がん抗原27-29 (CA 27-29)、がん抗原125 (CA 125)、がん抗原19-9 (CA 19-9)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、 $\alpha$ -2ミクログロブリン、扁平上皮がん抗原、神経特異的エノラーゼ、熱ショックタンパク質gp96、GM2、サルグラモスチム、CTLA-4、707アラニンプロリン (707-AP)、T細胞によって認識される腺がん抗原4 (ART-4)、がん胎児性抗原ペプチド-1 (CAP-1)、カルシウム活性化クロライドチャネル-2 (CLCA2)、シクロフィリンB (Cyp-B)、ヒト印環腫瘍-2 (HST-2)、ヒトパピローマウイルス (HPV) タンパク質 (HPV-E6、HPV-E7、メジャーまたはマイナーカプシド抗原、他)、エプスタイン-バーウイルス (EBV) タンパク質 (EBV潜伏膜タンパク質-LMP1、LMP2; 他)、BまたはC型肝炎ウイルスタンパク質、ならびにHIVタンパク質を非限定的に含む成分に特異的であるかまたはそれに結合する。

#### 【0266】

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

#### 【0267】

いくつかの態様において、IgSFコンジュゲートは、その標的化物質により、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍微小環境の細胞成分に局在化し、例えば結合し、それによって、腫瘍の近くで免疫応答の細胞を調節する。いくつかの態様において、標的化物質は、コンジュゲートされたIgSF (例えば、vIgD) の腫瘍標的への送達を容易にすることで、例えばその同族結合パートナーと相互作用して、同族結合パートナーを保有する免疫細胞 (例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞) のシグナル伝達を変化させる。いくつかの態様において、局在化送達は、CD28またはICOSを介した共刺激シグナル伝達を仲介する。

#### 【0268】

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

#### 【0269】

いくつかの態様において、IgSFコンジュゲートは、その抗体標的化部分により、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍微小環境の細胞成分と結合し、それによって、免疫応答の調節（例えば、共刺激分子の活性化または免疫細胞活性化の負の調節分子の阻害による）、生存シグナル（例えば、成長因子またはサイトカインまたはホルモン受容体アンタゴニスト）の阻害、死シグナルの活性化、および/または免疫媒介性細胞傷害性（例えば、抗体依存性細胞傷害性による）を介して、標的化された細胞のアポトーシスを促進する。そのようなIgSFコンジュゲートは、いくつかの機序を通して、腫瘍細胞を抑制する、低減するまたは排除する、例えば、コンジュゲートされたエフェクター部分の腫瘍標的への送達を、例えばIgSFコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスを通して容易にするよう機能することができ；または、そのようなコンジュゲートは、免疫細胞（例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞）を動員し、それと結合し、および/またはそれを活性化することができる。

10

#### 【0270】

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

#### 【0271】

本発明の抗体標的化部分は、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>、Fd、単鎖Fv（scFv）、単鎖抗体、ジスルフィド連結されたFv（sdFv）ならびにVLまたはVHドメインのいずれかを含む断片を非限定的に含む、抗体断片を含む。単鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、可変領域を、単独でまたは以下の全体もしくは一部分と組み合わせて含み得る：ヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメイン。また、可変領域とヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインの任意の組み合わせをまた含む抗原結合断片も本発明に含まれる。また、Fc断片、抗原-Fc融合タンパク質、およびFc-標的化部分コンジュゲートまたは融合産物（Fc-ペプチド、Fc-アプタマー）も本発明に含まれる。本発明の抗体標的化部分は、トリおよび哺乳動物を含む任意の動物起源由来であり得る。一局面において、抗体標的化部分は、ヒト、ネズミ（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。さらに、そのような抗体は、動物抗体のヒト化バージョンであってもよい。本発明の抗体標的化部分は、単一特異性、二重特異性、三重特異性であっても、より高次の多重特異性のものであってもよい。

20

30

#### 【0272】

種々の態様において、抗体/標的化部分は、免疫細胞（例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞）を、Fc（抗体内）とFc受容体（免疫細胞上）との間の相互作用を介しておよび本明細書において提供されるコンジュゲートされたバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を介して、動員、結合、および/または活性化する。いくつかの態様において、抗体/標的化部分は、本明細書において提供されるコンジュゲートされたバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を介して、腫瘍物質を認識するまたはそれと結合して、腫瘍細胞に局在化し、腫瘍の近くで免疫細胞の調節を容易にする。

40

#### 【0273】

IgSFコンジュゲートに組み込むことができる抗体の例は、限定されないが、抗体、例えばセツキシマブ（IMC-C225; Erbitux（登録商標））、トラスツズマブ（Herceptin（登録商標））、リツキシマブ（Rituxan（登録商標）; MabThera（登録商標））、ペバシズマブ（Avastin（登録商標））、アレムツズマブ（Campath（登録商標）; Campath-1H（登録商標）; Mabcampath（登録商標））、パニツムマブ（ABX-EGF; Vectibix（登録商標））、ラニビズマブ（Lucentis（登録商標））、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン（Zevalin（登録商標））、トシツモマブ、ヨウ素I 131トシツモマブ（BEXXAR（登録商標））、カツマキシマブ（Removab（登録商標））、ゲムツズマブ、ゲ

50

ムツズマブオゾガマイシン (Mylotarg (登録商標))、アバタセプト (CTLA4-Ig; Oncia (登録商標))、ベラタセプト (L104EA29YIg; LEA29Y; LEA)、イピリムマブ (MDX-010; MDX-101)、トレメリムマブ (チシリムマブ; CP-675,206)、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト (VEGF Trap、AVE005)、ボロキシマブ (M200)、F200、MORAb-009、SS1P (CAT-5001)、シクスツムマブ (IMC-A12)、マツズマブ (EMD72000)、ニモツズマブ (h-R3)、ザルツムマブ (HuMax-EGFR)、ネシツムマブ IMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004、mAb-425、Panorex@ (17-1A) (ネズミモノクローナル抗体); Panorex@ (17-1A) (キメラネズミモノクローナル抗体); IDEC-Y2B8 (ネズミ、抗CD20 MAb); BEC2 (抗イディオタイプMAb、GDエピトープを模倣する) (BCGを含む); オンコリム (Oncolym) (Lym-1モノクローナル抗体); SMART MI95 Ab、ヒト化13'I LYM-1 (オンコリム)、オバレックス (Ovarex) (B43.13、抗イディオタイプマウスMAb); MDX-210 (ヒト化抗HER-2二重特異性抗体); 膵がん上のEGP40 (17-1A) パンカルシノーマ (pancarcinoma) 抗原に結合する3622W94 MAb; 抗VEGF、ゾナパックス (Zenapax) (SMART抗Tac (IL-2受容体); SMART MI95 Ab、ヒト化Ab、ヒト化); MDX-210 (ヒト化抗HER-2二重特異性抗体); MDX-447 (ヒト化抗EGF受容体二重特異性抗体); NovoMAb-G2 (パンカルシノーマ特異的Ab); TNT (ヒストン抗原に対するキメラMAb); TNT (ヒストン抗原に対するキメラMAb); グリオマブ (Gliomab) -H (Monoclonal s-ヒト化Ab); GNI-250 MAb; EMD-72000 (キメラ-EGFアンタゴニスト); リンホシド (ヒト化LL2抗体); およびMDX-260二重特異性、標的GD-2、ANA Ab、SMART IDIO Ab、SMART ABL 364 AbまたはImmuRAIT-CEAを含む。前述のリストに例示されるとおり、特定の標的エピトープに対する抗体を製造することは慣用的である。

10

20

#### 【0274】

いくつかの態様において、抗体標的化部分は、Fcドメインを含有する、完全長抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの態様において、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質は、例えば抗体のFc部分のN末端へのコンジュゲーションによって、抗体標的化部分のFc部分にコンジュゲートされる。

#### 【0275】

いくつかの態様において、vIgDは、直接的または間接的に、抗体の軽鎖および/または重鎖のN末端またはC末端に連結されている。いくつかの態様において、連結は、ペプチドリinker、例えば上記のいずれかを介した連結であることができる。種々の配置を構築することができる。図6A~6Cは、例示的な配置を示す。いくつかの態様において、抗体コンジュゲートを、細胞において抗体の重鎖および軽鎖の共発現によって産生することができる。

30

#### 【0276】

本発明の一面において、標的化物質は、アプタマー分子である。例えば、いくつかの態様において、アプタマーは、標的化物質として機能する核酸からなる。種々の態様において、本発明のIgSFコンジュゲートは、腫瘍細胞、腫瘍血管系、および/または腫瘍微小環境上の分子に特異的なアプタマーを含む。いくつかの態様において、アプタマーはそれ自体、標的化モジュール (配列) に加えて、生物学的に活性な配列を含むことができ、ここで、生物学的に活性な配列は、標的細胞に対する免疫応答を誘導することができる。言い換えれば、そのようなアプタマー分子は、二重使用物質である。いくつかの態様において、本発明のIgSFコンジュゲートは、アプタマーの抗体へのコンジュゲーションを含み、ここで、アプタマーおよび抗体は、腫瘍細胞、腫瘍血管系、腫瘍微小環境、および/または免疫細胞上の別々の分子への結合に特異的である。

40

#### 【0277】

用語「アプタマー」は、特定の分子への特異的結合特性に基づいて選択された、DNA、RNAまたはペプチドを含む。例えば、本明細書に開示されるとおりの腫瘍細胞、腫瘍血管系、腫瘍微小環境、および/または免疫細胞内の特定の遺伝子または遺伝子産物と結合するように、アプタマーを選択することができ、ここで、選択は、当技術分野において公知お

50

よび当業者によく知られている方法によってなされる。

【0278】

本発明のいくつかの局面において、標的化合物は、ペプチドである。例えば、本明細書において提供されるバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を、がんまたは腫瘍細胞の成分と結合することができるペプチドにコンジュゲートすることができる。それゆえ、本発明のそのようなIgSFコンジュゲートは、腫瘍細胞の、腫瘍血管系の細胞成分、および/または腫瘍微小環境の成分に結合するペプチド標的化合物を含む。いくつかの態様において、標的化合物ペプチドは、インテグリンのアンタゴニストまたはアゴニストであることができる。アルファおよびベータサブユニットを含むインテグリンは、当業者に周知の多数のタイプを含む。

10

【0279】

一態様において、標的化合物は、Vv 3である。インテグリンVv 3は、多種多様な細胞上に発現され、骨マトリックスへの破骨細胞の接着、血管平滑筋細胞の遊走、および血管新生を含むいくつかの生物学的に関連するプロセスを媒介することが示されている。インテグリンに対する好適な標的化分子は、他のインテグリン、例えばV4. i (VLA-4)、V4-P7 (例えば、米国特許第6,365,619号; Chang et al, Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:159-163 (2002); Lin et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:133-136 (2002) を参照のこと) などに対する、RGDペプチドまたはペプチドミメティックならびに非RGDペプチドまたはペプチドミメティック (例えば、米国特許第5,767,071号および第5,780,426号を参照のこと) を含む。

20

【0280】

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

30

【0281】

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

40

【0282】

いくつかの態様において、検出可能シグナルを間接的または直接的に生成することができる標識とコンジュゲートされた本明細書において提供される、バリエーションポリペプチド

50

または免疫調節タンパク質を含むIgSFコンジュゲートが提供される。これらのIgSFコンジュゲートを、研究または診断用途に、例えばがんのインビボ検出に使用することができる。標識は、好ましくは、直接的または間接的のいずれかで、検出可能シグナルを産生することができる。例えば、標識は、放射線不透過性または放射性同位体、例えば $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ；蛍光（フルオロフォア）もしくは化学発光（クロモフォア）化合物、例えばフルオレセインイソチオシアナート、ローダミンもしくはルシフェリン；酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ；イメージング剤；または金属イオンであり得る。いくつかの態様において、標識は、シンチグラフィ研究用の放射性原子、例えば $^{99}\text{Tc}$ もしくは $^{123}\text{I}$ 、または、核磁気共鳴（NMR）イメージング（磁気共鳴イメージング、MRIとしても公知）用のスピン標識、例えばジルコニウム-89、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンもしくは鉄である。ジルコニウム-89を、例えば、PETイメージング用に、種々の金属キレート剤に錯体化して抗体にコンジュゲートしてよい（WO 2011/056983）。いくつかの態様において、IgSFコンジュゲートは、間接的に検出可能である。例えば、IgSFコンジュゲートに特異的であった検出可能標識を含有する二次抗体を使用して、IgSFコンジュゲートを検出することができる。

10

**【0283】**

IgSFコンジュゲートを、当技術分野において公知の任意の方法を使用して調製してよい。例えば、WO 2009/067800、WO 2011/133886、および米国特許出願公報第2014322129号（参照によってその全体として本明細書に組み入れられる）を参照されたい。

20

**【0284】**

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

30

**【0285】**

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

**【0286】**

40

いくつかの態様において、IgSFコンジュゲートのバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質とエフェクター部分は共にタンパク質であり、当技術分野において周知の技術を使用してこれらをコンジュゲートすることができる。2つのタンパク質をコンジュゲートできる利用可能な数百のクロスリンカーがある（例えば、"Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking," 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arborを参照のこと）。クロスリンカーは、概して、バリエーションポリペプチドもしくは免疫調節タンパク質および/またはエフェクター部分上で利用可能であるかまたはそこに挿入されている反応性官能基に基づいて選択される。加えて、反応性基がない場合、光活性化可能クロスリンカーを使用することができる。ある特定の場合には、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質とエフェクター部分との間にスペーサーを含むことが望ましい場合があ

50

る。当技術分野に公知の架橋剤は、ホモ二官能性物質：グルタルアルデヒド、ジメチルアジピミデートおよびビス（ジアゾベンジジン）、ならびにヘテロ二官能性物質：mマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドおよびスルホ-mマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドを含む。

【0287】

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

10

【0288】

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

【0289】

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

20

【0290】

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

30

【0291】

バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質および細胞傷害性物質のコンジュゲートを、多種多様な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート (SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、アジピンイミド酸ジメチルHCl)、活性エステル (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス (p-ジアゾニウムベンゾイル) -エチレンジアミン)、ジイソシアナート (例えば、トルエン2,6-ジイソシアナート)、およびビス活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン) を使用して製造してよい。例えば、Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987) に記載のとおりリシン免疫毒素を調製することができる。炭素-14で標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) が、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションの

40

50

ための例示的なキレート剤である。例えば、WO 94/11026を参照されたい。リンカーは、細胞中での細胞傷害薬の放出を容易にする「切断可能リンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光分解性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); 米国特許第5,208,020号) を使用してよい。

#### 【0292】

本発明のIgSFコンジュゲートは、クロスリンカー試薬：市販（例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.Aから）のBMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、およびSVSB（スクシンイミジル-（4-ビニルスルホン）ベンゾアート）と共に調製された薬物コンジュゲートを明示的に企図するが、それに限定されない。Applications Handbook and Catalog 2003-2004の467-498ページを参照されたい。

#### 【0293】

D. 膜貫通および分泌性免疫調節タンパク質ならびに改変細胞

免疫調節バリエーションCD80ポリペプチドを発現する改変細胞（あるいは、「改変細胞」）が本明細書において提供される。いくつかの態様において、発現する免疫調節バリエーションCD80ポリペプチドは、膜貫通型タンパク質であり、かつ、表面に発現する。いくつかの態様において、発現する免疫調節バリエーションCD80ポリペプチドは、細胞において発現して該細胞から分泌される。

#### 【0294】

1. 膜貫通型免疫調節タンパク質

いくつかの態様において、バリエーションCD80を含む免疫調節ポリペプチドは、膜結合タンパク質であることができる。以下により詳細に記載するとおり、免疫調節ポリペプチドは、少なくとも1つの親和性改変IgSFドメイン（IgVまたはIgC）を含有するエクストドメイン、膜貫通ドメイン、および任意で、細胞質ドメインを含有する、バリエーションCD80を含む膜貫通型免疫調節ポリペプチドであることができる。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、リンパ球（例えば、T細胞またはNK細胞）または抗原提示細胞の表面を含む、免疫細胞、例えば哺乳動物細胞の表面上に発現することができる。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞（あるいは、細胞傷害性Tリンパ球またはCTL）、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、メモリーT細胞、またはT細胞のようなT細胞を含む、哺乳動物T細胞の表面上に発現する。いくつかの態様において、哺乳動物細胞は、抗原提示細胞（APC）である。典型的には、しかし排他的ではないが、エクストドメイン（あるいは、「細胞外ドメイン」）は、本発明のバリエーションCD80の1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、アミノ酸置換）を含む。したがって、例えば、いくつかの態様において、膜貫通型タンパク質は、本発明のバリエーションCD80の1つまたは複数のアミノ酸置換を含むエクストドメインを含む。

#### 【0295】

いくつかの態様において、改変細胞は、膜貫通型タンパク質のような膜タンパク質であることができる膜貫通型免疫調節ポリペプチド（TIP）であるバリエーションCD80ポリペプチドを発現する。典型的な態様において、膜タンパク質のエクストドメインは、記載のとおり、少なくとも1つのIgSFドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含有する、本明細書において提供されるバリエーションCD80の細胞外ドメインまたはそのIgSFドメインを含む。本明細書において提供される膜貫通型免疫調節タンパク質は、エクストドメインに連結された膜貫通ドメインをさらに含有する。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、細胞上の細胞表面発現のためのコードされているタンパク質をもたらす。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、エクストドメインに直接連結されている。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、1つまたは複数のリンカーまたはスペーサーを介して、エクストドメインに間接的に連結されている。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、優位に疎水性のアミノ酸残基、例えばロイシンおよびバリンを含有する。

## 【0296】

いくつかの態様において、完全長膜貫通アンカードメインを使用して、確実にTIPが改変細胞、例えば改変T細胞の表面上に発現するようにすることができる。好都合なことに、これは、親和性が改変されている特定の天然タンパク質（例えば、CD80または他の天然IgSFタンパク質）由来であることもでき、かつ、天然IgSFタンパク質（例えば、CD80）と同じ様式で第一の膜近位ドメインの配列に簡単に融合させることもできる。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、対応する野生型または未改変IgSFメンバーの膜貫通ドメイン（例えば、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に含有される膜貫通ドメイン）を含む（表2）。いくつかの態様において、膜結合形態は、例えばSEQ ID NO:1の243～263番目の残基に対応する、対応する野生型または未改変ポリペプチドの膜貫通ドメインを含む。

10

## 【0297】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、天然CD80の膜貫通ドメインではない非天然膜貫通ドメインである。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、膜結合タンパク質であるかまたは膜貫通型タンパク質である別の非CD80ファミリーメンバーポリペプチド由来の膜貫通ドメインに由来する。いくつかの態様において、T細胞上の別のタンパク質由来の膜貫通アンカードメインを使用することができる。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、CD8に由来する。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、スパーサドメインとして役立つCD8の細胞外部分をさらに含有することができる。例示的なCD8由来膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:246もしくは399に示されるかまたはCD8膜貫通ドメインを含有するその一部分である。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、合成膜貫通ドメインである。

20

## 【0298】

いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインに連結された、エンドドメイン、例えば細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含有する。いくつかの態様において、細胞質シグナル伝達ドメインは、細胞シグナル伝達を誘導する。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質のエンドドメインは、対応する野生型または未改変ポリペプチドの細胞質ドメイン、例えば、SEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列に含有される細胞質ドメインを含む（表2を参照のこと）。

## 【0299】

いくつかの態様において、バリエーションCD80であるかまたはバリエーションCD80を含む提供される膜貫通型免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:253に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、かつ、記載のとおり少なくとも1つの親和性が改変されたCD80 IgSFドメインを含むエクトドメインおよび膜貫通ドメインを含有する。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、表1に示されるいずれかを含む、記載のとおりIgSFドメイン（例えば、IgVドメイン）に任意の1つまたは複数のアミノ酸置換を含有する。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、記載のとおり細胞質ドメインをさらに含むことができる。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、シグナルペプチドをさらに含有することができる。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、例えばSEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列に含有される、野生型IgSFメンバーの天然シグナルペプチドである（例えば、表2を参照のこと）。

30

40

## 【0300】

また、そのような膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸分子が提供される。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸分子は、SEQ ID NO:253に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み、かつ、記載のとおり少なくとも1つの親和性改変IgSFドメインを含むエクトドメイン、膜貫通ドメイン、および任意で、細胞質ドメインを

50



含有する。いくつかの態様において、核酸分子は、シグナルペプチドをコードするヌクレオチドの配列をさらに含むことができる。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、対応する野生型IgSFメンバーの天然シグナルペプチドである（例えば、表2を参照のこと）。

#### 【0301】

例示的な膜貫通型免疫調節タンパク質は、i) SEQ ID NO:241に示されるアミノ酸配列、または、ii) SEQ ID NO:241に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を示しかつSEQ ID NO:241の親和性が改変されたドメインまたはその中に含有されるアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む、CD80 TIPである。また、i) SEQ ID NO:242に示されるヌクレオチドの配列、ii) SEQ ID NO:242に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を示しかつSEQ ID NO:241の親和性が改変されたドメインを含むTIPまたはSEQ ID NO:241のアミノ酸置換を含有するポリペプチドをコードする配列、または、iii) 縮重コドンを含むi)またはii)の配列が、提供される。

#### 【0302】

いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質のエンドドメインが、少なくとも1つのITAM（免疫受容体チロシン活性化モチーフ）含有シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメインを含む、CAR関連膜貫通型免疫調節タンパク質が提供される。ITAMは、T細胞受容体シグナル伝達に關与するCD3-ゼータ鎖（「CD3-z」）を含む、免疫細胞のシグナル伝達に關与する多数のタンパク質シグナル伝達ドメインに見いだされる保存モチーフである。いくつかの態様において、エンドドメインは、CD3-シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、CD3-シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:333に示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:247に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%を示しかつT細胞シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、CAR関連膜貫通型免疫調節タンパク質のエンドドメインは、T細胞の免疫調節応答をさらに調節する共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含むことができる。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、ICOS、41BBまたはOX40である。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28または4-1BBに由来し、かつ、SEQ ID NO:400~403のいずれかに示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:400~403に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%を示しかつT細胞共刺激シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、提供されるCAR関連膜貫通型免疫調節タンパク質は、親和性改変IgSFドメインの同族結合パートナーまたはカウンター構造体への結合によってT細胞シグナル伝達を刺激する、CARの特徴を有する。いくつかの態様において、親和性改変IgSFドメインのそのカウンター構造体への特異的結合によって、細胞傷害性、増殖またはサイトカイン産生の変化によって反映されたとおり、T細胞活性の免疫活性の変化を導くことができる。

#### 【0303】

いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、細胞質シグナル伝達を媒介することができるエンドドメインを含有しない。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、野生型または未改変ポリペプチドのシグナル伝達機序を欠いており、それゆえ、それ自体細胞シグナル伝達を誘導しない。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、対応する野生型または未改変ポリペプチドの細胞内（細胞質）ドメインまたは細胞内ドメインの一部分、例えばSEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列に含有される細胞質シグナル伝達ドメインを欠いている（表2を参照のこと）。いくつかの態様において、膜貫通型免疫調節タンパク質は、例えばIgSFファミリーの阻害性受容体（例えば、PD-1またはTIGIT）を含むある特定の阻害性受容体に含有される、ITIM（免疫受容体チロシン系阻害モチーフ）を含有しない。したがって、いくつかの態様において、膜

10

20

30

40

50

貫通型免疫調節タンパク質は、エクトドメインおよび膜貫通ドメイン（例えば、記載のと  
おりのいずれか）のみを含有する。

#### 【0304】

#### 2. 分泌された免疫調節タンパク質および改変細胞

いくつかの態様において、本明細書に記載のとおりのアミノ酸変異のいずれか1つまたは複数を含有するCD80バリエーション免疫調節ポリペプチドは、例えば細胞に発現するとき、分泌可能である。そのようなバリエーションCD80免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインを含まない。いくつかの態様において、バリエーションCD80免疫調節タンパク質は、半減期延長部分（例えば、Fcドメインまたは多量体化ドメイン）にコンジュゲートされない。いくつかの態様において、バリエーションCD80免疫調節タンパク質は、ドメインを細胞外に出す、シグナルペプチド、例えば抗体シグナルペプチドまたは他の効率的なシグナル配列を含む。免疫調節タンパク質がシグナルペプチドを含みかつ改変細胞によって発現されるとき、シグナルペプチドは、免疫調節タンパク質が改変細胞によって分泌されるようにする。概して、シグナルペプチド、またはシグナルペプチドの一部は、分泌と共に免疫調節タンパク質から切断される。免疫調節タンパク質は、核酸（発現ベクターの一部であることができる）によってコードされることができる。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、細胞（例えば、免疫細胞、例えば初代免疫細胞）によって発現および分泌される。

10

#### 【0305】

したがって、いくつかの態様において、シグナルペプチドをさらに含むバリエーションCD80免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの態様において、シグナルペプチドをコードする分泌配列に機能的に接続されたバリエーションCD80免疫調節タンパク質をコードする核酸分子が本明細書において提供される。

20

#### 【0306】

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

#### 【0307】

いくつかの態様において、シグナルペプチドは、対応する野生型CD80由来の天然シグナルペプチドである（表2を参照のこと）。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、非天然シグナルペプチドである。例えば、いくつかの態様において、非天然シグナルペプチドは、対応する野生型CD80由来の変異体天然シグナルペプチドであり、かつ、1つまたは複数（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれ以上）の置換、挿入、または欠失を含むことができる。いくつかの態様において、非天然シグナルペプチドは、野生型IgSFファミリーメンバーと同じIgSFファミリー由来のファミリーメンバーのシグナルペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様において、非天然シグナルペプチドは、野生型IgSFファミリーメンバーとは異なるIgSFファミリー由来のIgSFファミリーメンバー由来のシグナルペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様において、シグナルペプチドは、非IgSFタンパク質ファミリー由来のシグナルペプチドまたはその変異体、例えば免疫グロブリン（例えば、IgG重鎖またはIgG 軽鎖）、サイトカイン（例えば、インターロイキン-2（IL-2）、またはCD33）、血清アルブミンタンパク質（例えば、HSAまたはアルブミン）、ヒトアズロシジンプレタンパク質シグナル配列、ルシフェラーゼ、トリプシノーゲン（例えば、キモトリプシノーゲンまたはトリプシノーゲン）由来のシグナルペプチド、または細胞からタンパク質を効率的に分泌することができる他のシグナルペプチドである。例示的なシグナルペプチドは、表6に記載のいずれかを含む。

30

#### 【0308】

（表6）例示的なシグナルペプチド

40

50

SEQ ID NO	シグナルペプチド	ペプチド配列
SEQ ID NO: 353	HSA シグナルペプチド	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 354	Ig $\kappa$ 軽鎖	MDMRAPAGIFGFLLVLPFGYRS
SEQ ID NO: 355	ヒトアズロシジンプレタンパク質 シグナル配列	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO: 356	IgG 重鎖シグナルペプチド	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO: 357	IgG 重鎖シグナルペプチド	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO: 358	IgG 重鎖シグナルペプチド	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS
SEQ ID NO: 359	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 360	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDWTWRFLFVVAAATGVQS
SEQ ID NO: 361	IgG 重鎖シグナルペプチド	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO: 362	IgG 重鎖シグナルペプチド	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO: 363	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAAPRWVLS
SEQ ID NO: 364	IgG $\kappa$ 軽鎖シグナル配列:	MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC
SEQ ID NO: 365	IgG $\kappa$ 軽鎖シグナル配列:	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
SEQ ID NO: 366	ガウシアルシフェラーゼ	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO: 367	ヒトアルブミン	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 368	ヒトキモトリプシノーゲン	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO: 369	ヒトインターロイキン-2	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO: 370	ヒトトリプシノーゲン-2	MNLLLILTFVAAAVA

10

20

## 【 0 3 0 9 】

分泌性バリエーションCD80免疫調節タンパク質のいくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、発現されたときのシグナルペプチドを含み、そして、シグナルペプチド（またはその一部分）は、分泌によって免疫調節タンパク質から切断される。

30

## 【 0 3 1 0 】

いくつかの態様において、改変細胞は、細胞から分泌されるバリエーションCD80ポリペプチドを発現する。いくつかの態様において、そのようなバリエーションCD80ポリペプチドは、分泌のためのシグナル配列の操作可能な制御下、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子によってコードされている。いくつかの態様において、コードされている免疫調節タンパク質は、細胞から発現されたときに分泌される。いくつかの態様において、核酸分子によってコードされている免疫調節タンパク質は、膜貫通ドメインを含まない。いくつかの態様において、核酸分子によってコードされている免疫調節タンパク質は、半減期延長部分（例えば、Fcドメインまたは多量体化ドメイン）を含まない。いくつかの態様において、核酸分子によってコードされている免疫調節タンパク質は、シグナルペプチドを含む。いくつかの態様において、本発明の核酸は、免疫調節タンパク質をコードする核酸に機能的に連結された分泌性またはシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、それによって、免疫調節タンパク質の分泌が可能となる。

40

## 【 0 3 1 1 】

## 3. 細胞および細胞の改変

提供される免疫調節ポリペプチドのいずれかを発現する改変細胞が本明細書において提供される。いくつかの態様において、改変細胞は、それらの表面上に、提供される膜貫通型免疫調節ポリペプチドのいずれかを発現する。いくつかの態様において、改変細胞は、免疫調節タンパク質を発現して、タンパク質の分泌に好適な条件下で細胞から分泌可能で

50

あるか、または分泌することができる。いくつかの態様において、免疫調節タンパク質は、リンパ球、例えば腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）、T細胞もしくはNK細胞上、または骨髄系細胞上に発現する。いくつかの態様において、改変細胞は、抗原提示細胞（APC）である。いくつかの態様において、改変細胞は、改変された哺乳動物T細胞または改変された哺乳動物抗原提示細胞（APC）である。いくつかの態様において、改変されたT細胞またはAPCは、ヒトまたはネズミ細胞である。

#### 【0312】

いくつかの態様において、改変されたT細胞は、限定されないが、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞（あるいは、細胞傷害性Tリンパ球またはCTL）、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、メモリーT細胞、またはT細胞を含む。いくつかの態様において、改変されたT細胞は、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>である。MHCのシグナルに加えて、改変されたT細胞はまた、いくつかの態様において先に考察したとおりの膜結合形態で発現するバリエーションCD80膜貫通型免疫調節ポリペプチドによって提供される、共刺激シグナルを必要とする。

10

#### 【0313】

いくつかの態様において、改変されたAPCは、例えば、MHC IIを発現するAPC、例えばマクロファージ、B細胞、および樹状細胞、ならびに細胞および無細胞（例えば、生分解性高分子微粒子）人工APC（aAPC）の両方を含むaAPCを含む。人工APC（aAPC）は、これらが抗原をT細胞に提示しかつそれらを活性化するという点でAPCと類似の様式で作用することができる、APCの合成バージョンである。抗原提示は、MHC（クラスIまたはクラスII）によって実施される。いくつかの態様において、aAPCのような改変されたAPCでは、MHC上に負荷される抗原は、いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原である。MHC上に負荷される抗原は、いくつかの場合では、CTLA-4またはCD80または本明細書において提供されるバリエーションCD80ポリペプチドによって認識される他の分子を発現することができる、T細胞のT細胞受容体（TCR）によって認識される。aAPCを改変するために使用することができる材料は、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）、酸化鉄、リポソーム、脂質二重層、セファロース、およびポリスチレンを含む。

20

#### 【0314】

いくつかの態様において、本明細書において提供される免疫調節タンパク質、例えば膜貫通型免疫調節タンパク質または分泌性免疫調節タンパク質は、抗原結合受容体、例えば組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）を発現する細胞において共発現するかまたは改変される。いくつかの態様において、改変細胞、例えば改変されたT細胞は、がん、炎症性および自己免疫性障害、またはウイルス感染と関連する所望の抗原を認識する。具体的な態様において、抗原結合受容体は、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原と特異的に結合する抗原結合部分を含有する。いくつかの態様において、改変されたT細胞は、抗原、例えば腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン（例えば、scFv）を含有するCAR（キメラ抗原受容体）T細胞である。いくつかの態様において、抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、CD19に特異的である。例示的なCARは、抗CD19 CAR、例えばSEQ ID NO:245に示される抗CD19 scFvを含有するCARである。いくつかの態様において、TIPタンパク質は、改変されたT細胞受容体細胞またはおよび改変されたキメラ抗原受容体細胞において発現する。そのような態様において、改変細胞は、TIPおよびCARまたはTCRを共発現する。

30

40

#### 【0315】

いくつかの態様において、CARは、スペーサーまたはヒンジ、膜貫通ドメイン、およびITAMシグナル伝達ドメイン（例えば、CD3シグナル伝達ドメイン）を含む細胞内シグナル伝達ドメイン（エンドドメイン）をさらに含有する。いくつかの態様において、CARは、共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、スペーサーまたはヒンジは、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に存在し、例えば、細胞上に発現する場合は抗原結合ドメインと原形質膜との間にある。いくつかの態様において、スペーサーまたはヒンジは、IgGサブクラス（例えば、IgG1およびIgG4）、IgD、またはCD8に

50

由来する（例えば、Qin et al. (2017) J. Hematol. Oncol., 10:68を参照のこと）。いくつかの態様において、スパーサーまたはヒンジは、IgG1に由来する。

【0316】

いくつかの態様において、スパーサーおよび膜貫通ドメインは、例えばSEQ ID NO:246もしくは399に示されるか、またはSEQ ID NO:332もしくは364に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれより高い配列同一性を示すアミノ酸配列に示される、CD8に由来するヒンジおよび膜貫通ドメインである。いくつかの態様において、エンドドメインは、CD3- シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、CD3- シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:247に示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:247に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%を示しかつT細胞シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、CAR関連膜貫通型免疫調節タンパク質のエンドドメインは、T細胞の免疫調節応答をさらに調節する共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含むことができる。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、ICOS、41BBまたはOX40である。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28または4-1BBに由来し、かつ、SEQ ID NO:400~403のいずれかに示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:400~403に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%を示しかつT細胞共刺激シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸配列を含む。

【0317】

別の態様において、改変されたT細胞は、組換えまたは改変されたTCRを含むTCRを保有する。いくつかの態様において、TCRは、天然TCRであることができる。当業者は、概して天然の哺乳動物T細胞受容体が抗原特異的認識および結合に関与するアルファおよびベータ鎖（または および 鎖）を含むことを認識するだろう。いくつかの態様において、TCRは、修飾されている改変されたTCRである。いくつかの態様において、改変されたT細胞のTCRは、APCによって提示された腫瘍関連または腫瘍特異的抗原に特異的に結合する。

【0318】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチド、例えば膜貫通型免疫調節ポリペプチドまたは分泌性免疫調節ポリペプチドを、組換え宿主細胞に採用されるもののような多種多様な戦略によって、改変細胞、例えば改変されたT細胞または改変されたAPCに組み込むことができる。DNA構築物を初代T細胞に導入するための多種多様な方法が当技術分野において公知である。いくつかの態様において、ウイルス形質導入またはプラスミドエレクトロポレーションが採用される。典型的な態様において、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子、または発現ベクターは、発現された膜貫通型免疫調節タンパク質を細胞膜に局在化させるかまたは分泌のためのシグナルペプチドを含む。いくつかの態様において、本発明の膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸は、宿主哺乳動物細胞での発現を可能にするウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターにサブクロニングされる。発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入することができ、宿主細胞培養条件下で、免疫調節タンパク質は表面上に発現するかまたは分泌される。

【0319】

例示的な例では、初代T細胞を、エキスピボで精製して（CD4細胞またはCD8細胞または両方）、種々のTCR/CD28アゴニスト、例えば抗CD3/抗CD28をコートしたビーズからなる活性化プロトコルで刺激することができる。2または3日の活性化プロセス後、免疫調節ポリペプチドを含有する組換え発現ベクターを、当技術分野で標準的なレンチウイルスもしくはレトロウイルス形質導入プロトコルまたはプラスミドエレクトロポレーション戦略により、初代T細胞に安定的に導入することができる。細胞を、例えば、天然親分子およびポリペプチド（バリエーションCD80を含む）と交差反応する抗エピトープタグまたは抗体を使用するフローサイトメトリーによって、免疫調節ポリペプチド発現についてモニタ

リングすることができる。免疫調節ポリペプチドを発現するT細胞を、用途に応じて、抗エプITOブタグ抗体を用いたソーティングにより濃縮することも、高または低発現のために濃縮することもできる。

#### 【0320】

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

#### 【0321】

いくつかの態様において、類似のアッセイを使用して、CARまたはTCR単独を含有する改変されたT細胞の機能を、CARまたはTCRおよびTIP構築物を含有するものと比較することができる。典型的には、これらのインビトロアッセイは、種々の比率の改変されたT細胞および同族CARまたはTCR抗原を含有する「腫瘍」細胞株と一緒に培養下でプレーティングすることによって実施される。標準エンドポイントは、腫瘍株の溶解率、改変されたT細胞の増殖、または培養上清中のIFN- 産生である。同じTCRまたはCAR構築物単独に対して、統計的に有意な腫瘍株の溶解の増加、改変されたT細胞の増殖の増加、またはIFN- 産生の増加をもたらした改変された免疫調節タンパク質を選択することができる。改変されたヒトT細胞を、マウスのT、NKおよびB細胞を欠いているNSG系統のような免疫不全マウスで分析することができる。CARまたはTCRが異種移植片上の標的カウター構造体に結合しかつTIPの親和性改変IgSFドメインと共発現する改変されたヒトT細胞を、異種移植片と比較して異なる細胞数および比率にてインビボで養子移入することができる。例えば、ルシフェラーゼ/GFPベクターを含有するCD19<sup>+</sup>白血病腫瘍株の生着を、生物発光によりまたはエキスピボでフローサイトメトリーによってモニタリングすることができる。ある共通の態様において、異種移植片がネズミモデルに導入され、続いて数日後に改変されたT細胞が導入される。免疫調節タンパク質を含有する改変されたT細胞を、CARまたはTCR単独を含有する改変されたT細胞と比べて、増加した生存、腫瘍クリアランス、または改変されたT細胞の増殖数についてアッセイすることができる。インビトロアッセイと同様に、内因性の天然（すなわち、改変されていない）ヒトT細胞を共養子移入して、その集団において、より良好な生存または腫瘍クリアランスをもたらすエプITOブ拡散の成功を予測することもできる。

#### 【0322】

E. バリエーションポリペプチドおよび免疫調節タンパク質を発現する感染性物質

また、本明細書に記載の分泌性または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばCD80 vIgDポリペプチドのいずれかをコードする核酸を含有する感染性物質が提供される。いくつかの態様において、そのような感染性物質は、本明細書に記載のバリエーション免疫調節ポリペプチド、例えばCD80 vIgDポリペプチドをコードする核酸を、対象の標的細胞、例えば、対象の免疫細胞および/もしくは抗原提示細胞（APC）または腫瘍細胞に送達することができる。また、そのような感染性物質に含有される核酸、お

10

20

30

40

50

よび/または、そのような感染性物質の生成もしくは改変のための核酸、例えばベクターおよび/またはプラスミド、ならびにそのような感染性物質を含有する組成物が提供される。

【0323】

いくつかの態様において、感染性物質は、微生物または病原菌である。いくつかの態様において、感染性物質は、ウイルスまたは細菌である。いくつかの態様において、感染性物質は、ウイルスである。いくつかの態様において、感染性物質は、細菌である。いくつかの態様において、そのような感染性物質は、本明細書に記載の分泌性または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばCD80 vlgDポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を送達することができる。したがって、いくつかの態様において、感染性物質に感染されるまたは接触される対象の細胞は、バリエーション免疫調節ポリペプチドを細胞表面上に発現させるかまたは分泌させることができる。いくつかの態様において、感染性物質はまた、1つまたは複数の他の治療薬または他の治療薬をコードする核酸を対象内の細胞および/または環境に送達することもできる。いくつかの態様において、感染性物質によって送達されることができる他の治療薬は、サイトカインまたは他の免疫調節分子を含む。

10

【0324】

いくつかの態様において、感染性物質、例えば、ウイルスまたは細菌は、本明細書に記載の分泌性または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばCD80 vlgDポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を含有し、対象の細胞の接触および/または感染によって、細胞は、感染性物質に含有される核酸配列によってコードされている分泌性または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばCD80 vlgDポリペプチドを発現する。いくつかの態様において、感染性物質を対象に投与することができる。いくつかの態様において、感染性物質を対象由来の細胞にエクスピボで形質導入することができる。

20

【0325】

いくつかの態様において、感染性物質によって感染された細胞によって発現する膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばCD80 vlgDポリペプチドは、膜貫通型タンパク質であり、表面に発現する。いくつかの態様において、感染性物質によって感染された細胞によって発現される分泌性免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばCD80 vlgDポリペプチドは、細胞から発現されかつ分泌される。膜貫通型免疫調節タンパク質または分泌された免疫調節タンパク質は、本明細書に記載のいずれかであることができる。

30

【0326】

いくつかの態様において、感染性物質によって標的化される対象の細胞は、腫瘍細胞、免疫細胞、および/または抗原提示細胞（APC）を含む。いくつかの態様において、感染性物質は、腫瘍微小環境（TME）にある細胞を標的化する。いくつかの態様において、感染性物質は、分泌性または膜貫通型免疫調節タンパク質を含むバリエーションポリペプチド、例えばCD80 vlgDポリペプチドをコードする核酸を、適切な細胞（例えば、APC、例えばペプチド/MHC複合体をその細胞表面上に提示する細胞、例えば樹状細胞）または組織（例えば、リンパ系組織）に送達し、それにより、所望の効果、例えば、免疫調節および/または特異的な細胞媒介性免疫応答、例えば、CD4および/またはCD8 T細胞応答を誘導するかつ/または増強させ、そのCD8 T細胞応答は、細胞傷害性T細胞（CTL）応答を含み得る。いくつかの態様において、感染性物質は、APC、例えば樹状細胞（DC）を標的化する。いくつかの態様において、本明細書に記載の感染性物質によって送達される核酸分子は、バリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする機能的に連結されたコード配列の特定の標的細胞における発現に必要な適切な核酸配列、例えば、調節エレメント、例えばプロモーターを含む。

40

【0327】

いくつかの態様において、免疫調節ポリペプチドをコードする核酸配列を含有する感染性物質はまた、1つまたは複数の追加の遺伝子産物、例えば、サイトカイン、プロドラッ

50

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

【0328】

#### 1. ウイルス

いくつかの態様において、感染性物質は、ウイルスである。いくつかの態様において、感染性物質は、腫瘍溶解性ウイルス、または、特定の細胞、例えば免疫細胞を標的化するウイルスである。いくつかの態様において、感染性物質は、対象の腫瘍細胞および/またはがん細胞を標的化する。いくつかの態様において、感染性物質は、免疫細胞または抗原提示細胞（APC）を標的化する。

【0329】

いくつかの態様において、感染性物質は、腫瘍溶解性ウイルスである。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞に蓄積しかつ腫瘍細胞において複製するウイルスである。細胞における複製、および本明細書に記載のバリエーション免疫調節バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸の任意の送達によって、腫瘍細胞は溶解され、腫瘍は縮小し、排除されることができる。腫瘍溶解性ウイルスは、広範な宿主および細胞タイプの範囲を有することができる。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍および/または転移を含みまた創傷組織および細胞も含む、免疫特権を有する細胞または免疫特権を有する組織に蓄積し、したがって、本明細書に記載のバリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする核酸の広範な細胞タイプにおける送達および発現が可能となる。腫瘍溶解性ウイルスはまた、腫瘍細胞特異的に複製し、その結果、腫瘍細胞溶解および効率的な腫瘍退縮をもたらすことができる。

【0330】

例示的な腫瘍溶解性ウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口腔ウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パルボウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、コクサッキーウイルスおよびワクシニアウイルスを含む。いくつかの態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、他の臓器に感染することなく固体腫瘍に特異的に定着することができ、これを感染性物質として使用して、本明細書に記載のバリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする核酸をそのような固体腫瘍に送達することができる。

【0331】

本明細書に記載のバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸を送達する際に使用するための腫瘍溶解性ウイルスは、当業者に公知のもののいずれかであることができ、例えば、水疱性口内炎ウイルス（vesicular stomatitis virus）

10

20

30

40

50



(例えば、米国特許第7,731,974号、第7,153,510号、第6,653,103号、および米国特許出願公開第2010/0178684号、第2010/0172877号、第2010/0113567号、第2007/0098743号、第20050260601号、第20050220818号、および欧州特許第1385466号、第1606411号および第1520175号を参照のこと) ; 単純ヘルペスウイルス(例えば、米国特許第7,897,146号、第7,731,952号、第7,550,296号、第7,537,924号、第6,723,316号、第6,428,968号、および米国特許出願公開第2014/0154216号、第2011/0177032号、第2011/0158948号、第2010/0092515号、第2009/0274728号、第2009/0285860号、第2009/0215147号、第2009/0010889号、第2007/0110720号、第2006/0039894号、第2004/0009604号、第2004/0063094号、国際特許公開WO 2007/052029、WO 1999/038955を参照のこと) ; レトロウイルス(10  
例えば、米国特許第6,689,871号、第6,635,472号、第5,851,529号、第5,716,826号、第5,716,613号および米国特許出願公開第20110212530号を参照のこと) ; ワクシニアウイルス(例えば、2016/0339066号を参照のこと)、およびアデノ随伴ウイルス(例えば、米国特許第8,007,780号、第7,968,340号、第7,943,374号、第7,906,111号、第7,927,585号、第7,811,814号、第7,662,627号、第7,241,447号、第7,238,526号、第7,172,893号、第7,033,826号、第7,001,765号、第6,897,045号、および第6,632,670号を参照のこと)を含む。

#### 【0332】

腫瘍溶解性ウイルスはまた、それらの病原性を減弱し、それらの安全性プロファイルを改善し、それらの腫瘍特異性を増強するように遺伝子が改変されているウイルスを含み、20  
そして、これらはまた、ウイルスの有効性全体を改善する追加の遺伝子、例えば細胞毒素、サイトカイン、プロドラッグ変換酵素を備えている(例えば、Kirn et al., (2009) Nat Rev Cancer 9:64-71; Garcia-Aragoncillo et al., (2010) Curr Opin Mol Ther 12:403-411を参照のこと ; 米国特許第7,588,767号、第7,588,771号、第7,662,398号および第7,754,221号、ならびに米国特許出願公開第2007/0202572号、第2007/0212727号、第2010/0062016号、第2009/0098529号、第2009/0053244号、第2009/0155287号、第2009/0117034号、第2010/0233078号、第2009/0162288号、第2010/0196325号、第2009/0136917号および第2011/0064650号を参照のこと)。いくつかの態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、がん性細胞において選択的に複製するように改変されており、したがって腫瘍溶解性である、ウイルスであることができる30  
。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍治療のためのまた遺伝子治療ベクターとしての改変された指向性を有するように改変されているアデノウイルスである。その例示は、ONYX-015、H101およびAd5 CR (Hallden and Portella (2012) Expert Opin Ther Targets, 16:945-58) ならびにTNFerade (McLoughlin et al. (2005) Ann. Surg. Oncol., 12:825-30)、または制限増殖型アデノウイルスOncorine(登録商標)である。

#### 【0333】

いくつかの態様において、感染性物質は、改変された単純ヘルペスウイルスである。いくつかの態様において、感染性物質は、本明細書に記載のバリエーション免疫調節ポリペプチドのうちのいずれか(例えば、本明細書に記載のバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質のうちのいずれか)をコードする核酸を含有するよう改変された、タリ30  
モジーン・ラハーパレブベック(Talimogene laherparepvec)(T-Vec、ImlygicまたはOncoVex GM-CSFとしても公知)の改変されたバージョンである。いくつかの態様において、感染性物質は、例えば、WO 2007/052029、WO 1999/038955、US 2004/0063094、US 2014/0154216に記載されている改変された単純ヘルペスウイルス、またはそのバリエーションである。

#### 【0334】

いくつかの態様において、感染性物質は、ウイルスが投与される対象の特定タイプの細胞を標的化するウイルス、例えば、免疫細胞または抗原提示細胞(APC)を標的化するウイルスである。樹状細胞(DC)は、免疫応答の開始および制御に必須のAPCである。DCは、抗原を捕捉およびプロセッシングし、末梢からリンパ系臓器へ移動し、抗原を静止T細胞40  
50

胞に主要組織適合性複合体（MHC）拘束様式で提示することができる。いくつかの態様において、感染性物質は、DCを特異的に標的化してDCにおける発現のためにバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸を送達できる、ウイルスである。いくつかの態様において、ウイルスは、レンチウイルスまたはそのバリエーションである。いくつかの態様において、ウイルスは、細胞表面マーカーである樹状細胞特異的細胞間接着分子-3-結合ノンインテグリン（DC-SIGN）を発現する細胞、例えばDCに効率的に結合して生産的に感染するよう偽型化された、レンチウイルスである。いくつかの態様において、ウイルスは、シンドビスウイルスE2糖タンパク質で偽型化されたレンチウイルス、例えばWO 2013/149167に記載されているものである。いくつかの態様において、ウイルスは、関心対象の配列（例えば、本明細書に記載のバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質のいずれかをコードする核酸）のDCへの送達および発現を可能にする。いくつかの態様において、ウイルスは、WO 2008/011636もしくはUS 2011/0064763に記載されているもの、またはそのバリエーションを含む。

【0335】

## 2. 細菌

いくつかの態様において、感染性物質は、細菌である。例えば、いくつかの態様において、細菌は、本明細書に記載のバリエーション免疫調節ポリペプチドのいずれか、例えば、バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸を、対象の標的細胞、例えば腫瘍細胞、免疫細胞、抗原提示細胞および/または食細胞に送達することができる。いくつかの態様において、細菌は、バリエーション免疫調節ポリペプチドの発現および/もしくは分泌のため、ならびに/または、バリエーション免疫調節ポリペプチドの発現のために環境の特異的細胞を標的化するため、対象内の特定の環境、例えば腫瘍微小環境（TME）に優先的に標的化されることができる。

【0336】

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

【0337】

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

## 【 0 3 3 8 】

いくつかの態様において、感染性物質は、リステリア属 (*Listeria* sp.)、ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium* sp.)、エシェリキア属 (*Escherichia* sp.)、クロストリジウム属 (*Closteridium* sp.)、サルモネラ属 (*Salmonella* sp.)、シゲラ属 (*Shigella* sp.)、ビブリオ属 (*Vibrio* sp.) またはエルシニア属 (*Yersinia* sp.) である細菌である。いくつかの態様において、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、サルモネラ・コレラエスイス (*Salmonella choleraesuis*)、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、ビブリオ・コレラ (*Vibrio cholera*)、クロストリジウム・パーFRINGENS (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、クロストリジウム・ノビイ (*Clostridium novyi*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、ビフィドバクテリウム・インファントリス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) およびビフィドバクテリウム・アドレセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*) の1つまたは複数の中から選択される。いくつかの態様において、細菌は、改変された細菌である。いくつかの態様において、細菌は、改変された細菌、例えば、Seow and Wood (2009) *Molecular Therapy* 17(5):767-777; Baban et al. (2010) *Bioengineered Bugs* 1:6, 385-394; Patyar et al. (2010) *J Biomed Sci* 17:21; Tangney et al. (2010) *Bioengineered Bugs* 1:4, 284-287; van Pijkeren et al. (2010) *Hum Gene Ther.* 21(4):405-416; WO 2012/149364; WO 2014/198002; US 9103831; US 9453227; US 2014/0186401; US 2004/0146488; US 2011/0293705; US 2015/0359909 および EP 3020816 に記載されているものである。細菌は、本明細書において提供されるバリエーション免疫調節ポリペプチド、コンジュゲートおよび/または融合体のいずれかをコードする核酸配列を送達するように、かつ/またはそのようなバリエーション免疫調節ポリペプチドを対象において発現するように、改変されることができる。

10

20

## 【 0 3 3 9 】

F. ポリペプチドを生産するための核酸、ベクターおよび方法または細胞

本明細書において提供されるバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドの種々の提供される態様のいずれかをコードする、単離されたまたは組換え核酸(「核酸」と総称される)が本明細書において提供される。いくつかの態様において、後述の全てを含む本明細書において提供される核酸は、本明細書において提供されるバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドの組換え産生(例えば、発現)に有用である。いくつかの態様において、後述の全てを含む本明細書において提供される核酸は、本明細書において提供されるバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドの細胞、例えば改変細胞、例えば免疫細胞、または感染性物質細胞における発現に有用である。本明細書において提供される核酸は、RNAの形態またはDNAの形態にあることができ、mRNA、cRNA、組換えまたは合成RNAおよびDNA、ならびにcDNAを含むことができる。本明細書において提供される核酸は、典型的には、DNA分子、通常二本鎖のDNA分子である。しかしながら、本発明のヌクレオチド配列のうちのいずれかを含む、一本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、およびハイブリッドDNA/RNA核酸またはその組み合わせも提供される。

30

40

## 【 0 3 4 0 】

また、本明細書において提供されるバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドを生産する際に有用な、組換え発現ベクターおよび組換え宿主細胞が本明細書において提供される。

## 【 0 3 4 1 】

また、提供される核酸分子のうちのいずれかまたはコードされるバリエーションCD80ポリペプチドもしくは免疫調節ポリペプチド(例えば、膜貫通型免疫調節ポリペプチドもしくは分泌性免疫調節ポリペプチドのうちのいずれか)を含有する改変細胞(例えば、改変さ

50

れた免疫細胞)が本明細書において提供される。

#### 【0342】

また、提供される核酸分子のうちのいずれかまたはコードされるバリエーションCD80ポリペプチドもしくは免疫調節ポリペプチド(例えば、膜貫通型免疫調節ポリペプチドもしくは分泌性免疫調節ポリペプチドのうちのいずれか)を含有する感染性物質(例えば、細菌またはウイルス細胞)が本明細書において提供される。

#### 【0343】

上に提供される態様のいずれかにおいて、本明細書において提供される免疫調節ポリペプチドをコードする核酸を、組換えDNAおよびクローニング技術を使用して細胞に導入することができる。そのようにするために、免疫調節ポリペプチドをコードする組換えDNA分子が調製される。そのようなDNA分子を調製する方法は、当技術分野において周知である。例えば、ペプチドをコードする配列を、好適な制限酵素を使用してDNAから切り取ることもできる。あるいは、ホスホロアミダイト法のような化学合成技術を使用してDNA分子を合成することもできる。また、これらの技術の組み合わせを使用することもできる。いくつかの場合で、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により組換えまたは合成核酸を生成してよい。いくつかの態様において、少なくとも1つの親和性改変IgSFドメインと、いくつかの態様において、シグナルペプチド、膜貫通ドメイン、および/またはエンドドメインを含有する1つまたは複数のバリエーションCD80ポリペプチドをコードするDNAインサートを、提供される説明に従って生成することができる。このDNAインサートを、当業者に公知のとおり、適切な形質導入/トランスフェクションベクターにクローニングすることができる。また、当該核酸分子を含有する発現ベクターも提供される。

#### 【0344】

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

#### 【0345】

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

#### 【0346】

いくつかの態様において、構成的プロモーターは、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸分子に機能的に連結されている。例示的な構成的プロモーターは、サル空胞ウイルス40(SV40)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ユビキチンC(UbC)プロモーター、およびEF-1アルファ(EF1a)プロモーターを含む。いくつかの態様において、構成的プロモーターは、組織特異的である。例えば、いくつかの態様において、プロモーターは、免疫調節タンパク質の特定の組織、例えば免疫細胞、リンパ球、またはT細胞における構成的発現を可能にする。例えば、フェトタンパク質、DF3、チロシナーゼ、CEA、界面活性タンパク質、およびErbB2プロモーターを含む、例示的な組織特異的プロモーターが米国特許第5,998,205号に記載されている。

#### 【0347】

いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、転写の適切な誘導因子の存在または非存在を制御することによって核酸の発現が制御可能であるように、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸分子に機能的に連結されている。例えば、プロモーターは、コードされているポリペプチドの調節された発現を可能にする、調節されたプロモーターおよび転写因子発現系、例えば公開されているテトラサイクリンで調節された系または他の調節可能な系（例えば、公開されている国際PCT出願WO 01/30843を参照のこと）であることができる。例示的な調節可能なプロモーター系は、例えばClontech (Palo Alto, CA) から入手可能なTet-On（およびTet-Off）系である。このプロモーター系は、テトラサイクリンまたはテトラサイクリン誘導体、例えばドキシサイクリンによって制御される、導入遺伝子の調節された発現を可能にする。他の調節可能なプロモーター系は公知である（例えば、リガンド結合ドメインおよび転写調節ドメイン、例えばホルモン受容体由来のものを含有する遺伝子スイッチを説明している「Regulation of Gene Expression Using Single-Chain, Monomeric, Ligand Dependent Polypeptide Switches」という表題の公開されている米国特許出願第2002-0168714号を参照のこと）。

#### 【0348】

いくつかの態様において、プロモーターは、T細胞活性化シグナル伝達に応答性のエレメントに応答性である。一例として、いくつかの態様において、改変されたT細胞は、免疫調節タンパク質および免疫調節タンパク質の制御発現に機能的に連結されたプロモーターをコードする発現ベクターを含む。改変されたT細胞を、例えば、改変されたT細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）によるシグナル伝達によって活性化することができ、それによって、応答性プロモーターによる免疫調節タンパク質の発現および分泌を引き起こすことができる。

#### 【0349】

いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、免疫調節タンパク質が活性化されたT細胞の核因子（NFAT）または活性化されたB細胞の核因子 軽鎖エンハンサー（NF- $\kappa$ B）に応答して発現するように、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子に機能的に連結されている。例えば、いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、NFATまたはNF- $\kappa$ Bの結合部位を含む。例えば、いくつかの態様において、プロモーターは、NFATもしくはNF- $\kappa$ Bプロモーター、またはその機能的バリエーションである。したがって、いくつかの態様において、核酸は、また免疫調節タンパク質の毒性を低減または排除しながら、免疫調節タンパク質の発現を制御することを可能にする。特に、本発明の核酸を含む改変された免疫細胞は、細胞（例えば、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する細胞）が抗原によって特異的に刺激されるとき、および/または、細胞（例えば、細胞のカルシウムシグナル伝達経路）が、例えば、ホルボールミリストアセテート（PMA）/イオノマイシンによって非特異的に刺激されるときにだけ、免疫調節タンパク質を発現および分泌する。したがって、免疫調節タンパク質の発現、およびいくつかの場合では分泌を、それが必要な時と場合に（例えば、感染症を引き起こす物質の、がんの存在下、または腫瘍部位で）だけ起こるように制御することができ、それで望ましくない免疫調節タンパク質相互作用を減少または回避することができる。

#### 【0350】

いくつかの態様において、本明細書に記載の免疫調節タンパク質をコードする核酸は、NFATプロモーター、NF- $\kappa$ Bプロモーター、またはその機能的バリエーションをコードする好適なヌクレオチド配列を含む。「NFATプロモーター」は、本明細書において使用される場合、最小プロモーターに連結された1つまたは複数のNFAT応答性エレメントを意味する。「NF- $\kappa$ Bプロモーター」は、最小プロモーターに連結された1つまたは複数のNF- $\kappa$ B応答性エレメントを指す。いくつかの態様において、遺伝子の最小プロモーターは、最小ヒトIL-2プロモーターまたはCMVプロモーターである。NFAT応答性エレメントは、例えば、NFAT1、NFAT2、NFAT3、および/またはNFAT4応答性エレメントを含み得る。NFATプロモーター、NF- $\kappa$ Bプロモーター、またはその機能的バリエーションは、任意の数の結合

モチーフ、例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、または最大で12個の結合モチーフを含み得る。

#### 【0351】

DNA分子をその上に有する得られた組換え発現ベクターを使用して、適切な宿主を形質転換する。当技術分野において周知の方法を使用してこの形質転換を実施することができる。いくつかの態様において、本明細書において提供される核酸は、結果として得られる可溶性免疫調節ポリペプチドが培養培地、宿主細胞、または宿主細胞ペリプラズムから回収されるように、免疫調節ポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結された分泌性またはシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。他の態様において、免疫調節ポリペプチドの膜発現が可能となるように適切な発現制御シグナルが選択される。さらに、市販のキットおよび委託製造会社を利用して、本明細書において提供される改変細胞または組換え宿主細胞を製造することもできる。

10

#### 【0352】

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

20

#### 【0353】

哺乳動物T細胞またはAPCを含む多数の公的に入手可能で周知の哺乳動物宿主細胞のいずれかを、ポリペプチドまたは改変細胞を調製する際に使用することができる。細胞の選択は、当技術分野によって認識される多数の要因に依存する。これらは、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、DNA分子によってコードされているペプチドの毒性、形質転換率、ペプチドの回収の容易さ、発現特性、生物安全性およびコストを含む。これらの要因のバランスは、全ての細胞が特定のDNA配列の発現に等しく効果的であるとは限らないという理解に立たなければならない。

#### 【0354】

いくつかの態様において、宿主細胞は、酵母細胞のような多種多様な真核細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）またはHEK293細胞のような哺乳動物細胞であることができる。宿主細胞はまた、大腸菌（*E. coli*）のような原核細胞であることもできる。形質転換された組換え宿主は、ポリペプチドを発現する条件下で培養され、次いで精製されて可溶性タンパク質を得る。組換え宿主細胞を、所望のポリペプチドを発現するような慣用の発酵条件下で培養することができる。そのような発酵条件は、当技術分野において周知である。最後に、本明細書において提供されるポリペプチドを、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、および親和性クロマトグラフィーを含む当技術分野において周知の多数の方法のいずれかによって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。所望であれば、成熟タンパク質の立体配置の完成においてタンパク質のリフォールディング工程を使用することができる。最後に、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）を最終精製工程に採用することができる。

30

40

#### 【0355】

いくつかの態様において、細胞は、免疫細胞、例えば改変細胞の調製と関連して上記したいずれかである。いくつかの態様において、そのような改変細胞は、初代細胞である。いくつかの態様において、改変細胞は、対象にとって自家である。いくつかの態様において、改変細胞は、対象にとって同種である。いくつかの態様において、改変細胞を、対象から、例えば白血球除去療法によって得て、これを免疫調節ポリペプチド、例えば、膜貫通型免疫調節ポリペプチドまたは分泌性免疫調節ポリペプチドの発現のためにエキスビボ

50

で形質転換する。

【0356】

また、本明細書に記載の感染性物質に含有されるバリエーション免疫調節ポリペプチドのいずれかをコードする核酸が提供される。いくつかの態様において、感染性物質は、核酸を対象の細胞に送達し、かつ/または、コードされているバリエーションポリペプチドの細胞における発現を許容する。また、そのような感染性物質を生成する、産生する、または調節するために使用される核酸も提供される。例えば、いくつかの態様において、感染性物質の生成、対象の細胞への送達および/またはバリエーション免疫調節ポリペプチドの対象の細胞における発現のための、バリエーション免疫調節ポリペプチドをコードする核酸を含有するベクターおよび/またはプラスミドが提供される。

10

【0357】

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

【0358】

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

20

【0359】

いくつかの態様において、組換えベクターは、ウイルスベクターである。例示的な組換えウイルスベクターは、レンチウイルスベクターゲノム、ポックスウイルスベクターゲノム、ワクシニアウイルスベクターゲノム、アデノウイルスベクターゲノム、アデノウイルス随伴ウイルスベクターゲノム、ヘルペスウイルスベクターゲノム、およびアルファウイルスベクターゲノムを含む。ウイルスベクターは、生ウイルスベクター、弱毒化ウイルスベクター、複製コンディショナルもしくは複製欠損ウイルスベクター、非病原性（欠陥）ウイルスベクター、複製能力のあるウイルスベクターであることができ、かつ/または、異種の遺伝子産物、例えば、本明細書において提供されるバリエーション免疫調節ポリペプチドを発現するように改変される。ウイルスの生成のためのベクターはまた、転写または翻訳負荷を増加または減少する任意の方法を含め、ウイルスの弱毒化を変更するように改変されることができる。

30

【0360】

使用することができる例示的なウイルスベクターは、改変されたワクシニアウイルスベクター（例えば、Guerra et al., J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8: 1445-47 (1992); Gheradi et al., J. Gen. Virol. 86:2925-36 (2005); Mayr et al., Infection 3:6-14 (1975); Hu et al., J. Virol. 75: 10300-308 (2001); 米国特許第5,698,530号、第6,998,252号、第5,443,964号、第7,247,615号および第7,368,116号を参照のこと）；アデノウイルスベクターまたはアデノウイルス随伴ウイルスベクター（例えば、Molin et al., J. Virol. 72:83 58-61 (1998); Narumi et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19:936-41 (1998);

40

50

Mercier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6188-93 (2004); 米国特許第6,143,290号; 第6,596,535第; 第6,855,317第; 第6,936,257第; 第7,125,717第; 第7,378,087第; 第7,550,296第を参照のこと); ネズミ白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、同種指向性レトロウイルス、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、および組み合わせに基づくものを含むレトロウイルスベクター (例えば、Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-39 (1992); Johann et al., J. Virol. 66: 1635-40 (1992); Sommerfelt et al., Virology 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-78 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-24 (1991); Miller et al., Mol. Cell Biol. 10:4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4:43 1992; Cornetta et al., Hum. Gene Ther. 2:215 (1991) を参照のこと); ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1)、HIV-2、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、馬伝染性貧血ウイルス、サル免疫不全ウイルス (SIV)、およびマエディ/ピスナウイルスに基づくものを含むレンチウイルスベクター (例えば、Pfeifer et al., Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211 (2001); Zufferey et al., J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150, 1998; Philpott and Thrasher, Human Gene Therapy 18:8, 2007; Engelman et al., J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale et al., Mol. Therapy, 13: 1121, 2006; Brown et al., J. Virol. 73:9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams et al., J. Virol. 77: 11150, 2003; Powell et al., J. Virol. 70:5288, 1996を参照のこと) もしくはその任意のバリエーション、および/または上記のウイルスのいずれかを生成するために使用できるベクターを含む。いくつかの態様において、組換えベクターは、例えばRNAウイルスの場合、パッケージング細胞株において、ウイルスゲノムの発現を調節することができる、調節配列、例えばプロモーターまたはエンハンサー配列を含むことができる (例えば、米国特許第5,385,839号および第5,168,062号を参照のこと)。

#### 【0361】

いくつかの態様において、組換えベクターは、発現ベクター、例えば、標的細胞、例えば対象の細胞、例えば腫瘍細胞、免疫細胞および/またはAPCに送達されたときにコードされている遺伝子産物の発現を許容する、発現ベクターである。いくつかの態様において、感染性物質に含有される組換え発現ベクターは、対象の標的細胞において、タンパク質の発現に適する条件下で、免疫調節タンパク質を発現することができる。

#### 【0362】

いくつかの局面において、核酸または発現ベクターは、適切な発現制御配列に機能的に連結された免疫調節タンパク質をコードする核酸配列を含む。免疫調節タンパク質をコードする核酸配列がベクターに挿入される前か後かのいずれかのこの機能的連結に作用する方法は周知である。発現制御配列は、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル、および転写または翻訳の制御に関与する他のシグナルを含む。プロモーターは、免疫調節タンパク質をコードする核酸配列の部分に機能的に連結されることができる。いくつかの態様において、プロモーターは、標的細胞における構成的に活性なプロモーター (例えば、組織特異的な構成的に活性なプロモーターまたは他の構成的プロモーター) である。例えば、組換え発現ベクターはまた、リンパ系組織特異的な転写調節エレメント (TRE)、例えばBリンパ球、Tリンパ球、または樹状細胞特異的なTREを含み得る。リンパ系組織特異的なTREは、当技術分野において公知である (例えば、Thompson et al., Mol. Cell. Biol. 12:1043-53 (1992); Todd et al., J. Exp. Med. 177:1663-74 (1993); Penix et al., J. Exp. Med. 178:1483-96 (1993) を参照のこと)。いくつかの態様において、プロモーターは、誘導物質 (例えば、T細胞活性化シグナル) に応答性であり得る誘導性プロモーターである。いくつかの態様において、対象の標的細胞、例えば腫瘍細胞、免疫細胞および/またはAPCに送達される核酸は、上記の調節エレメントのいずれかに機能的に連結されることができる。

#### 【0363】



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

【0364】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるポリペプチドを合成法によって製造することもできる。固相合成は、低分子ペプチドを製造する最も費用対効果の良い方法であるので、個々のペプチドを製造する好ましい技術である。例えば、周知の固相合成技術は、保護基、リンカー、および固相支持体の使用、ならびに特定の保護および脱保護反応条件、リンカー切断条件、捕捉剤の使用、および固相ペプチド合成の他の局面を含む。次いで、ペプチドを本明細書において提供されるとおりのポリペプチドへと組み立てることができる。

【0365】

IV. バリエーションCD80ポリペプチドおよび免疫調節タンパク質の免疫調節活性を評価する方法

いくつかの態様において、本明細書において提供されるバリエーションCD80ポリペプチド（例えば、その完全長および/もしくは特異的結合断片またはコンジュゲート、スタック構築物または誘導体）は、T細胞活性化を調節する免疫調節活性を示す。いくつかの態様において、CD80ポリペプチドは、初代T細胞アッセイにおいて、野生型または未改変CD80対照と比べてIFN- 発現を調節する。いくつかの場合では、IFN- 発現の調節は、対照と比べて、IFN- 発現を増加または減少させることができる。特異的結合およびIFN- 発現を決定するアッセイは、当技術分野において周知であり、培養上清中のインターフェロン- サイトカインレベルを測定するMLR（混合リンパ球反応）アッセイ（Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56）、SEB（ブドウ球菌エンテロトキシンB）T細胞刺激アッセイ（Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56）、および抗CD3 T細胞刺激アッセイ（Li and Kurlander, J Transl Med. 2010; 8: 104）を含む。

【0366】

いくつかの態様において、バリエーションCD80ポリペプチドは、初代T細胞アッセイにおいて、野生型CD80対照と比べてIFN-（インターフェロン-）発現をいくつかの態様において増加させることができ、または代替態様において減少させることができる。可溶性バリエーションCD80配列を含有する提供されるポリペプチドのいくつかの態様において、該ポリペプチドは、初代T細胞アッセイにおいて、野生型CD80対照と比べてIFN- 発現を増加させることができ、代替態様においてはIFN- 発現を減少させることができる。複数のバリエーションCD80配列を含有する提供されるポリペプチドのいくつかの態様において、該ポリペプチドは、初代T細胞アッセイにおいて、野生型CD80対照と比べてIFN- 発現を増加させることができ、代替態様においてはIFN- 発現を減少させることができる。

【0367】

当業者は、IFN- 発現の増加を決定するために使用される初代T細胞アッセイのフォーマットが、IFN- 発現の減少をアッセイするために採用されるものと異なっていることができることを認識するだろう。初代T細胞アッセイにおいてIFN- 発現を減少させるバリエーションCD80の能力をアッセイする際に、混合リンパ球反応（MLR）アッセイを実施例6に記載のとおり使用することができる。いくつかの場合では、実施例6の記載と同じように、MLRにおけるIFN- 発現に拮抗しそれによってその発現を減少させるバリエーションCD80の能力を決定するために、可溶性形態のバリエーションCD80を採用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0368】

あるいは、初代T細胞アッセイにおいてIFN- 発現を増加させるバリエーションCD80の能力をアッセイする際に、同時固定アッセイを実施例6に記載のとおり使用することができる。同時固定アッセイでは、TCRシグナル（いくつかの態様において、抗CD3抗体によって提供される）を、同時固定されたバリエーションCD80と併用して、CD80対照と比べてIFN- 発現を増加させる能力が決定される。いくつかの場合では、実施例6の記載と同じように、MLRにおけるIFN- 発現を作動させ、それによってその発現を増加させるバリエーションCD80の能力を決定するために、多価結合を提供する程度まで多量化された可溶性形態のバリエーションCD80を採用することができる。

## 【0369】

適切な対照の使用は、当業者に公知であるが、前述の態様において、対照は、典型的には、未改変CD80、例えば、バリエーションCD80が由来したまたは発生した同じ哺乳動物種由来の野生型の天然CD80アイソフォームの使用を伴う。ICOSおよびCD28のうち的一方または両方への結合親和性が増加するか減少するかに関係なく、バリエーションCD80は、初代T細胞アッセイにおいて、いくつかの態様において野生型CD80対照と比べてIFN- 発現を増加させ、代替態様においてはIFN- 発現を減少させる。

## 【0370】

いくつかの態様において、バリエーションCD80は、野生型または未改変CD80対照と比べて、IFN- 発現（すなわち、タンパク質発現）を少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはより多く増加させる。他の態様において、バリエーションCD80は、野生型または未改変CD80対照と比べて、IFN- 発現（すなわち、タンパク質発現）を少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはより多く減少させる。いくつかの態様において、野生型CD80対照は、野生型ネズミCD80配列から配列が変化しているバリエーションCD80に典型的に使用されるような、ネズミCD80である。いくつかの態様において、野生型CD80対照は、野生型ヒトCD80配列、例えばSEQ ID NO:28、SEQ ID NO:152、またはSEQ ID NO:372のアミノ酸配列を含むCD80配列から配列が変化しているバリエーションCD80に典型的に使用されるような、ヒトCD80である。

## 【0371】

## V. 薬学的製剤

本明細書に記載のバリエーションCD80ポリペプチド、免疫調節タンパク質、コンジュゲート、改変細胞または感染性物質のいずれかを含有する組成物が本明細書において提供される。薬学的組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤をさらに含むことができる。例えば、薬学的組成物は、例えば、組成物の、pH、オスモル濃度、粘性、透明性、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解もしくは放出の速度、吸着、または浸透を調節、維持、または保存するための1つまたは複数の賦形剤を含有することができる。いくつかの局面において、当業者は、細胞を含有する薬学的組成物がタンパク質を含有する薬学的組成物と異なっていることを理解する。

## 【0372】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、固体、例えば粉末、カプセル、または錠剤である。例えば、薬学的組成物の成分を凍結乾燥することができる。いくつかの態様において、固体薬学的組成物は、投与の前に液体中で再構成されるかまたは溶解される。

## 【0373】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、液体、例えば、水溶液（例えば、生理食塩水またはリンゲル液）に溶解されたバリエーションCD80ポリペプチドである。いくつかの態様において、薬学的組成物のpHは、約4.0～約8.5（例えば、約4.0～約5.0、約4.5～約5.5、約5.0～約6.0、約5.5～約6.5、約6.0～約7.0、約6.5～約7.5、約7.0～約8.0、または約7.5～約8.5）である。

## 【0374】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤、例えば充填剤

10

20

30

40

50

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

10

#### 【0375】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、生成物の制御されたまたは持続された放出のための物質、例えば注射用マイクロスフェア、生体内分解性粒子、高分子化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、ビーズ、またはリボソームをさらに含む。

20

#### 【0376】

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

#### 【0377】

いくつかの態様において、そのような膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する改変細胞を含む、膜貫通型免疫調節タンパク質を含有する薬学的組成物が提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物および製剤は、1つまたは複数の任意の薬学的に許容し得る担体または賦形剤を含む。そのような組成物は、緩衝液、例えば中性の緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水など；糖質、例えばグルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン；酸化防止剤；キレート剤、例えばEDTAまたはグルタチオン；補助剤（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存料を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与用に製剤化される。

30

#### 【0378】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、免疫調節バリエーションポリペプチドをコードする核酸配列を含有する感染性物質を含有する。いくつかの態様において、薬学的組成物は、処置に好適である対象への投与に好適な感染性物質の用量を含有する。いくつかの態様において、薬学的組成物は、ウイルスである感染性物質を、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ もしくは約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ プラーク形成単位（pfu）、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$  pfuもしくは約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu、または $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  pfuもしくは約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  pfuを各々包含する、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$  pfuまたは約 $1 \times 10^{10}$  pfuの単一または複数の投与量で含有する。いくつかの態様において、薬学的組成物は、 $10^5 \sim 10^{10}$ もしくは約 $10^5 \sim 10^{10}$  pfu/mL、例えば、 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$ もしくは約 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$ 、または $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ もしくは約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  pfu/mL、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約、 $10^6$  pfu/mL、 $10^7$  pfu/mL、 $10^8$  pfu/

40

50

mLまたは $10^9$  pfu/mLのウイルス濃度を含有することができる。いくつかの態様において、薬学的組成物は、細菌である感染性物質を、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$ もしくは約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$ コロニー形成単位(cfu)、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$  cfuもしくは約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$  cfu、または $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  cfuもしくは約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  cfuを各々包含する、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ または $1 \times 10^9$  cfuの単一または複数の投与量で含有する。いくつかの態様において、薬学的組成物は、 $10^3 \sim 10^8$ もしくは約 $10^3 \sim 10^8$  cfu/mL、例えば、 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ もしくは約 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ 、または $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ もしくは約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  cfu/mL、例えば、少なくとも、または少なくとも約、または約、 $10^5$  cfu/mL、 $10^6$  cfu/mL、 $10^7$  cfu/mLまたは $10^8$  cfu/mLの細菌濃度を含有することができる。

10

**【0379】**

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

20

**【0380】**

いくつかの態様において、薬学的組成物は、対象に投与される。概して、薬学的組成物の投与量および投与経路は、対象のサイズおよび状態に応じて、標準的な薬務に従って決定される。例えば、最初に、細胞培養アッセイ、またはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、もしくはサルのような動物モデルのいずれかで治療有効用量を推定することができる。また、適切な濃度範囲および投与経路を決定するために動物モデルを使用してもよい。次いで、そのような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量および投与経路を決定することができる。正確な投与量は、対象が必要とする処置に関連する要因に照らして決定されるだろう。投与量および投与は、活性化化合物の十分なレベルを提供するようにまたは所望の効果を維持するように調整される。考慮され得る要因は、疾患状態の重症度、対象の総体的な健康、対象の年齢、体重、および性別、投与の時間および頻度、薬物併用、反応感度、ならびに治療への応答を含む。

30

**【0381】**

長期作用型薬学的組成物は、特定の製剤の半減期およびクリアランス率に応じて、3～4日毎、毎週、または隔週で投与してよい。投薬頻度は、使用される製剤中の分子の薬物動態パラメーターに依存するだろう。典型的には、組成物は、所望の効果を達成する投与量に達するまで投与される。それゆえ、組成物を、単回用量としてもしくは複数回用量として（同じまたは異なる濃度/投与量で）経時的に、または持続注入として投与してよい。適切な投与量のさらなる改良がルーチンに行われる。適切な用量-応答データの使用を通して適切な投与量を突き止めてよい。T細胞活性化もしくは増殖、サイトカイン合成もしくは産生（例えば、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2の産生）、種々の活性化マーカー（例えば、CD25、IL-2受容体）の誘導、炎症、関節の腫脹もしくは圧痛、C-反応性タンパク質の血清中レベル、抗コラーゲン抗体産生、および/またはT細胞依存性抗体応答を含む、治療効果についての多数のバイオマーカーまたは生理学的マーカーをモニタリングすることができる。

40

**【0382】**

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

50

## 【0383】

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

10

## 【0384】

いくつかの態様において、投与される薬学的組成物の用量は、対象の体重1kg当たりタンパク質約1 $\mu$ g以上（例えば、対象の体重1kg当たりタンパク質約2 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約5 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約10 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約25 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約50 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約100 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約250 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約500 $\mu$ g以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約1mg以上、対象の体重1kg当たりタンパク質約2mg以上、または対象の体重1kg当たりタンパク質約5mg以上）である。

## 【0385】

いくつかの態様において、細胞組成物の治療量が投与される。典型的には、投与されるべき本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の範囲、および状態の個々の違いを考慮して医師が決定することができる。概して、本明細書に記載のとおりの変換細胞、例えばT細胞を含む薬学的組成物を、 $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞/kg（体重）、例えば $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞/kg（体重）の投与量（これらの範囲内の全ての整数値を含む）で投与してよいと規定することができる。また、変換された細胞組成物、例えばT細胞組成物をこれらの投与量で複数回投与してよい。該細胞を、免疫療法において通常知られている注入技術を使用することによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988 を参照のこと）。特定の患者に対する最適な投与量および処置レジメンは、医学分野の当業者が、患者の疾患の兆候をモニタリングし、それに応じて処置を調整することによって、容易に決定することができる。

20

30

## 【0386】

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

40

50

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

【0387】

#### VI. 製造品およびキット

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

【0388】

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

【0389】

#### VII. 治療用途

本明細書に記載の薬学的組成物（本明細書に記載のバリエーションCD80ポリペプチド、免疫調節タンパク質、コンジュゲート、および改変細胞を含む、薬学的組成物を含む）を、多種多様な治療用途、例えば疾患の治療に使用することができる。例えば、いくつかの態様において、該薬学的組成物を使用して、哺乳動物において炎症性または自己免疫性障害、がん、臓器移植、ウイルス感染、および/または細菌感染が治療される。薬学的組成物は、免疫応答を調節（例えば、増強または低減）して、疾患を治療することができる。いくつかの態様において、提供される方法は、本明細書に記載のバリエーションCD80ポリペプチド、免疫調節タンパク質、コンジュゲート、改変細胞および感染性物質の治療投与に適用可能である。提供される開示を考慮して、望まれる免疫応答の調節のタイプ（例えば、増強または低減）に応じて適応症のためのフォーマットを選択することは、当業者のレベルの範囲内である。

【0390】

いくつかの態様において、例えば、がん、ウイルス感染、または細菌感染の治療において有用であることができる、免疫応答を刺激する本明細書において提供される薬学的組成物が投与される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、その同族結合パートナーCD28のアゴニスト活性を示しかつ/またはCD28を介して共刺激シグナル伝達を刺激もしくは開始するフォーマットのバリエーションCD80ポリペプチドを含有する。そのような治療用途に関連して使用するためのCD80ポリペプチドの例示的なフォーマットは、例えば、バリエーションCD80ポリペプチドおよび腫瘍抗原（例えば、Nkp30または親和性が改変されたバリエーション）に結合するIgSFドメインまたはそのバリエーション（「腫瘍局在化IgSFドメインと

10

20

30

40

50

も呼ばれる)の免疫調節タンパク質または「スタック」、腫瘍標的化部分(腫瘍局在化部分とも呼ばれる)に連結されたバリエーションCD80ポリペプチドを含有するコンジュゲート、膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する改変細胞、または膜貫通型免疫調節タンパク質をコードする核酸分子を含む感染性物質であって、例えば、膜貫通型免疫調節タンパク質の感染細胞(例えば、腫瘍細胞またはAPC、例えば、樹状細胞)における発現のためのものを含む。

#### 【0391】

いくつかの態様において、該薬学的組成物を使用して、哺乳動物がん細胞(例えば、ヒトがん細胞)の成長を阻害することができる。がんを治療する方法は、本明細書に記載の薬学的組成物のいずれかの有効量を、がんを有する対象に投与する工程を含むことができる。該薬学的組成物の有効量を投与して、がんの進行を阻害、停止、または反転させることができる。

10

#### 【0392】

本明細書に記載の薬学的組成物および治療法によって治療できるがんは、限定されないが、黒色腫、膀胱がん、血液悪性腫瘍(白血病、リンパ腫、骨髄腫)、肝臓がん、脳がん、腎臓がん、乳がん、膵臓がん(腺がん)、大腸がん、肺がん(小細胞肺がんおよび非小細胞肺がん)、脾臓がん、胸腺もしくは血液細胞のがん(すなわち、白血病)、前立腺がん、精巣がん、卵巣がん、子宮がん、胃がん、筋骨格がん、頭頸部がん、消化器がん、生殖細胞がん、または内分泌および神経内分泌がんを含む。いくつかの態様において、がんは、ユーイング肉腫である。いくつかの態様において、がんは、黒色腫、肺がん、膀胱がん、および血液悪性腫瘍から選択される。いくつかの態様において、がんは、リンパ腫、リンパ性白血病、骨髄性白血病、子宮頸がん、神経芽細胞腫、または多発性骨髄腫である。

20

#### 【0393】

ヒトがん細胞を、インビボまたはエクスピボで処置することができる。ヒト患者のエクスピボ処置では、がん細胞を含有する組織または体液を体外で処置し、次いで、組織または体液を患者に再導入して戻す。いくつかの態様において、がんは、治療用組成物の患者への投与によって、ヒト患者においてインビボ処置される。

#### 【0394】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、単剤療法として(すなわち、単一の薬剤として)、または組み合わせ療法として(すなわち、1つまたは複数の追加の抗がん剤、例えば化学療法剤、がんワクチン、または免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせる)投与される。いくつかの態様において、薬学的組成物をまた、放射線療法と共に投与することもできる。

30

#### 【0395】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、免疫応答を抑制し、これは、炎症性もしくは自己免疫性障害、または臓器移植の治療において有用であることができる。いくつかの態様において、薬学的組成物は、その同族結合パートナーCD28のアンタゴニスト活性を示しかつ/またはCD28を介して共刺激シグナル伝達を遮断もしくは阻害するフォーマットのバリエーションCD80ポリペプチドを含有する。そのような治療用途に関連して使用するためのCD80ポリペプチドの例示的なフォーマットは、例えば、可溶性であるバリエーションCD80ポリペプチド(例えば、バリエーションCD80-Fc融合タンパク質)、Fc融合体であるその可溶性形態を含む、バリエーションCD80ポリペプチドおよび別のIgSFドメインの免疫調節タンパク質または「スタック」、分泌性免疫調節タンパク質を発現する改変細胞、または分泌性免疫調節タンパク質をコードする核酸分子を含む感染性物質であって、例えば分泌性免疫調節タンパク質の感染細胞(例えば、腫瘍細胞またはAPC、例えば、樹状細胞)における発現および分泌のためのものを含む。

40

#### 【0396】

いくつかの態様において、炎症性または自己免疫性障害は、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎、血管炎、自己免疫性皮膚疾患、移植手術、リウマチ性疾患、炎症性消化器疾患、炎症性眼疾患、炎症性神経疾患、炎症性肺疾患、炎症性内分泌疾患、または自己

50

免疫性血液疾患である。

【0397】

いくつかの態様において、本明細書に記載の薬学的組成物によって治療できる炎症性および自己免疫性障害は、アジソン病、アレルギー、円形脱毛症、アルツハイマー病、抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群（ヒューズ症候群）、喘息、アテローム性動脈硬化、関節リウマチ、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性睾丸炎、無精子症、ベーチェット病、ベルギー病、水疱性類天疱瘡、心筋症、心血管疾患、セリアックスプルー/シリアック病、慢性疲労免疫異常症候群（CFIDS）、慢性特発性多発性神経炎、慢性炎症性脱髄性多発神経根筋障害（CIPD）、慢性再発性多発ニューロパチー（ギラン・バレー症候群）、チャグ・ストラウス症候群（CSS）、癰疽性類天疱瘡、寒冷凝集素症（CAD）、COPD（慢性閉塞性肺疾患）、CREST症候群、クローン病、皮膚炎、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、円板状ループス、湿疹、後天性表皮水疱症、本態性混合型クリオグロブリン血症、エヴァンス症候群、眼球突出、線維筋痛症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、免疫増殖性疾患もしくは障害、炎症性腸疾患（IBD）、間質性肺疾患、若年性関節炎、若年性特発性関節炎（JIA）、川崎病、ランバート・イートン筋無力症候群、扁平苔癬、ループス腎炎、リンパ球性下垂体炎（lymphocytic hypophysitis）、メニエール病、ミラーフィッシャー症候群/急性散在性脳脊髄神経根障害（acute disseminated encephalomyeloradiculopathy）、混合結合組織病、多発性硬化症（MS）、筋肉リウマチ、筋痛性脳脊髄炎（ME）、重症筋無力症、眼炎、落葉状天疱瘡、尋常性天疱瘡、悪性貧血（pernicious anaemia）、結節性多発動脈炎、多発軟骨炎、多腺性症候群（polyglandular syndromes）（ホイッタカー症候群）、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、原発性無グロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変/自己免疫性胆管症、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群/反応性関節、再狭窄、リウマチ熱、リウマチ性疾患、サルコイドーシス、シュミット症候群、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（SLE）、全身性強皮症、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、甲状腺炎、1型糖尿病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、白斑、間質性腸疾患またはウェグナー肉芽腫症である。いくつかの態様において、炎症性または自己免疫性障害は、間質性腸疾患、移植、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、喘息、関節リウマチ、および乾癬から選択される。

【0398】

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

【0399】

本明細書に記載の改変細胞を含む薬学的組成物および方法を、養子細胞移入適用において使用することができる。いくつかの態様において、改変細胞を含む細胞組成物を、関連する方法において使用して、例えば、免疫活性を、例えば、哺乳動物がんの治療、または他の態様において自己免疫性障害の治療への免疫療法アプローチにおいて調節することができる。採用される方法は、概して、本発明のTIPと哺乳動物細胞とを、親和性改変IgSFドメインの特異的結合および哺乳動物細胞の免疫活性の調節に許容的な条件下で、接触させる工程を含む。いくつかの態様において、免疫細胞（例えば、腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）、T細胞（CD8<sup>+</sup>またはCD4<sup>+</sup>T細胞を含む）、またはAPC）は、本明細書に記載のとおり膜タンパク質としておよび/または可溶性パリアントCD80ポリペプチド、免疫調節タ

10

20

30

40

50



ンパク質、もしくはコンジュゲートとして発現するように改変される。次いで、改変細胞を、免疫活性の調節が望まれるAPC、第二のリンパ球または腫瘍細胞のような哺乳動物細胞と、哺乳動物細胞において免疫活性を調節することができるような哺乳動物細胞上のカウンター構造体への親和性改変IgSFドメインの特異的結合を許容する条件下で接触させることができる。細胞をインビボまたはエキスピボで接触させることができる。

【0400】

いくつかの態様において、改変細胞は自家細胞である。他の態様において、細胞は同種細胞である。いくつかの態様において、細胞は、それが単離された哺乳動物に再注入される自家改変細胞である。いくつかの態様において、細胞は、哺乳動物に注入される同種改変細胞である。いくつかの態様において、細胞を、患者の血液または腫瘍から採取し、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載のとりのバリエーションCD80ポリペプチド、免疫調節タンパク質、またはコンジュゲート）を発現するよう改変し、インビトロ培養系で（例えば、細胞を刺激することによって）拡大培養し、そして、患者に再注入して腫瘍破壊を媒介させる。いくつかの態様において、該方法は、TIPを発現する細胞（例えば、T細胞）を患者に注入して戻す養子細胞移入によって実施される。いくつかの態様において、本発明の治療用組成物および方法は、リンパ腫、リンパ性白血病、骨髄性白血病、子宮頸がん、神経芽細胞腫、または多発性骨髄腫のようながんの哺乳動物患者の治療において使用される。

【0401】

#### VIII. 例示的態様

提供される態様としては、以下の態様が挙げられる。

1. IgVドメインもしくはその特異的結合断片、IgCドメインもしくはその特異的結合断片、または両方を含む、バリエーションCD80ポリペプチドであって、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置4、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、24、25、27、28、29、30、31、33、36、37、38、40、41、42、43、44、47、48、50、52、53、54、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、72、74、76、77、80、81、83、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、99、102、103、104、107、108、109、110、114、115、116、117、118、120、121、122、126、127、128、129、130、133、137、140、142、143、144、148、149、152、154、160、162、164、168、169、174、175、177、178、183、185、188、190、192、193、または199に対応する、未改変CD80またはその特異的結合断片における1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、バリエーションCD80ポリペプチド。

2. 前記1つまたは複数のアミノ酸改変が、1つまたは複数のアミノ酸置換、挿入、または欠失を含む、態様1のバリエーションCD80ポリペプチド。

3. 前記未改変CD80が哺乳動物CD80である、態様1または態様2のバリエーションCD80ポリペプチド。

4. 前記CD80がヒトCD80である、態様1～3のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

5. IgVドメインまたはその特異的結合断片；および  
IgCドメインまたはその特異的結合断片

を含む、態様1～4のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

6. 前記未改変CD80が、

(i) SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列、(ii) SEQ ID NO:28に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；あるいは(iii) それらの一部分であって、IgVドメインもしくはIgCドメインまたはそれらの特異的結合断片を含む、部分を含む、態様1～5のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

7. 前記IgVドメインまたはIgCドメインの特異的結合断片が、少なくとも50、60、70、80、90、100、110アミノ酸またはそれより多いアミノ酸の長さを有するか；

前記IgVドメインの特異的結合断片が、SEQ ID NO:1の35～135番目のアミノ酸として

示されるIgVドメインの長さの少なくとも80%の長さを含むか；または

前記IgCドメインの特異的結合断片が、SEQ ID NO:1の145～230番目のアミノ酸として示されるIgCドメインの長さの少なくとも80%の長さを含む、  
態様1～6のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

8. 最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸改変、任意でアミノ酸置換を含む、態様1～7のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

9. SEQ ID NO:28またはその特異的結合断片に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、態様1～8のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

10

10. 前記未改変CD80と比較して変化した、CD28、PD-L1、またはCTLA-4のエクトドメインに対する結合特異性を示す、態様1～9のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

11. 前記変化した結合性が、変化した結合親和性および/または変化した結合選択性である、態様9のバリエーションCD80ポリペプチド。

12. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が  
V4M, K9E, E10R, V11S, A12G, A12T, A12V, T13N, L14A,

S15V, S15F, C16S, C16G, C16L, G17W, H18L, H18R, H18Y, V20L, S21P, V22A, E24G,  
L25P, Q27R, T28A, T28S, R29C, R29D, R29H, R29V, I30V, Y31F, Y31H, Y31L, Q33H,  
K36E, K36G, K37E, K37Q, M38I, M38L, M38T, M38V, L40M, T41A, T41G, T41D, T41I,  
M42T, M43I, M43Q, M43R, M43V, S44P, M47T, N48D, N48I, W50G, E52G, Y53C, K54M,  
F59L, F59S, D60V, I61N, T62S, N63S, N64S, L65H, S66H, I67F, I67T, V68A, V68M, I69T,  
L70Q, L70P, L70R, L72P, P74L, D76G, E77G, E77K, Y80N, E81A, E81R, E81V, V83A, V83I,  
L85I, L85R, K86E, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90L, D90N, A91E,  
A91G, A91S, A91T, F92L, F92N, F92P, F92Y, K93I, K93E, K93Q, K93R, K93V, R94G, R94L,  
R94F, E95K, H96R, L97R, E99D, E99G, L102S, S103L, S103P, V104A, V104L, D107N,  
F108L, P109S, P109H, T110A, S114T, D115G, F116S, F116L, E117V, E117G, I118V, I118A,  
I118T, T120S, S121P, N122S, I126L, I126V, I127T, C128Y, C128R, S129L, S129P, T130A,  
G133D, P137L, S140T, L142S, E143G, N144D, N144S, L148S, N149D, N149S, N152T, T154I,  
T154A, E160G, E162G, Y164H, S168G, K169E, K169I, K169S, M174T, M174V, T175A,  
N177S, H178R, L183H, K185E, H188D, H188Q, R190S, N192D, Q193L, T199S

20

30

またはその保守的アミノ酸置換である、態様1～11のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

40

13. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、

V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A,  
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T, A12V/S15F/Y31H/T41G/T130A/P137L/N152T,  
V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A, V22A/L70Q/S121P, E24G/L25P/L70Q/T120S,  
T28S/L70Q/A91G/E95K/T120S/T130A,  
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P  
/K93V/R94L/H96R,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,  
R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/T130A, R29H/E52G/T120S/T130A,  
R29V/Y31F/K36G/M38L/M43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G,  
R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G,  
Y31H/T41G/L70Q/A91G/T120S/T130A, K36G, K36G/K37Q/M38I/L40M,  
K36G/K37Q/M38I/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S,  
K36E/I67T/L70Q/A91G/T120S/T130A/N152T, K37E/F59S/L70Q/A91G/T120S/T130A,  
M38T/L70Q/E77G/A91G/T120S/T130A/N152T,  
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/T120S/T130A, T41I/A91G,  
S44P/L70Q/A91G/T130A, E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A, K54M/A91G/T120S,  
D60V/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, S66H/D90G/T110A/F116L,  
I67F/L70R/E88G/A91G/T120S/T130A, I67T/L70Q/A91G/T120S, V68A/T110A,  
V68M/L70P/L72P/K86E, L70Q/A91G/T110A/T120S/T130A,  
L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A, L70Q/Y87N/A91G/T130A, L70Q/A91G,  
L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A, L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/T130A,  
L70Q/A91G/I118A/T20S/T130A, L70R/A91G/T120S/T130A,

10

20

30

40

50

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89E/T130A, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,  
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S,  
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S A91G, A91G/F92L/F108L/T120S,  
A91G/L102S, A91G/S103P, A91G/T120S/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/T130A/M174T,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/H188D,  
H18R/R29D/Y31L/Q33H/K36G/K37E/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91  
T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/E143G/K169E/M174V/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/I127T/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120  
S/I127T/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/F108L/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/H188D,

10

20

30

40

50

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/T120S/I127T/C128Y/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/T130A/K169E,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93I  
/R94L/L97R/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93I  
/R94L/L97R/T130A/L148S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/I61N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V  
/R94F/V104A/T120S/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/F92P/K93V/R94F/I118  
V/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/T175A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/F116S/T130A/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T120S/I127T/T130A/L142S/H188D,  
C16S/H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T110A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/A91G/T120S/I127T/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/D76G/A91G/S103L/T120S/I127T/T

10

20

30

40

50

130A, Q33del/Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/I127T/T130A/K169E,  
T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/T120S/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/S129L/H188D, K9E/E10R/V11S/A12G/T13N/K14A/S15V/C16L/G17W/H18Y/Y53C/L70Q/  
D90G/T130A/N149D/N152T/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D, K89E/K93E/T130A,  
S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/  
N48I/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/ P109H/I126L/K169I,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/  
P74L/Y80N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L97R,  
S21P/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/P74L/Y80N/E81V/L85R/K89N/D90  
N/A91T/F92P/K93V/R94L/T130A/N149S/E162G,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/N149S/R190S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/P74L/Y80N/E81V/L85R/K89N/A91  
T/F92P/K93V/R94L/ T130A/R190S,  
C16G/V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/D76G/E81V/L85R/K8  
9N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169I/H178R/N192D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/E117V/I118T/N149S/S168G/H188Q,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/N64S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94F/ I118T/T130A/N149S/K169I,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68M/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/D115G/I118T/T130A/G133D/N149S, S129P, A91G/S129P,  
I69T/L70Q/A91G/T120S, Y31H/S129P,  
T28A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/ V104L/T130A/N149S,

10

20

30

40

50

H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L97R/N149S/H188Q,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L97R/N149S,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/ T130A/N149S/T154I,  
A12G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/V68A/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/ L97R/T130A/L183H,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L,  
V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/ I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/T130A/N149S/K169I,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/T130A/N149S/K169I, I118T/C128R, Q27R/R29C/M42T/S129P/E160G, S129P/T154A,  
S21P/L70Q/D90G/T120S/T130A, L70Q/A91G/N144D,  
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E, V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,  
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A,  
V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A, L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A,  
A91G/I118V/T120S/T130A, L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S,  
L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A,  
T28S/L70Q/A91G/E95K/I118V/T120S/I126V/T130A/K169E,  
N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,  
K36E/I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T,  
E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E,  
K37E/F59S/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K185E,  
D60V/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, K54M/L70Q/A91G/Y164H,

10

20

30

40

50





R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118  
V/T120S/I127T/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/F108L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/T130A/N149D/K169E/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118V/T120S/I127T/C128Y/T130A/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/E99D/T130A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/I61N/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V  
/R94F/V104A/I118V/T120S/I126V/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/I118V/T120S/T130A,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
F/I118V/T120S/T130A  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E/T175A,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/L142S/H188D,  
C16S/H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92  
P/K93V/R94L/T110A/I118V/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/L70Q/D76G/A91G/S103L/I118V/T120S/I1

10

20

30

40

50

27T/T130A, Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
Y53C/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/K169E,  
T62S/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118V/T120S/T130A/K169E,  
Y53C/L70Q/D90G/T130A/N149D/N152T/H188D,  
Y53C/L70Q/D90G/T130A/N149D/N152T/H188D,  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/I118V/T120S/I127T/T130A/H188D, または  
H18L/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/T130A/N149S

10

である、態様1~12のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

14. SEQ ID NO:55~108、280~346、414~475のうちのいずれかもしくはその特異的結合断片に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:55~108、280~346、414~475のうちのいずれかもしくはその特異的結合断片に対して少なくとも95%の配列同一性を示しかつ前記1つまたは複数のアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列を含む、態様1~13のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

15. 前記IgVドメインまたはその特異的結合断片を含む、態様1~14のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

20

16. 前記IgVドメインまたはその特異的断片が、前記バリエーションCD80ポリペプチドの唯一のCD80部分である、態様1~15のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

17. 前記IgCドメインまたはその特異的断片が、前記バリエーションCD80ポリペプチドの唯一のCD80部分である、態様1~14のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

18. SEQ ID NO:153~195、347、373~386、476~477のいずれかもしくはその特異的結合断片に示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO:153~195、347、373~386、476~477のいずれかもしくはその特異的結合断片に対して少なくとも95%の配列同一性を示しかつ前記1つまたは複数のアミノ酸置換を含有するアミノ酸配列を含む、態様1~17のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

30

19. CD28、PD-L1、またはCTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1~17のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

20. CD28、PD-L1、またはCTLA-4のエクトドメインに、該エクトドメインに対する前記未改変CD80の結合性と比較して向上した選択性で特異的に結合する、態様1~19のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

21. 前記選択性の向上が、CD28、PD-L1、およびCTLA-4の中から選択される1つの同族結合パートナーに対する結合性と、該同族結合パートナーのうちの別のものに対する結合性との比率が、該1つの同族結合パートナーに対する前記未改変CD80ポリペプチドの結合性と、該同族結合パートナーのうちの該別のものに対する該未改変CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む、態様20のバリエーションCD80ポリペプチド。

40

22. CD28のエクトドメインに、該CD28のエクトドメインに対する前記未改変CD80の結合性と比較して向上した選択性で特異的に結合する、態様19または態様20のバリエーションCD80ポリペプチド。

23. 前記選択性の向上が、CD28に対する結合性と、PD-L1またはCTLA-4に対する結合性との比率が、CD28に対する前記未改変CD80ポリペプチドの結合性と、PD-L1またはCTLA-4に対する該未改変CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む、態様22のバリエーションCD80ポリペプチド。

24. 前記比率が、少なくともまたは少なくとも約1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、

50

10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、またはそれ以上大きい、態様21または態様23のバリエーションCD80ポリペプチド。

25. CD28のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1～24のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

26. 前記エクトドメインに対する向上した親和性が、前記エクトドメインに対する前記未改変CD80の結合親和性と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より大きく向上している、態様19または態様25のバリエーションCD80ポリペプチド。

27. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置12、18、20、29、31、36、40、41、43、52、59、60、63、67、70、77、81、87、88、89、90、91、92、93、107、109、114、117、118、120、122、127、130、144、169、177、または199に対応する、態様1～26のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

10

28. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
A12T, H18L, V20L, R29H,

Y31H, K36G, T41G, T41I, M43V, E52G, F59L, D60V, N63S, I67T, L70Q, L70R, E77K, E81A, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90K, D90N, L40M, A91G, A91S, F92Y, K93R, D107N, P109S, S114T, E117G, I118A, I118T, I118V, T120S, I127T, T130A, N144D, K169E, N177S, および T199S

20

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～27のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

29. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,

V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A, V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A,

R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M, T41I/A91G,

E52G/L70/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E,

30

D60V/A91G/T120S/T130A, D60V/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,

L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A, L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A,

L70Q/Y87N/A91G/T130A, L70Q/A91G, L70Q/A91G/N144D,

L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A, L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A,

L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E,

40

L70Q/A91G/T120S/T130A, L70R/A91G/T120S/T130A,

L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S, または

K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S

である、態様1～28のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

50

30. PD-L1のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1～29のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

31. 前記エクトドメインに対する向上した親和性が、前記エクトドメインに対する前記未改変CD80の結合親和性と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より大きく向上している、態様30のバリエーションCD80ポリペプチド。

32. PD-L1のエクトドメインに、該エクトドメインに対する前記未改変CD80の結合性と比較して向上した選択性で特異的に結合する、態様1～31のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

33. 前記選択性の向上が、PD-L1に対する結合性と、CD28またはCTLA-4に対する結合性との比率が、PD-L1に対する前記未改変CD80ポリペプチドの結合性と、CD28またはCTLA-4に対する該未改変CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む、態様32のバリエーションCD80ポリペプチド。

10

34. 前記比率が、少なくともまたは少なくとも約1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、またはそれ以上大きい、態様33のバリエーションCD80ポリペプチド。

35. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置12、18、29、31、33、36、38、40、41、42、43、47、48、59、64、67、68、70、77、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、97、104、109、115、117、118、120、122、126、130、133、140、144、148、149、168、178、183、188または193に対応する、態様1～34のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

20

36. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、A12G, A12T, H18L, S21P,

V22A, T28A, R29D, R29H, Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, M38L, L40M, T41A, T41G,

M42T, M43R, M43V, M47T, N48I, F59L, N64S, I67T, V68A, V68M, L70Q, E77K, E81V,

L85R, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89N, K89R, D90K, D90N, A91G, A91T, F92P, F92Y,

K93V, R94F, R94L, L97R, S103L, S103P, V104L, P109H, P109S, D115G, E117V, I118T,

30

I118V, T120S, N122S, I126L, T130A, G133D, S140T, N144S, L148S, N149S, S168G, K169I,

K169S, N177S, H178R, L183H, H188Q, R190S および Q193L

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～35のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

37. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、

40

50

A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S, 10  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M,  
I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,  
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, A91G,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S,  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94 20

30

40

50

40

L/I118T/T130A/S140T/N149S/K169S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94

L/I118T/T130A/N149S/K169I/Q193L,

V22A/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93

V/R94L/ I118T/T130A/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94

L/I118T/T130A/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94

L/I118T/T130A/N149S/K169I, または

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94

F/T130A/N149S/K169I

である、態様1～36のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

38. CD28のエクトドメインおよびPD-L1のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1～37のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

39. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置12、18、36、40、43、59、77、88、89、90、91、92、93、94、109、118、122、または177に対応する、態様1～38のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

40. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
A12T, H18L, K36G,

L40M, M43V, F59L, E77K, E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, P109S, I118T, N112S,  
N177S

およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～39のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

41. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T, K36G,

K36G/L40M, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,

E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S, または

K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S

である、態様1～40のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

42. CTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1～41のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

43. 前記エクトドメインに対する向上した親和性が、前記エクトドメインに対する前記未改変CD80の結合親和性と比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または60倍より大きく向上している、態様42のバリエーションCD80ポリペプチド。

44. CTLA-4のエクトドメインに、該エクトドメインに対する前記未改変CD80の結合性と比較して向上した選択性で特異的に結合する、態様1～43のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

45. 選択性の向上が、CTLA-4に対する結合性と、CD28またはPD-L1に対する結合性と

10

20

30

40

50

の比率が、CTLA-4に対する前記未改変CD80ポリペプチドの結合性と、CD28またはPD-L1に対する該未改変CD80ポリペプチドの結合性との比率と比較して大きいことを含む、態様44のバリエーションCD80ポリペプチド。

46. 前記比率が、少なくともまたは少なくとも約1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍またはそれ以上大きい、態様45のバリエーションCD80ポリペプチド。

47. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置4、29、31、36、40、41、52、67、68、70、87、88、89、90、91、92、93、107、109、110、118、120、130、144、または169に対応する、態様1～46のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

10

48. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
V4M, R29H, Y31H, K36G,

L40M T41G, E52G, I67T, V68A, L70Q, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90K, D90N, A91G, F92Y, K93R, D107N, P109S, T110A, I118V, T120S, T130A, N144D, および K169E

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～47のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

49. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A,

20

V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S, K36G, K36G/L40M,

E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, V68A/T110A, L70Q/A91G,

L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/T120S/T130A, L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E,

L70Q/A91G/T130A, K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R,

A91G/I118V/T120S/T130A, または A91G/T120S/T130A

30

である、態様1～48のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

50. CD28のエクトドメインおよびCTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1～49のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

51. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28の位置36、40、52、70、88、89、90、91、92、93、107、118、120、130、144、または169に対応する、態様1～50のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

52. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
K36G, L40M, E52G,

40

L70Q, E88D, K89R, D90K, A91G, F92Y, K93R, D107N, I118V, T120S, T130A, N144D, および K169E

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～51のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

53. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、

50



K36G, K36G/L40M, K36G/L40M, K36G/L40M,  
 E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A, E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E,  
 L70Q/A91G, L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/T120S/T130A,  
 L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または  
 K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

である、態様1～52のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

54. PD-L1のエクトドメインおよびCTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1～53のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

10

55. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28の位置29、31、36、40、41、67、70、87、88、89、90、91、92、93、109、118、120、122、130、または178に対応する、態様1～54のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

56. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
 R29H, Y31H, K36G,

L40M, T41G, I67T, L70Q, Y87N, E88D, E88G, K89E, K89R, D90N, D90K, A91G, F92Y,  
 K93R, P109S, I118V, T120S

20

およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～55のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

57. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,

K36G, K36G/L40M, I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S,  
 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

である、態様1～56のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

30

58. CD28のエクトドメイン、PD-L1のエクトドメイン、およびCTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合する、態様1～57のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

59. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28の位置36、40、88、89、90、91、92、または93に対応する、態様1～58のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

60. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、K36G、L40M、E88D、K89R、D90K、A91G、F92Y、K93R、およびその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～59のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

61. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
 K36G, K36G/L40M, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, または K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R

40

である、態様1～60のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

62. CD28のエクトドメインまたはPD-L1のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合し、かつ、

CTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性で特異的に結合する、

態様1～41のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

63. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28のナンバリングを基準にした位置29、31、33、36、38、41、42、43、47、63、67、70、81、85、87、88、

50

89、90、91、92、93、94、109、114、118、120、127、130、144、148、または149に対応する、態様1～41および62のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

64. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
R29D, R29H,

Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, T41G, M42T, M43R, M47T, N63S, I67T, L70Q,  
E81A, E81V, L85R, Y87N, E88G, K89E, K89N, D90N, A91G, A91T, F92P, K93V, R94L,  
P109S, S114T, I118T, I118V, T120S, I127T, T130A, N144S, L148S, および N149S

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～41、62、および63のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

10

65. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A,

N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A または L70Q/Y87N/A91G/T120S/I127T/T130A

である、態様1～41および62～64のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

66. CD28のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合し、かつ、

CTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性で特異的に結合する、

20

態様1～41および62～65のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

67. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28の位置63、70、81、87、91、114、118、120、127、または130に対応する、態様1～41および62～66のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

68. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
N63S, L70Q, E81A, Y87N, A91G, S114T, I118V, T120S, I127T, および T130A

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～41、および62～67のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

69. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S,

30

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,

40

N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A,

I67T/L70Q/A91G/T120S, I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S, または

L70Q/Y87N/A91G/T120S/I127T/T130A

である、態様1～41、および62～67のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

70. PD-L1のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合し、かつ、

CTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性

50

で特異的に結合する、

態様1～41および62～69のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

71. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28の位置29、31、33、36、38、41、42、43、47、67、70、81、85、87、88、89、90、91、92、93、94、109、118、120、144、148、または149に対応する、態様1～41および62～70のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

72. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
R29D, R29H,

Y31H, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, T41G, M42T, M43R, M47T, I67T, L70Q, E81V,  
L85R, Y87N, E88G, K89E, K89N, D90N, A91G, A91T, F92P, K93V, R94L, P109S, I118T,  
I118V, T120S, N144S, L148S, および N149S

10

ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～41、および62～71のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

73. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、  
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93  
V/R94L/L148S/N149S,

20

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/I118T/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N144S/N149S,

R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94  
L/N149S, R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S,  
I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S または I67T/L70Q/A91G/T120S

30

である、態様1～41、および62～72のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

74. CD28のエクトドメインおよびPD-L1のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して向上した親和性で特異的に結合し、かつ、

CTLA-4のエクトドメインに、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して低下した親和性で特異的に結合する、

態様1～41および62～73のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

75. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、SEQ ID NO:28の位置70、81、87、91、または120に対応する、態様1～41および62～74のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

76. 前記1つまたは複数のアミノ酸置換が、L70Q、Y87N、A91G、およびT120S、ならびにその保存的アミノ酸置換からなる群より選択される、態様1～41、および62～75のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

40

77. CD28がヒトCD28である、態様10～76のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

78. PD-L1がヒトPD-L1である、態様10～77のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

79. CTLA-4がヒトCTLA-4である、態様10～78のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

80. 前記結合活性が、前記未改変CD80ポリペプチドと比較して、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍より

50

大きく変化（向上または低下）している、態様1～79のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

81. 可溶性タンパク質である、態様1～80のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

82. 多量体化ドメインに連結されている、態様1～81のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

83. 多量体化ドメインに連結された第一のバリエーションCD80ポリペプチドおよび多量体化ドメインに連結された第二のバリエーションCD80ポリペプチドを含む、多量体ポリペプチド、任意で二量体ポリペプチドである、態様1～81のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

84. 前記第一のバリエーションCD80ポリペプチドおよび前記第二のバリエーションCD80ポリペプチドが、同じであるかまたは異なる、態様83のバリエーションCD80ポリペプチド。

10

85. 前記多量体化ドメインが、エフェクター機能が低下しているFcドメインまたはそのバリエーションである、態様82～84のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

86. 前記ポリペプチドの生物学的半減期を延長させる部分に連結されている、態様1～85のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

87. エフェクター機能が低下しているFcドメインまたはそのバリエーションに連結されている、態様1～86のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

88. 前記Fcドメインが、哺乳動物のもの、任意でヒトのものであるか；または哺乳動物のもの、任意でヒトのものである未改変Fcドメインと比較して、前記バリエーションFcドメインが1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、態様85～87のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

20

89. 前記Fcドメインまたはそのバリエーションが、SEQ ID NO:226もしくはSEQ ID NO:227に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:226もしくはSEQ ID NO:227に対して少なくとも85%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、態様85～88のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

90. リンカーを介して間接的に連結されている、態様82～89のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

91. 前記バリエーションCD80ポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に連結された膜貫通ドメインをさらに含む膜貫通型免疫調節タンパク質である、態様1～90のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

30

92. 前記膜貫通ドメインが、SEQ ID NO:1の243～263番目の残基として示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:1の243～263番目の残基に対して少なくとも85%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含む、態様91のバリエーションCD80ポリペプチド。

93. 前記膜貫通ドメインに連結された細胞質ドメインをさらに含む、態様91または態様92のバリエーションCD80ポリペプチド。

94. 前記細胞質ドメインが、SEQ ID NO:1の264～288番目の残基として示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO:1の264～288番目の残基に対して少なくとも85%の配列同一性を示すその機能的バリエーションを含む、態様93のバリエーションCD80ポリペプチド。

95. インビトロ初代T細胞アッセイにおいて、前記未改変CD80と比べてIFN-（インターフェロン-）発現を増加させる、態様1～94のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

40

96. インビトロ初代T細胞アッセイにおいて、前記未改変CD80と比べてIFN-（インターフェロン-）発現を減少させる、態様1～95のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

97. 脱グリコシル化されている、態様1～96のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド。

98. 免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメインを含む第二のポリペプチドに連結された態様1～97のいずれかのバリエーションCD80を含む、免疫調節ポリペプチド。

99. 前記IgSFドメインが、未改変または野生型IgSFドメインと比較して、親和性が改変されており、かつその同族結合パートナーのうちの1つまたは複数に対する変化した結合

50

性を示す、態様98の免疫調節ポリペプチド。

100. 前記IgSFドメインが、未改変または野生型IgSFドメインと比較して、その同族結合パートナーのうちの1つまたは複数に対する向上した結合性を示す、態様99の免疫調節ポリペプチド。

101. 前記バリエーションCD80が第一のバリエーションCD80であり、前記第二のポリペプチドのIgSFドメインが態様1～97のいずれかの第二のバリエーションCD80由来のIgSFドメインであり、該第一および該第二のバリエーションCD80が、同じであるかまたは異なる、態様98～100のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

102. 前記バリエーションCD80ポリペプチドが、CD28、PD-L1、またはCTLA-4に特異的に結合することができ、前記第二のポリペプチドのIgSFドメインが、該バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる、態様98～101のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

10

103. 前記バリエーションCD80ポリペプチドが、CD28またはPD-L1に特異的に結合することができ、前記IgSFドメインが、該バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる、態様98～102のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

104. 前記バリエーションCD80ポリペプチドが、CD28またはCTLA-4に特異的に結合することができ、前記IgSFドメインが、該バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる、態様98～103のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

20

105. 前記バリエーションCD80ポリペプチドが、CTLA-4またはPD-L1に特異的に結合することができ、前記IgSFドメインが、該バリエーションCD80ポリペプチドが特異的に結合するもの以外の同族結合パートナーに結合することができる、態様98～103のいずれかの免疫調節タンパク質。

106. 前記IgSFドメインが、B7ファミリーのメンバー由来である、態様98～105のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

107. 前記IgSFドメインが、腫瘍上に発現するリガンドに結合する腫瘍局在化部分である、態様82～90のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

108. 前記リガンドがB7H6である、態様107の免疫調節ポリペプチド。

109. 前記IgSFドメインがNKp30由来である、態様107または態様108の免疫調節ポリペプチド。

30

110. 前記IgSFドメインが、未改変または野生型IgSFドメインと比較して、親和性が改変されており、かつその同族結合パートナーのうちの1つまたは複数に対する向上した結合性を示す、態様98～109のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

111. 前記IgSFドメインが、IgVドメインであるかまたはIgVドメインを含む、態様98～110のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

112. 前記バリエーションCD80ポリペプチドが、IgVドメインであるかまたはIgVドメインを含む、態様98～111のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

113. 前記バリエーションCD80ポリペプチドおよび前記IgSFドメインを含む第二のポリペプチドのうちの一方または両方に連結された多量体化ドメインを含む、態様98～112のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

40

114. 前記多量体化ドメインが、エフェクター機能が低下しているFcドメインまたはそのバリエーションである、態様113の免疫調節タンパク質。

115. 二量体である、態様98～114のいずれかの免疫調節ポリペプチド。

116. ホモ二量体である、態様115の免疫調節タンパク質。

117. ヘテロ二量体である、態様115の免疫調節タンパク質。

118. ある部分に連結された、態様1～98のいずれかのバリエーションCD80または態様99～117のいずれかの免疫調節ポリペプチドを含む、コンジュゲート。

119. 前記部分が、細胞の表面上の分子に特異的に結合する標的化部分である、態様118のコンジュゲート。

50

120. 前記標的化部分が、免疫細胞の表面上の分子に特異的に結合する、態様119のコンジュゲート。

121. 前記免疫細胞が、抗原提示細胞またはリンパ球である、態様120のコンジュゲート。

122. 前記標的化部分が、腫瘍の表面上の分子に結合する腫瘍局在化部分である、態様119のコンジュゲート。

123. 前記部分が、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、またはナノ粒子である、態様118~122のいずれかのコンジュゲート。

124. 前記部分が、抗体または抗原結合断片である、態様118~123のいずれかのコンジュゲート。

125. 二価、四価、六価、または八価である、態様118~124のいずれかのコンジュゲート。

126. 態様1~98のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチドまたは態様99~117のいずれかの免疫調節ポリペプチドをコードする、核酸分子。

127. 合成核酸である、態様126の核酸分子。

128. cDNAである、態様126または態様127の核酸分子。

129. 態様125~128のいずれかの核酸分子を含む、ベクター。

130. 発現ベクターである、態様129のベクター。

131. 哺乳動物ベクターまたはウイルスベクターである、態様129または態様130のベクター。

132. 態様129~131のいずれかのベクターを含む、細胞。

133. 哺乳動物細胞である、態様132の細胞。

134. ヒト細胞である、態様133の細胞。

135. バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質を生産する方法であって、態様125~128のいずれかの核酸分子または態様129~131のいずれかのベクターを、宿主細胞において該タンパク質が発現する条件下で宿主細胞に導入する工程を含む、方法。

136. 前記バリエーションCD80ポリペプチドまたは前記免疫調節タンパク質を前記細胞から単離または精製する工程をさらに含む、態様135の方法。

137. バリエーションCD80ポリペプチドを発現する細胞を改変する方法であって、態様1~98のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチドをコードする核酸分子を、宿主細胞において該ポリペプチドが発現する条件下で宿主細胞に導入する工程を含む、方法。

138. 態様1~98のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド、態様99~117のいずれかの免疫調節タンパク質、態様125~128のいずれかの核酸分子、または態様129~131のいずれかのベクターを発現する、改変細胞。

139. 前記バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドが、シグナルペプチドを含む、態様138の改変細胞。

140. 前記バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドが、膜貫通ドメインを含まず、かつ/または、前記細胞の表面上には発現しない、態様138または態様139の改変細胞。

141. 前記バリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドが、前記改変細胞から分泌される、態様138~140のいずれかの改変細胞。

142. 膜貫通ドメインを含みかつ/または態様91~97のいずれかの膜貫通型免疫調節タンパク質である、バリエーションCD80ポリペプチドを含む、態様138または態様139の改変細胞。

143. 前記バリエーションCD80ポリペプチドが、前記細胞の表面上に発現する、態様138、態様139、または態様142の改変細胞。

144. 免疫細胞である、態様138~143のいずれかの改変細胞。

145. 前記免疫細胞が、抗原提示細胞（APC）またはリンパ球である、態様144の改変細胞。

146. 初代細胞である、態様138~145のいずれかの改変細胞。

10

20

30

40

50

147. 哺乳動物細胞である、態様138～146のいずれかの改変細胞。
148. ヒト細胞である、態様138～147のいずれかの改変細胞。
149. 前記リンパ球がT細胞である、態様145～148のいずれかの改変細胞。
150. 前記APCが人工APCである、態様145～149のいずれかの改変細胞。
151. キメラ抗原受容体（CAR）または改変されたT細胞受容体をさらに含む、態様138～150のいずれかの改変細胞。
152. 態様1～97のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチドまたは態様98～117のいずれかの免疫調節ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、感染性物質。
153. 前記コードされているバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドが、膜貫通ドメインを含まず、かつ/または、それを発現する細胞の表面上には発現しない、態様152の感染性物質。 10
154. 前記コードされているバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節ポリペプチドが、それを発現する細胞から分泌される、態様152または態様153の感染性物質。
155. 前記コードされているバリエーションCD80ポリペプチドが、膜貫通ドメインを含む、態様152の感染性物質。
156. 前記コードされているバリエーションCD80ポリペプチドが、それを発現する細胞の表面上に発現する、態様152または態様155の感染性物質。
157. 細菌またはウイルスである、態様152～156のいずれかの感染性物質。
158. 前記ウイルスが腫瘍溶解性ウイルスである、態様157の感染性物質。
159. 前記腫瘍溶解性ウイルスが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、水疱性口腔ウイルス（Vesticular Stomatic virus）、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、バルボウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（vesticular stomatitis virus）（VSV）、コクサッキーウイルス、またはワクシニアウイルスである、態様158の感染性物質。 20
160. 前記ウイルスが、樹状細胞（DC）を特異的に標的化し、かつ/または、樹状細胞指向性である、態様159の感染性物質。
161. 前記ウイルスが、改変されたシンドビスウイルスエンベロープ産物で偽型化されたレンチウイルスベクターである、態様160の感染性物質。
162. 標的細胞の死をもたらすかまたは免疫応答を増強もしくは強化することができるさらなる遺伝子産物をコードする核酸分子をさらに含む、態様152～161のいずれかの感染性物質。 30
163. 前記さらなる遺伝子産物が、抗がん剤、抗転移剤、抗血管新生剤、免疫調節分子、免疫チェックポイント阻害剤、抗体、サイトカイン、成長因子、抗原、細胞傷害性遺伝子産物、アポトーシス促進性遺伝子産物、抗アポトーシス性遺伝子産物、細胞マトリックス分解性遺伝子、組織再生のための遺伝子、またはヒト体細胞の多能性へのリプログラミングのための遺伝子から選択される、態様162の感染性物質。
164. 態様1～97のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチド、態様98～117のいずれかの免疫調節タンパク質、態様118～125のいずれかのコンジュゲート、態様138～151のいずれかの改変細胞、または態様152～163のいずれかの感染性物質を含む、薬学的組成物。 40
165. 薬学的に許容し得る賦形剤を含む、態様164の薬学的組成物。
166. 滅菌されている、態様164または165の薬学的組成物。
167. 態様164～166のいずれかの薬学的組成物をバイアル中に含む、製造品。
168. 前記バイアルが密閉されている、態様167の製造品
169. 態様164～166のいずれかの薬学的組成物と使用説明書とを含む、キット。
170. 態様167および168の製造品と使用説明書とを含む、キット。
171. 対象における免疫応答を調節する方法であって、態様164～166のいずれかの薬学的組成物を該対象に投与する工程を含む、方法。
172. 対象における免疫応答を調節する方法であって、態様138～151のいずれかの改変細胞を投与する工程を含む、方法。 50

173. 前記改変細胞が、前記対象にとって自家である、態様172の方法。
174. 前記改変細胞が、前記対象にとって同種である、態様172の方法。
175. 前記免疫応答の調節が、前記対象における疾患または病態を治療する、態様171～174のいずれかの方法。
176. 免疫応答が増強される、態様171～175のいずれかの方法。
177. 腫瘍局在化部分に連結されたバリエーションCD80ポリペプチドを含む免疫調節タンパク質またはコンジュゲートが前記対象に投与される、態様171、175、および176のいずれかの方法。
178. 前記腫瘍局在化部分が、腫瘍抗原を認識する結合分子であるかまたはそれを含む、態様177の方法。
179. 前記結合分子が、抗体もしくはその抗原結合断片を含むか、または、野生型IgSFドメインもしくはそのバリエーションを含む、態様178の方法。
180. 態様107～117のいずれかの免疫調節タンパク質または態様118～125のいずれかのコンジュゲートを含む薬学的組成物が前記対象に投与される、態様171および175～179のいずれかの方法。
181. 膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションCD80ポリペプチドを含む改変細胞が前記対象に投与され、かつ/または、態様138、139および142～151のいずれかの改変細胞が前記対象に投与される、態様172～176のいずれかの方法。
182. 膜貫通型免疫調節タンパク質であるバリエーションCD80ポリペプチドをコードする感染性物質が、任意で該感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染しかつ該膜貫通型免疫調節タンパク質が該感染細胞の表面上に発現する条件下で、前記対象に投与される、態様171、175および176のいずれかの方法。
183. 前記膜貫通型免疫調節タンパク質が、態様91～97のいずれかの膜貫通型免疫調節タンパク質である、態様181または態様182のいずれかの方法。
184. 前記疾患または病態が、腫瘍またはがんである、態様171～183のいずれかの方法。
185. 前記疾患または病態が、黒色腫、肺がん、膀胱がん、血液悪性腫瘍、肝臓がん、脳がん、腎臓がん、乳がん、膵臓がん、大腸がん、脾臓がん、前立腺がん、精巣がん、卵巣がん、子宮がん、胃がん、筋骨格がん、頭頸部がん、消化器がん、生殖細胞がん、または内分泌および神経内分泌がんから選択される、態様171～184のいずれかの方法。
186. 免疫応答が低下する、態様171～175のいずれかの方法。
187. 可溶性であるバリエーションCD80ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が前記対象に投与される、態様171、175および186のいずれかの方法。
188. 前記可溶性ポリペプチドまたは免疫調節タンパク質が、Fc融合タンパク質である、態様187の方法。
189. 態様1～90および95～97のいずれかのバリエーションCD80ポリペプチドまたは態様98～106および111～117のいずれかの免疫調節タンパク質を含む薬学的組成物が前記対象に投与される、態様171、175および186～188のいずれかの方法。
190. 分泌性バリエーションCD80ポリペプチドを含む改変細胞が前記対象に投与される、態様172～175および186のいずれかの方法。
191. 態様138～141および144～151のいずれかの改変細胞が前記対象に投与される、態様172～175および186～188のいずれかの方法。
192. 分泌性免疫調節タンパク質であるバリエーションCD80ポリペプチドをコードする感染性物質が、任意で該感染性物質が腫瘍細胞または免疫細胞に感染しかつ該分泌性免疫調節タンパク質が該感染細胞から分泌される条件下で、前記対象に投与される、態様171、175および186～188のいずれかの方法。
193. 前記疾患または病態が、炎症性または自己免疫性の疾患または病態である、態様171～175および186～192のいずれかの方法。
194. 前記疾患または病態が、抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎、血管炎、自己免疫性皮膚疾患、移植手術（transplantation）、リウマチ性疾患、炎症性消化器疾患、



炎症性眼疾患、炎症性神経系疾患、炎症性肺疾患、炎症性内分泌疾患、または自己免疫性血液学的疾患である、態様171～175および186～193のいずれかの方法。

195. 前記疾患または病態が、炎症性腸疾患、移植(transplant)、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、喘息、関節リウマチ、または乾癬から選択される、態様193または態様194の方法。

#### 【実施例】

#### 【0402】

#### IX. 実施例

以下の実施例は、単に例示を目的に含まれるものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

#### 【0403】

#### 実施例1

#### IgSFドメインの変異体DNA構築物の生成

実施例1は、酵母ディスプレイライブラリーとしての酵母の表面上での翻訳および発現のための、ヒトCD80 IgSFドメインの変異体DNA構築物の生成を記載する。

#### 【0404】

#### A. 縮重ライブラリー

野生型ヒトCD80アミノ酸配列の(UniProt Accession No. P33681に記載の配列の35～242番目の残基に相当する)SEQ ID NO:28に記載の細胞外ドメイン(ECD):

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKN  
RTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISD  
FEIPTSNIIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTT  
NHSEFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN

に基づいて構築物を生成した。

#### 【0405】

縮重コドンでの完全または部分的ランダム化のための特異的残基を標的化するライブラリーについて、SEQ ID NO:28をコードするDNAを、Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) から、最大80塩基対(bp)長の一連の重複オリゴヌクレオチドとして注文した。ECDの多様なバリエーションのライブラリーを生成するために、オリゴヌクレオチドは、所望のアミノ酸位置に所望の縮重コドンを含む。URL: rosettadesign.med.unc.edu/SwiftLib/におけるアルゴリズムを使用して、縮重コドンを作成した。

#### 【0406】

概して、変異させる位置および縮重コドンを以下から選択した: 関心対象の標的-リガンド対の結晶構造を使用して、リガンド接触残基ならびにタンパク質相互作用界面にある残基を同定した。この分析を、URL: spdbv.vital-it.ch) で利用可能な構造ビューア(structure viewer) を使用して実施した。例えば、CTLA-4に結合したCD80の結晶構造は、URL: www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1I8L) で公的に入手可能であり、CTLA-4への改善された結合剤の選択のためCD80::CTLA-4界面に基づいて標的化ライブラリーを設計した。しかしながら、リガンドCD28およびPDL1で利用可能なCD80構造は存在しないので、同じライブラリーをまた使用して、CD28(CTLA-4とCD80上の同じ領域に結合する) およびPDL1(PDL1がCTLA-4と同じ部位と結合するかどうかは分かっていない) の結合剤を選択した。

#### 【0407】

ライブラリー設計における次の工程は、保存されている残基を同定するためのヒト、マウス、ラットおよびサルCD80配列のアライメントであった。この分析に基づいて、保存されている標的残基を縮重コドンで変異させたところ、保存的アミノ酸変化+野生型残基を特定しただけであった。保存されていない残基を、より積極的に変異させたが、これ

10

20

30

40

50

も野生型残基を含んでいた。野生型残基をまたコードする縮重コドンを設置して、標的タンパク質の過度の変異誘発を回避した。同じ理由で、変異誘発のため最大20の位置までしか一度に標的化できなかった。これらの残基は、接触残基と非接触界面残基との組み合わせであった。

#### 【0408】

オリゴヌクレオチドを滅菌水に溶解させ、等モル比で混合し、95℃に5分間加熱し、そして、アニーリングのためゆっくり室温まで冷ました。次いで、ECDの開始点および終点にアニーリングするECD特異的オリゴヌクレオチドプライマーをそれぞれ使用して、PCR産物を生成した。次いで、改変バージョンのpBYDS03クローニングベクター（Life Technologies USA）とBamH1およびKpn1クローニング部位以外および以内で40～50bpだけ重複するECD特異的オリゴヌクレオチドを使用して、前工程からのPCR産物100ngを増幅させ、合計5μgのDNAを生成した。両方のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、OneTaq 2×PCR master mix（New England Biolabs, USA）を使用して実施した。PCR精製キット（Qiagen, Germany）を使用して第二のPCR産物を精製し、滅菌脱イオン水に再懸濁した。

#### 【0409】

ライブラリー挿入を準備するために、改変された酵母ディスプレイバージョンのベクターpBYDS03をBamH1およびKpn1制限酵素（New England Biolabs, USA）で消化し、そして、大きなベクター断片をゲル精製して、滅菌脱イオン水に溶解させた。ライブラリーDNA 12μgと線状ベクター4μgを総容量50μlの脱イオンおよび滅菌水中で混合することによって、次の工程のためのエレクトロポレーション可能なDNAを生成した。標的化ライブラリーを生成するための代替の方法は、縮重コドンを含むオリゴヌクレオチドを用いて標的ECDの部位特異的変異誘発（Multisite kit, Agilent, USA）を行うことであった。このアプローチを使用して、変異誘発のための標的タンパク質の特異的なストレッチのみを標的化するサブライブラリーを生成した。これらの場合、選択工程に進む前にサブライブラリーを混合した。概して、ライブラリーサイズは、 $10^7 \sim 10^8$ 個のクローンの範囲であったが、ただし、サブライブラリーは、 $10^4 \sim 10^5$ 個の範囲でしかなかった。大きなライブラリーおよびサブライブラリーをICOSLについて生成する。

#### 【0410】

##### B. ランダムライブラリー

また、ランダムライブラリーを構築して、（UniProt Accession No. P33681に記載の配列の35～135番目の残基に相当するIgVドメインを含むし、野生型配列のC末端側の隣接残基を伴う）SEQ ID NO:28に記載のCD80のECDのバリエーションを同定した。野生型ECDをコードするDNAを、改変された酵母ディスプレイベクターpBYDS03のBamH1部位とKpn1部位との間にクローニングし、次いで、同じ制限酵素を使用して切り離した。次いで、ライブラリーバリエーションあたり平均3～5つのアミノ酸変化を生成するために、切り離したDNAをGenemorph II kit（Agilent, USA）で変異誘発させた。次いで、変異誘発させたDNAを2工程PCRによって増幅させ、標的化ライブラリーについて上記のとおりさらに処理した。

#### 【0411】

##### 実施例2

##### 酵母へのDNAライブラリーの導入

実施例2は、酵母へのCD80 DNAライブラリーの導入を記載する。縮重およびランダムライブラリーDNAを酵母に導入するために、酵母BJ5464系統（ATCC.org；ATCC number 208288）のエレクトロポレーションコンピテントセルを調製し、そして、上の工程からのエレクトロポレーション可能なDNAを用いてGene Pulser II（Biorad, USA）で基本的には記載のとおりエレクトロポレーションした（Colby, D.W. et al. 2004 Methods Enzymology 388, 348-358）。唯一の例外は、改変プラスミドpBYDS03によって担持されるLEU2選択マーカーに対応するために形質転換細胞を非誘導最小選択SCD-Leu培地中で成長させたことであった。

## 【0412】

ライブラリーサイズは、新たに回収した細胞の希釈物をSCD-Leu寒天プレート上にプレーティングし、次いで、1プレート当たり少なくとも50個のコロニーを生成したプレーティング由来の単一コロニーの数からライブラリーサイズを推定することによって決定した。エレクトロポレーションした培養物の残りを飽和まで成長させ、そして、この培養物に由来する細胞を同じ培地中でもう一度継代培養して、非形質転換細胞の画分を最小限に抑えた。ライブラリーの多様性を維持するために、計算したライブラリーサイズよりも少なくとも $10 \times$ 以上の細胞を含有する接種源を使用してこの継代培養工程を行った。第二の飽和培養物に由来する細胞を、滅菌25%（重量/体積）グリセロールを含有する新鮮培地に $10^{10}$ 個/mlの密度に再懸濁して、 $-80^\circ\text{C}$ で凍結および貯蔵した（凍結ライブラリーストック）。

10

## 【0413】

SCD-Leu培地1リットルは、クエン酸ナトリウム14.7グラム、クエン酸一水和物4.29グラム、デキストロース20グラム、Difcoブランドの酵母用ニトロゲンベース6.7グラム、およびロイシン不含の酵母用合成ドロップアウト培地サプリメント1.6グラムからなる。 $0.2 \mu\text{M}$ の真空濾過装置を使用して、使用前に培地を滅菌濾過した。

## 【0414】

ライブラリーサイズは、新たに回収した細胞の希釈物をSCD-Leu寒天プレート上にプレーティングし、次いで、1プレート当たり少なくとも50個のコロニーを生成したプレーティング由来の単一コロニーの数からライブラリーサイズを推定することによって決定した。

20

## 【0415】

2つ以上の異なるライブラリークローンを含有する細胞からプラスミドを分離するために、ライブラリーサイズの10倍に相当する数の細胞をSCD-Leu一晩培養物から採取し、新鮮SCD-Leu培地中に1/100に継代培養し、そして、一晩成長させた。この一晩培養物に由来する細胞を、滅菌25%（重量/体積）グリセロールに $10^{10}$ 個/mlの密度に再懸濁して、 $-80^\circ\text{C}$ で凍結および貯蔵した（凍結ライブラリーストック）。

## 【0416】

## 実施例3

## 酵母の選択

実施例3は、CD80の親和性が改変されたバリエーションを発現する酵母の選択を記載する。ライブラリーサイズの少なくとも10倍に等しい数の細胞を、個々のライブラリーストックから解凍し、非誘導SCD-Leu培地中 $0.1 \times 10^6$ 個の細胞/mlに懸濁し、一晩成長させた。翌日、ライブラリーサイズの10倍に等しい数の細胞を2000 RPMで2分間遠心分離し、誘導SCDG-Leu培地中 $0.5 \times 10^6$ 個の細胞/mlに再懸濁した。SCDG-Leu誘導培地1リットルは、水に溶解させて $0.22 \mu\text{m}$ の膜濾過装置に通して滅菌した、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5.4グラム、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  8.56グラム、ガラクトース20グラム、デキストロース2.0グラム、Difco酵母用ニトロゲンベース6.7グラム、およびロイシン不含の酵母用合成ドロップアウト培地サプリメント1.6グラムからなる。培養物を $20^\circ\text{C}$ で2日間成長させて、酵母細胞表面でライブラリータンパク質の発現を誘導した。

30

## 【0417】

細胞を磁気ビーズで処理して、結合しないものを減らし、外因性組換えカウンター構造体タンパク質に結合する能力を有する全てのバリエーションCD80ポリペプチドを富化させた。例えば、酵母提示された標的化またはランダムCD80ライブラリーを、CD28、CTLA-4、およびPD-L1の各々に対して別々に選択した。これに続いて、外因性カウンター構造体タンパク質染色を使用した2~3ラウンドのフローサイトメトリーソーティングを行って、改善された結合物を提示する酵母細胞の画分を富化させた。磁気ビーズによる富化およびフローサイトメトリーによる選択は、基本的には、Keith D. Miller,<sup>1</sup> Noah B. Pefaur,<sup>2</sup> and Cheryl L. Baird<sup>1</sup> Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008 に記載のとおりである。

40

## 【0418】

50

CD80ライブラリーと共に、標的リガンドタンパク質は、以下のとおりR&D Systems (USA) から供給された：ヒトrCD28.Fc (すなわち、組換えCD28-Fc融合タンパク質)、rPDL1.Fc、およびrCTLA4.Fc。磁気ストレプトアビジンビーズをNew England Biolabs, USAから得た。カウンター構造体タンパク質のビオチン化のために、ビオチン化キット (cat# 21955, Life Technologies, USA) を使用した。2色フローサイトメトリーソーティングのために、Becton Dickinson FACS Aria II sorterを使用した。CD80提示レベルを、Alexafluor 488 (Life Technologies, USA) で標識した抗ヘマグルチニン (抗HA) 抗体でモニタリングした。リガンド結合Fc融合タンパク質rCD28.Fc、rCTLA4.Fc、およびrPDL1.Fcを、PEコンジュゲートヒトIg特異的ヤギFab (Jackson ImmunoResearch, USA) で検出した。二重酵母を前方散乱 (FSC) / 側方散乱 (SSC) パラメーターを使用してゲーティングし、そして、ソートゲートは、FL4で検出されたより高いリガンド結合に基づいており、FL1でより限定されたタグ発現結合を保有した。

#### 【0419】

フローサイトメトリーソートからの酵母アウトプットを、より高い特異的結合親和性についてアッセイした。ソートアウトプット酵母を増殖および再誘導して、これらがコードする特定のIgSF親和性改変ドメインバリエーションを発現させた。次いで、この集団を、フローサイトメトリーによって、親の野生型酵母系統、またはビーズアウトプット酵母集団のような任意の他の選択されたアウトプットと比較することができる。

#### 【0420】

重要なことに、上記の全てのF2アウトプットのMFIは、FL1にて抗HAタグ抗体を用いて測定したとき、野生型系統と比較して増加することなく、時に低下した場合もあったが、このことは、向上した結合性が選択されたバリエーションの酵母の表面での増加した発現の関数ではなかったことを示しており、そして、高いリガンド結合を有する中から低エクスペレッサーのみを選択するゲーティング戦略を検証した。

#### 【0421】

選択されたバリエーションCD80 ECDドメインをさらに融合タンパク質としてフォーマット化し、以下のとおり、結合活性および機能活性について試験した。

#### 【0422】

##### 実施例4

Fc融合物としてのおよび種々の免疫調節タンパク質タイプにおける選択アウトプットの再編成

実施例4は、Fc分子に融合されたCD80の親和性が改変された (バリエーション) 細胞外ドメイン (ECD) (バリエーションECD-Fc融合分子) を含有する免疫調節タンパク質としての選択アウトプットの再編成を記載する。

#### 【0423】

最終フローサイトメトリーCD80ソートからのアウトプット細胞をSCD-Leu培地中末端密度まで成長させた。各アウトプットからのプラスミドDNAを、酵母プラスミドDNA単離キット (Zymoresearch, USA) を使用して単離した。Fc融合物について、選択したFc融合ベクターへのクローニングに好適な制限部位を付加したPCRプライマーを使用して、プラスミドDNAプレップから変異体標的ECDのコーディングDNAをバッチ増幅させた。制限消化後、PCR産物を、適切なFc融合ベクターにライゲーションし、続いて、XL1 Blue系統大腸菌 (Agilent, USA) またはNEB5 (New England Biolabs) に供給者の指示どおり化学形質転換した。例示的なFc融合ベクターは、pFUSE-hIgG1-Fc2 (Invivogen, USA) である。

#### 【0424】

形質転換反応の希釈物を、100 µg/mlカルベニシリン (Teknova, USA) を含有するLB-寒天上にプレーティングして、単一コロニーを生成した。次いで、各形質転換からの最大96個のコロニーを、96ウェルプレート内、LB-プロス (Teknova cat # L8112) 中37 °Cで一晩飽和まで成長させ、そして、全てのクローン中の変異を同定するために各ウェルからの小アリコートにECDインサートのDNAシーケンシングに送った。サービス提供

10

20

30

40

50

会社 (Genewiz ; South Plainfield, NJ) によって提供されるプロトコールを使用して、DNAシーケンシング用の試料調製を行った。DNAシーケンシング用の試料を取り出した後、次いで残りの培養物にグリセロールを最終グリセロール含量25%まで加え、そして、後で使用するためプレートにマスタープレート (以下参照) として-20℃で貯蔵した。あるいは、DNAシーケンシング用の試料を、成長させた液体培養物から固体寒天プレートへのディスポーザブル96ウェルレプリケーター (VWR, USA) を使用したレプリカプレートティングによって生成した。これらのプレートを一晩インキュベートして成長パッチを生成し、そして、プレートをGenewizに規定されているとおりGenewizに送った。いくつかの場合は、変異を検証するために再度シーケンシングを実施した。

#### 【0425】

Genewizで生成されたDNAシーケンシングデータの分析からの関心対象のクローンの同定後、関心対象のクローンをマスタープレートから回収し、100 µg/mlカルベニシリン (Teknova, USA) を含有する液体LB-ブロス5ml中で密度まで個々に成長させ、次いで、各培養物2mlを、Pureyield kit (Promega) のような標準キットを使用する各クローンの約10 µgのミニプレッププラスミドDNAの調製に使用した。関心対象のクローンの同定は、概して、以下の工程を包含した。最初に、DNA配列データファイルをGenewizウェブサイトからダウンロードした。次いで、ECDコード領域の開始点で始まるように全ての配列を手動で処理した。次いで、URL:[www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)で利用可能な好適なプログラムを使用して、処理した配列をパッチ翻訳した。次いで、翻訳した配列を、URL:[multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html)で利用可能な好適なプログラムを使用してアライメントさせた。

#### 【0426】

次いで、関心対象のクローンを以下の基準を使用して同定した：1.) 同一のクローンがアライメント中に少なくとも2回生じる、および2.) 変異がアライメント中に少なくとも2回、好ましくは別個のクローンで生じる。これらの基準のうちの少なくとも1つを満たしたクローンは、改善された結合に起因してソーティングプロセスによって富化されたクローンであった。

#### 【0427】

少なくとも1つの親和性改変ドメインを有するCD80のECDを含有するFc融合タンパク質である免疫調節タンパク質を生成するために、以下のとおり設計されたタンパク質をコードするコーディング核酸分子を生成した：バリエーション (変異型) ECD、続いて3つのアラニン (AAA) のリンカー、続いてSEQ ID NO:226に示される野生型ヒトIgG1 Fcを基準にした変異R77C、N82GおよびV87Cを含有するヒトIgG1 Fc。その構築物は、システインと共有結合を形成することができる抗体軽鎖を含まないので、ヒトIgG1 Fcはまた、SEQ ID NO:226に示される野生型または未改変のFcと比較して、5位のシステイン残基のセリン残基への置換 (C5S) を含有する。

#### 【0428】

### 実施例5

#### Fc融合物の発現および精製

実施例5は、バリエーションECD CD80を含有するFc融合タンパク質のハイスループット発現および精製を記載する。

#### 【0429】

組換えバリエーションFc融合タンパク質をExpi293発現系 (Invitrogen, USA) で生産した。先の工程からの各プラスミドDNA 4 µgをOpti-MEM (Invitrogen, USA) 200 µlに加え、同時に、ExpiFectamine 10.8 µlを別のOpti-MEM 200 µlに別々に加えた。5分後、プラスミドDNA 200 µlをExpiFectamine 200 µlと混合し、この混合物を細胞に加える前に追加で20分間さらにインキュベートした。1000万個のExpi293細胞を、10mlの滅菌円錐底ディープ24ウェル成長プレート (Thomson Instrument Company, USA) の別々のウェルのExpi293培地 (Invitrogen, USA) 容量3.4ml中に分注した。プレートを、湿度95%および8%CO<sub>2</sub>に設定された哺乳動物細胞培養インキュベーター内、120RP

10

20

30

40

50

Mで5日間振盪した。5日間のインキュベーション後、細胞をペレット化し、培養上清を取り出した。

【0430】

ハイスルーブット96ウェルタンパク質A精製キット (Catalog number 45202, Life Technologies, USA) を使用し製造業者のプロトコールを使用して、上清からタンパク質を精製した。得られた溶出分画を、Zeba 96 well spin desalting plate (Catalog number 89807, Life Technologies, USA) を使用し製造業者のプロトコールを使用して、PBSに緩衝液交換した。Nanodrop instrument (Thermo Fisher Scientific, USA) によって測定した280nmの吸光度を使用して、精製したタンパク質を定量し、そして、タンパク質5 µgを変性および還元条件下のNUPAGEブレイキャストポリアクリルアミドゲル (Life Technologies, USA) 上にロードし、その後ゲル電気泳動することによってタンパク質純度を評価した。標準的なクマシー染色を使用してゲル中でタンパク質を可視化した。

10

【0431】

実施例6

親和性成熟されたIgSFドメイン含有分子の結合および活性の評価

A. 細胞に発現しているカウンター構造体に対する結合性

この実施例は、同族結合パートナーに対するCD80ドメインバリエーション免疫調節タンパク質の特異性および親和性を示すFc融合物結合研究を記載する。

【0432】

同族結合パートナーを発現する細胞を生産するため、ヒトCD28、CTLA-4、およびPD-L1の各々についての全長哺乳動物表面発現構築物は、pcDNA3.1発現ベクター (Life Technologies) 中で設計されており、これはGenscript, USAから供給された。Expi293F一過性トランスフェクション系 (Life Technologies, USA) を使用して結合研究を行った。実験に必要な細胞数を決定し、そして、製造業者の推奨プロトコールを使用して、適切な30mlスケールのトランスフェクションを実施した。CD28、CTLA-4、PD-L1、またはモックの30mlトランスフェクション毎に、7500万個のExpi293F細胞を発現構築物DNA 30 µgおよび希釈したExpiFectamine 293試薬1.5mlと48時間インキュベートし、その時点で染色用に細胞を収集した。

20

【0433】

フローサイトメトリーによる染色のために、適切な一過性トランスフェクションまたは陰性対照の200,000個の細胞を96ウェル丸底プレート中にプレーティングした。細胞をスピンドウンし、染色緩衝液 (PBS (リン酸緩衝食塩水)、1% BSA (ウシ血清アルブミン)、および0.1% アジ化ナトリウム) 中に20分間再懸濁して、非特異的結合をブロッキングした。その後、細胞を再度遠心分離し、これを、50 µlの各候補バリエーションCD80 Fcタンパク質の実験に応じて、100nM ~ 1nMのバリエーション免疫調節タンパク質を含有する染色緩衝液に再懸濁した。一次染色を氷上で45分間実施した後、染色緩衝液中で細胞を2回洗浄した。PEコンジュゲート抗ヒトFc (Jackson ImmunoResearch, USA) を染色緩衝液50 µl中に1:150に希釈し、細胞に加えて氷上でさらに30分間インキュベートした。二次抗体を2回洗い流し、細胞を4%ホルムアルデヒド / PBS中で固定し、そして、FACSscan flow cytometer (Becton Dickinson, USA) で試料を分析した。

30

40

【0434】

トランスフェクタントおよび陰性親系統毎に、Cell Quest Pro software (Becton Dickinson, USA) で平均蛍光強度 (MFI) を計算した。

【0435】

B. 生物活性の特性決定

この実施例は、ヒト初代T細胞インビトロアッセイにおけるFc融合バリエーションタンパク質の生物活性の特性決定をさらに記載する。

【0436】

1. 混合リンパ球反応 (MLR)

可溶性rCD80.Fcの生物活性をヒト混合リンパ球反応 (MLR) で試験した。PBMC (Be

50

nTech Bio, USA) から単離された単球をEx-Vivo 15培地 (Lonza, Switzerland) 中500U/ml rIL-4 (R&D Systems, USA) および250U/ml rGM-CSF (R&D Systems, USA) とインビトロで7日間培養することによって、ヒト初代樹状細胞 (DC) を生成した。10,000個の成熟DCおよび100,000個の精製同種CD4<sup>+</sup>T細胞 (BenTech Bio, USA) を、96ウェル丸底プレート内、最終容量200  $\mu$ lのEx-Vivo 15培地中でバリエーションCD80 Fc融合タンパク質および対照と共培養した。5日目に、Human IFN- $\gamma$  DuoSet ELISA kit (R&D Systems, USA) を使用して培養上清中のIFN- $\gamma$  分泌を分析した。VMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, USA) によって光学密度を測定し、IFN- $\gamma$  Duo-set kit (R&D Systems, USA) に含まれる用量設定したrIFN- $\gamma$  標準に対して定量した。

10

【0437】

## 2. 抗CD3同時固定アッセイ

CD80融合バリエーションの共刺激生物活性を抗CD3同時固定アッセイで決定した。1nMまたは4nMのマウス抗ヒトCD3 (OKT3, Biolegends, USA) を、1nM~80nMのrCD80.Fcバリエーションタンパク質のPBS溶液で希釈した。この混合物を、組織培養処理平底96ウェルプレート (Corning, USA) に一晩加え、プレートのウェルへの刺激タンパク質の付着を促進させた。翌日、未結合のタンパク質をプレートから洗い出し、最終容量200  $\mu$ lのEx-Vivo 15 media (Lonza, Switzerland) 中、100,000個の精製ヒトパント細胞 (BenTech Bio, US) またはヒトT細胞クローンBC3 (Astarte Biologics, USA) を、各ウェルに加えた。細胞を3日間培養した後、培養上清を採取し、上に述べたとおりDuoSet ELISA kit (R&D Systems, USA) でヒトIFN- $\gamma$  レベルを測定した。

20

【0438】

## C. 結果

例示的な試験バリエーションについての結合および活性研究の結果を表7および8に示した。具体的には、表7は、それぞれの同族構造体CD28に対する親和性成熟スクリーニングにおいて選択されたCD80のECDにおける例示的なIgSFドメインアミノ酸置換 (交換) を示す。表8は、それぞれの同族構造体PD-L1に対する親和性成熟スクリーニングにおいて選択されたCD80のECDにおける例示的なIgSFドメインアミノ酸置換 (交換) を示す。当該表において、例示的なアミノ酸置換は、それぞれの参照未改変ECD配列に対応するアミノ酸位置番号によって示されている。例えば、表7および8の参照未改変ECD配列は、SEQ ID NO:28に示される未改変CD80 ECD配列である。アミノ酸位置が中央に示されており、対応する未改変 (例えば、野生型) アミノ酸が番号の前に示されており、同定されたバリエーションアミノ酸置換が番号の後に示されている。2列目は、各バリエーションECD-Fc融合分子のバリエーションECDの配列番号を示す。

30

【0439】

また、同族カウンター構造体リガンドを発現するように改変された細胞への各バリエーションFc融合分子の結合についての平均蛍光強度 (MFI) 値によって測定した結合活性、および同じ細胞が発現するカウンター構造体リガンドへのアミノ酸置換を含有しない対応する未改変ECD-Fc融合分子の結合についてのMFIと比べた比によって測定した結合活性が示されている。また、バリエーションFc融合分子の、T細胞の活性を調節する機能活性が、i) 抗CD3と同時固定された表示のバリエーションECD-Fc融合分子、またはii) MLRアッセイにおける表示のバリエーションECD-Fc融合分子のいずれかで生成された培養上清中のIFN- $\gamma$  の計算レベル (pg/ml) に基づいて示されている。表7および8はまた、両方の機能性アッセイにおける、各バリエーションECD-Fcによって産生されたIFN- $\gamma$  の、対応する未改変ECD-Fcと比べた比も示している。

40

【0440】

示すとおり、選択は、少なくとも1つ、いくつかの場合では複数の同族カウンター構造体リガンドに対して向上した結合性を示すように親和性が改変された多数のCD80 IgSFドメインバリエーションの同定をもたらした。加えて、その結果は、バリエーション分子の親和性改変がまた、分子のフォーマットに応じて免疫活性を増強および/または低減する改善された

50

活性を発揮したことを示した。例えば、リガンドの同時固定は、おそらく、アミノ酸交換を含有しない未改変（例えば、野生型）ECD-Fc分子と比較して、細胞との多価相互作用を提供してクラスタ化するか、またはアゴニスト活性を有利にするアビディティを増加させてT細胞活性化を増加させる。しかしながら、分子が溶液中で二価Fc分子として提供される時、同じIgSFドメインバリエーションは、アミノ酸交換を含有しない未改変（例えば、野生型）ECD-Fv分子と比較して、T細胞活性化を減少させるアンタゴニスト活性を示した。

【 0 4 4 1 】

（表 7）CD28 に対して選択されたCD80バリエーション。分子配列、結合データ、および共刺激生物活性データ

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			抗CD3との同時固定	MLR
		CD28 MFI (親に対する比率)	CTLA-4 MFI (親に対する比率)	PD-L1 MFI (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ pg/ml (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ レベル pg/ml (親に対する比率)
L70Q/A91G/N144D	414	125 (1.31)	283 (1.36)	6 (0.08)	93 (1.12)	716 (0.83)
L70Q/A91G/T130A	56	96 (1.01)	234 (1.13)	7 (0.10)	99 (1.19)	752 (0.87)
L70Q/A91G/I118A/ T120S/T130A/K169E	415	123 (1.29)	226 (1.09)	7 (0.10)	86 (1.03)	741 (0.86)
V4M/L70Q/A91G/I118V/ T120S/T130A/K169E	416	89 (0.94)	263 (1.26)	6 (0.09)	139 (1.67)	991 (1.14)
L70Q/A91G/ I118V/T120S/ T130A/K169E	417	106 (1.12)	263 (1.26)	6 (0.09)	104 (1.25)	741 (0.86)
V20L/L70Q/A91S/ I118V/ T120S/T130A	419	105 (1.11)	200 (0.96)	9 (0.13)	195 (2.34)	710 (0.82)
S44P/L70Q/A91G/ T130A	61	88 (0.92)	134 (0.64)	5 (0.07)	142 (1.71)	854 (0.99)
L70Q/A91G/E117G/ I118V/ T120S/T130A	420	120 (1.27)	193 (0.93)	6 (0.08)	98 (1.05)	736 (0.85)
A91G/T120S/ I118V/T130A	421	84 (0.89)	231 (1.11)	44 (0.62)	276 (3.33)	714 (0.82)
L70R/A91G/ I118V/T120S/ T130A/T199S	422	125 (1.32)	227 (1.09)	6 (0.09)	105 (1.26)	702 (0.81)
L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/ T130A	423	140 (1.48)	185 (0.89)	18 (0.25)	98 (1.18)	772 (0.89)
L70Q/Y87N/A91G/ T130A	66	108 (1.13)	181 (0.87)	6 (0.08)	136 (1.63)	769 (0.89)
T28S/L70Q/A91G/ E95K/I118V/T120S/I126V/ T130A/K169E	424	32 (0.34)	65 (0.31)	6 (0.08)	120 (1.44)	834 (0.96)
N63S/L70Q/A91G/ S114T/I118V/T120S/T130A	425	124 (1.30)	165 (0.79)	6 (0.08)	116 (1.39)	705 (0.81)
K36E/I67T/L70Q/ A91G/ I118V/T120S/ T130A/N152T	426	8 (0.09)	21 (0.10)	5 (0.08)	53 (0.63)	852 (0.98)
E52G/L70Q/A91G/ D107N/I118V/ T120S/T130A/K169E	427	113 (1.19)	245 (1.18)	6 (0.08)	94 (1.13)	874 (1.01)
K37E/F59S/L70Q/ A91G/T120S/ T130A	428	20 (0.21)	74 (0.36)	6 (0.08)	109 (1.31)	863 (1.00)
A91G/S103P	72	39 (0.41)	56 (0.27)	9 (0.13)	124 (1.49)	670 (0.77)

10

20

30

40

50



CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			抗CD3との同時固定	MLR
		CD28 MFI (親に対する比率)	CTLA-4 MFI (親に対する比率)	PD-L1 MFI (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ pg/ml (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ レベル pg/ml (親に対する比率)
K89E/T130A	73	90 (0.95)	148 (0.71)	75 (1.07)	204 (2.45)	761 (0.88)
A91G	74	96 (1.01)	200 (0.96)	85 (1.21)	220 (2.65)	877 (1.01)
D60V/A91G/ I118V/T120S/ T130A/K169E	429	111 (1.17)	222 (1.07)	12 (0.18)	120 (1.44)	744 (0.86)
K54M/L70Q/ A91G/Y164H	430	68 (0.71)	131 (0.63)	5 (0.08)	152 (1.83)	685 (0.79)
M38T/L70Q/E77G/ A91G/ I118V/T120S/ T130A/N152T	431	61 (0.64)	102 (0.49)	5 (0.07)	119 (1.43)	796 (0.92)
R29H/E52G/L70R/ E88G/A91G/T130A	78	100 (1.05)	119 (0.57)	5 (0.08)	200 (2.41)	740 (0.85)
Y31H/T41G/ M43L/L70Q/ A91G/ I118V/T120S/I126V/T130A	432	85 (0.89)	85 (0.41)	6 (0.08)	288 (3.47)	782 (0.90)
V68A/T110A	80	103 (1.08)	233 (1.12)	48 (0.68)	163 (1.96)	861 (0.99)
L65H/D90G/T110A/ F116L	433	33 (0.35)	121 (0.58)	11 (0.15)	129 (1.55)	758 (0.88)
R29H/E52G/ D90N/I118V/T120S/ T130A	434	66 (0.69)	141 (0.68)	11 (0.15)	124 (1.49)	800 (0.92)
A91G/L102S	83	6 (0.06)	6 (0.03)	5 (0.08)	75 (0.90)	698 (0.81)
I67T/L70Q/A91G/ I118V/T120S	436	98 (1.03)	160 (0.77)	5 (0.08)	1751 (21.1)	794 (0.92)
L70Q/A91G/T110A/ I118V/T120S/T130A	437	8 (0.09)	14 (0.07)	5 (0.07)	77 (0.93)	656 (0.76)
M38V/T41D/M43I/ W50G/D76G/V83A/ K89E/I118V/T120S/I126V/ T130A	438	5 (0.06)	8 (0.04)	8 (0.11)	82 (0.99)	671 (0.78)
V22A/L70Q/S121P	87	5 (0.06)	7 (0.04)	5 (0.07)	105 (1.27)	976 (1.13)
A12V/S15F/Y31H/M38L/ T41G/M43L/D90N/T130A/P137L/ N149D/ N152T	439	6 (0.06)	6 (0.03)	5 (0.08)	104 (1.25)	711 (0.82)
I67F/L70R/E88G/ A91G/ I118V/T120S/T130A	440	5 (0.05)	6 (0.03)	6 (0.08)	62 (0.74)	1003 (1.16)
E24G/L25P/L70Q/A91G/I118V/T120S/N 152T	441	26 (0.27)	38 (0.18)	8 (0.11)	101 (1.21)	969 (1.12)
A91G/F92L/F108L/I118V/T120S	442	50 (0.53)	128 (0.61)	16 (0.11)	59 (0.71)	665 (0.77)

10

20

30

40

50

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			抗CD3との同時固定	MLR
		CD28 MFI (親に対する比率)	CTLA-4 MFI (親に対する比率)	PD-L1 MFI (親に対する比率)		
WT CD80	28	95 (1.00)	208 (1.00)	70 (1.00)	83 (1.00)	866 (1.00)

10

## 【 0 4 4 2 】

(表 8) PD-L1 に対して選択された CD80 バリエーション。分子配列、結合データ、および共刺激生物活性データ

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			抗CD3との同時固定	MLR
		CD28 MFI (親に対する比率)	CTLA-4 MFI (親に対する比率)	PD-L1 MFI (親に対する比率)		
R29D/Y31L/Q33H/ K36G/M38I/ T41A/ M43R/M47T/E81V/ L85R/K89N/A91T/ F92P/K93V/ R94L/ I118T/N149S	92	1071 (0.08)	1089 (0.02)	37245 (2.09)	387 (0.76)	5028 (0.26)
R29D/Y31L/Q33H/ K36G/M38I/T41A/ M43R/M47T/E81V/ L85R/K89N/A91T/ F92P/K93V/R94L/ N144S/N149S	93	1065 (0.08)	956 (0.02)	30713 (1.72)	400 (0.79)	7943 (0.41)
R29D/Y31L/Q33H/ K36G/M38I/T41A/ M42T/M43R/M47T/ E81V/L85R/K89N/ A91T/F92P/K93V/ R94L/L148S/N149S	94	926 (0.07)	954 (0.02)	47072 (2.64)	464 (0.91)	17387 (0.91)
E24G/R29D/Y31L/ Q33H/K36G/M38I/ T41A/M43R/M47T/ F59L/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/ K93V/R94L/H96R/ N149S/C182S	95	1074 (0.08)	1022 (0.02)	1121 (0.06)	406 (0.80)	13146 (0.69)
R29D/Y31L/Q33H/	96	1018	974	25434	405	24029

20

30

40

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			抗CD3との同時固定	MLR
		CD28 MFI (親に対する比率)	CTLA-4 MFI (親に対する比率)	PD-L1 MFI (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ pg/ml (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ レベル pg/ml (親に対する比率)
K36G/M38I/T41A/ M43R/M47T/E81V/ L85R/K89N/A91T/ F92P/K93V/R94L/ N149S		(0.08)	(0.02)	(1.43)	(0.80)	(1.25)
R29V/M43Q/E81R/ L85I/K89R/D90L/ A91E/F92N/K93Q/ R94G	97	1029 (0.08)	996 (0.02)	1575 (0.09)	342 (0.67)	11695 (0.61)
T41I/A91G	98	17890 (1.35)	50624 (1.01)	12562 (0.70)	433 (0.85)	26052 (1.36)
E88D/K89R/D90K/A91G/ F92Y/K93R/N122S/ N177S	443	41687 (3.15)	49429 (0.99)	20140 (1.13)	773 (1.52)	6345 (0.33)
E88D/K89R/D90K/A91G/ F92Y/K93R	102	51663 (3.91)	72214 (1.44)	26405 (1.48)	1125 (2.21)	9356 (0.49)
K36G/K37Q/M38I/ L40M/F59L/E81V/L85R/ K89N/A91T/F92P/ K93V/R94L/E99G/ T130A/N149S	445	1298 (0.10)	1271 (0.03)	3126 (0.18)	507 (1.00)	3095 (0.16)
E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R	102	31535 (2.38)	50868 (1.02)	29077 (1.63)	944 (1.85)	5922 (0.31)
K36G/K37Q/M38I/ L40M	103	1170 (0.09)	1405 (0.03)	959 (0.05)	427 (0.84)	811 (0.04)
K36G/L40M	443	29766 (2.25)	58889 (1.18)	20143 (1.13)	699 (1.37)	30558 (1.59)
WTCD80	28	13224 (1.00)	50101 (1.00)	17846 (1.00)	509 (1.00)	19211 (1.00)

10

20

30

## 【 0 4 4 3 】

## 実施例7

## リガンド結合競合アッセイ

実施例6に示すとおり、数種のバリエーションCD80分子は、CD28およびPD-L1の一方または両方への改善された結合を示した。リガンドCD28およびPD-L1へのCD80の結合活性をさらに評価するために、この実施例は、CD28およびPD-L1の両方に結合する例示的なバリエーションCD80ポリペプチドの非競合性を評価するリガンド競合アッセイを記載する。

## 【 0 4 4 4 】

プレートに結合したバリエーションCD80 A91G ECD-Fcを組み込んだELISAに基づく結合アッセイを設定して、CD28およびPD-L1と同時に結合するCD80の能力を評価した。Maxisorp 96ウェルELISAプレート (Nunc, USA) を、PBS中100nMのヒト組換えバリエーションCD80 A91G ECD-Fc融合タンパク質で一晩コートした。翌日、未結合タンパク質を洗い流し、プレートを、1%ウシ血清アルブミン (Millipore, USA) /PBSにて室温で1時間ブロッキングした。このブロッキング試薬をPBS/0.05% Tweenで3回洗い流し、これには、洗浄ごとにプラットフォームシェーカー上で2分間のインキュベーションを含んでいた。

40

## 【 0 4 4 5 】

競合アッセイの一方の群で、CD80をCD28とインキュベートし、次いで、CD28が結合したCD80を、その後、その他の公知のCD80リガンドカウンター構造体PD-L1もしくはC

50

TLA-4または陰性対照リガンドPD-L2のいずれかの存在下で、競合的結合についてアッセイした。具体的には、ビオチン化組換えヒトCD28 Fc融合タンパク質 (rCD28.Fc; R&D Systems) を、ウェルに、10nMで開始して1:2希釈での8点希釈によって容量25  $\mu$ lで力価測定した。ビオチン化rCD28.Fcを加えた直後、未標識の競合結合剤、すなわち組換えヒトPD-L1単量体hisタグ化タンパク質、組換えヒトCTLA-4単量体hisタグ化タンパク質、または陰性対照ヒト組換えPD-L2 Fc融合タンパク質 (R&D Systems) をそれぞれ、ウェルに、容量25  $\mu$ lで2000/1000/500nMにて終容量50  $\mu$ lで加えた。これらのタンパク質と一緒に1時間インキュベートした後、上記のとおり3回の洗浄工程を繰り返した。

【0446】

洗浄後、1ウェル当たり2.5ngのHRPコンジュゲートストレプトアビジン (Jackson Immunoresearch, USA) を1% BSA/PBS中で希釈し、ウェルに加えて、結合したビオチン化rCD28.Fcを検出した。1時間のインキュベーション後、ウェルを再度上記のとおり3回洗浄した。シグナルを検出するために、洗浄に続いてTMB基質 (Pierce, USA) 50  $\mu$ lをウェルに加え、7分間インキュベートした後、2M硫酸停止溶液50  $\mu$ lを加えた。Emax Plusマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, USA) で光学密度を決定した。光学密度値をPrism (Graphpad, USA) でグラフ化した。

【0447】

結果を図7Aに示す。結果は、rCD28.Fcの力価測定に伴う、ビオチン化rCD28.FcのバリエーションCD80 A91G ECD-Fc融合タンパク質に対する低下した結合性を示した。rCD28.Fc結合を非競合対照タンパク質rPDL2の存在下で実施したとき、CD80に対するCD28結合性の低下はなかった (黒三角)。対照的に、競合対照タンパク質rCTLA-4は、CD28.Fcとインキュベートしたとき、予想どおりCD80に対する低下したCD28結合性をもたらした (x線)。組換えPD-L1をCD28.Fcとインキュベートしたとき、CD80へのCD28結合性の低下は観察されず、このことは、CD80に対するCD28およびPD-L1のエピトープが非競合的であることを実証した。CD80へのCD28競合アッセイにおいて使用した組換えPD-L1タンパク質の結合を、非ビオチン化rCD28.Fcの存在下でのビオチン化PD-L1のインキュベーションによって確認した (四角)。

【0448】

また、CD80をPD-L1とインキュベートし、次いで、PD-L1が結合したCD80を、その後、その他の公知のCD80リガンドカウンター構造体CD28もしくはCTLA-4または陰性対照リガンドPD-L2のいずれかの存在下で、競合的結合についてアッセイした逆競合も設定した。具体的には、組換えバリエーションCD80を含有するウェルにビオチン化組換えヒトPD-L1-His単量体タンパク質を力価測定することによってアッセイを実施した。このリガンドとの結合は弱めなので、力価測定を、5000nMで開始して、類似の1:2希釈を8点にて25  $\mu$ lで行った。rPD-L1-hisを使用して結合を検出したとき、競合リガンドヒトCD28.Fc、ヒトCTLA-4.Fc、またはヒトPD-L2.Fc対照を、25  $\mu$ lで終濃度2.5nMにて総容量50  $\mu$ lで加えた。その後の洗浄、検出、およびOD測定は、上記と同じであった。

【0449】

結果を図7Bに示す。力価測定したPD-L1-his結合単独は、PD-L1がプレート上に固定されたバリエーションCD80 A91G ECD-Fc融合分子に結合したことを確認した (四角)。PD-L1-His結合を非競合対照タンパク質rPDL2の存在下で実施したとき、CD80に対するPD-L1結合性の低下はなかった (三角)。CD28競合対照タンパク質rCTLA-4は、PD-L1-hisとインキュベートしたとき、CTLA-4がCD28に対して競合的であったとしても、CD80に対する低下したPD-L1結合性をもたらさなかった (x線)。この結果は、CD80結合に対するCD28とPD-L1との間の競合の欠如をさらに実証した。最後に、PD-L1-hisをCD28.Fcとインキュベートしたとき、CD80へのPD-L1結合性の低下は観察されず、このことは、CD80に対するCD28およびPD-L1のエピトープが非競合的であることを実証した。

【0450】

したがって、結果は、CTLA-4が、PD-L1または陰性対照PD-L2ではなく、CD80へのCD28の結合に競合したこと (図7A)、ならびに、CD28、CTLA-4、およびPD-L2が、CD

10

20

30

40

50

80へのPD-L1の結合に競合しなかったこと（図7B）を示した。したがって、これらの結果は、CD28およびPD-L1がCD80の非競合結合剤であること、ならびに、ELISAにおいてどのリガンドが検出されているのかとは無関係にこの非競合的結合が立証できることを実証した。

#### 【0451】

##### 実施例8

##### 追加の親和性改変IgSFドメイン

この実施例は、免疫活性化および阻害の両方において実証された二重の役割を有する免疫シナプス（IS）の他の成分である、追加の親和性が改変されたICOSL、CD86（B7-2）およびNKp30免疫調節タンパク質の設計、作製、およびスクリーニングを記載する。これらの実施例は、IgSFドメインの親和性改変が、免疫活性を増強および低減するようにいずれにも作用できるタンパク質を生成することを実証する。この仕事はまた、II型免疫調節タンパク質を形成して免疫調節活性を達成する、バリエーション親和性改変CD80と対になって融合された（すなわち、スタックされた）これらのドメインの種々の組み合わせを記載する。

#### 【0452】

酵母ディスプレイライブラリーとしての翻訳および発現のためのヒトICOSL、CD86、およびNKp30のIgSFドメインの変異体DNA構築物を、実施例1に実質的に記載のとおり生成した。縮重コドンでの完全または部分的ランダム化のための標的タンパク質の特定残基を標的化するライブラリーについて、ヒトICOSLの細胞外ドメイン（ECD）（SEQ ID NO:32）およびNKp30の細胞外ドメイン（ECD）（SEQ ID NO:54）のコーディングDNA配列を、Integrated DNA Technologies（Coralville, IA）から、最大80塩基対（bp）長の一連の重複オリゴヌクレオチドとして注文した。残基を、実施例1に実質的に記載のとおり、標的化変異導入によって変異させた。あるいは、実施例1に実質的に記載のとおり、ICOSLのECD（SEQ ID NO:32）、CD86のECD（SEQ ID NO:29）、およびNKp30のECD（SEQ ID NO:54）のバリエーションを同定するために、ランダムライブラリーを構築した。

#### 【0453】

縮重およびランダムライブラリーDNAを、実施例2に実質的に記載のとおり酵母に導入して、酵母ライブラリーを生成した。このライブラリーを使用して、実施例3に実質的に記載のとおり、ICOSL、CD86およびNKp30の親和性改変バリエーションを発現する酵母を選択した。実施例3に実質的に記載のとおり細胞を処理して結合しないものを減らし、外因性組換えカウンター構造体タンパク質と結合する能力を有するICOSL、CD86、またはNKp30のバリエーションを濃縮した。これに続いて、外因性カウンター構造体タンパク質染色を使用した2～3ラウンドのフローサイトメトリーソーティングを行って、改善された結合物を提示する酵母細胞の画分を濃縮した。磁気ビーズ濃縮およびフローサイトメトリーによる選択は、基本的には、Keith D. Miller,<sup>1</sup> Noah B. Pefaur,<sup>2</sup> and Cheryl L. Baird  
1 Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008 に記載のとおりである。

#### 【0454】

ICOSL、CD86およびNKp30ライブラリーと共に、標的リガンドタンパク質は、以下のとおりR&D Systems（USA）から供給された：ヒトrCD28.Fc（すなわち、組換えCD28-Fc融合タンパク質）、rCTLA4.Fc、rICOS.Fc、およびrB7H6.Fc。2色フローサイトメトリーを実施例3に実質的に記載のとおり実施した。フローサイトメトリーソートからの酵母アウトプットを、より高い特異的結合親和性についてアッセイした。ソートアウトプット酵母を増殖させて再誘導し、これらがコードする特定の親和性改変IgSFドメインバリエーションを発現させた。次いで、この集団を、フローサイトメトリーによって、親、野生型酵母系統、または任意の他の選択されたアウトプット、例えばビーズアウトプット酵母集団と比較することができる。

#### 【0455】

ICOSLについて、各集団を、抗HA（ヘマグルチニン）タグ発現および抗ヒトFc二次で

10

20

30

40

50

二重染色してリガンド結合を検出することによって、各rICOS.Fc、rCD28.Fc、およびrCTLA4.Fcの結合について第二のソートアウトプット（F2）を親ICOSL酵母と比較した。

【0456】

ICOSに対する結合性について選択されたICOSL酵母バリエーションの場合、F2ソートアウトプットは、5.6nM rICOS.Fcで染色したとき平均蛍光強度（MFI）値997を与えたが、一方で、親ICOSL系統のMFIは、同じ濃度のrICOS.Fcで染色したとき397と測定された。これは、このF2で選択されたクローンのプールでおおまかに3倍の平均結合の改善を表し、そして、個別に試験したときに、そのプールからの個々のクローンがはるかに良好な改善されたMFI/親和性を有すると予測される。

【0457】

CD28に対する結合性について選択されたICOSL酵母バリエーションの場合、F2ソートアウトプットは、100nM rCD28.Fcで染色したときMFI値640を与えたが、一方で、親ICOSL系統のMFIは、同じ濃度のrCD28.Fcで染色したとき29と測定された（22倍改善）。CTLA4に対する結合性について選択されたICOSL酵母バリエーションの場合、F2ソートアウトプットは、100nM rCTLA4.Fcで染色したときMFI値949を与えたが、一方で、親ICOSL系統のMFIは、同じ濃度のrCTLA4.Fcで染色したとき29と測定された（32倍改善）。

【0458】

B7-H6への結合について選択されたNKp30酵母バリエーションの場合、F2ソートアウトプットは、16.6nMのrB7H6.Fcで染色されたときMFI値533を与えたが、一方で、親NKp30系統のMFIは、同じ濃度のrB7H6.Fcで染色されたとき90と測定された（6倍改善）。

【0459】

中でも、同定されたNKp30バリエーションは、SEQ ID NO:54に示される位置に対応するNKp30細胞外ドメイン内の位置を基準に変異L30V/A60V/S64P/S86Gを含有するバリエーションであった。中でも、同定されたCD86バリエーションは、SEQ ID NO:29に示される位置に対応するCD86細胞外ドメイン内の位置を基準に変異Q35H/H90L/Q102Hを含有するバリエーションであった。中でも、同定されたICOSLバリエーションは、表8に示されかつ以下にさらに記載されるバリエーションであった。

【0460】

CD80と同様に、上記の全てのF2アウトプットのMFIは、FL1にて抗HA抗体を用いて測定したとき、野生型系統と比較して増加することなく、時に低下した場合もあったが、このことは、向上した結合性が、選択されたバリエーションの酵母の表面での増加した発現と、高いリガンド結合を有する中から低エクスペレッサーを選択するだけの検証したゲーティング戦略と相関しなかったことを示唆している。

【0461】

例示的な選択アウトプットを、実施例4に実質的に記載のとおり、Fc分子に融合されたICOSLの親和性改変（バリエーション）細胞外ドメイン（ECD）（バリエーションECD-Fc融合分子）を含有する免疫調節タンパク質として再フォーマットし、Fc融合タンパク質を実施例5に実質的に記載のとおり発現させかつ精製した。

【0462】

次いで、細胞が発現したカウンター構造体への例示的なICOSL Fc融合バリエーションの結合を、実施例6に実質的に記載のとおり評価した。同族結合パートナーを発現する細胞を生産するために、ヒトCD28およびICOSの各々に対する完全長の哺乳動物表面発現構築物を実施例6に記載のとおり実質的に生産した。結合研究およびフローサイトメトリーを実施例6に記載のとおり実質的に行った。加えて、Fc融合バリエーションタンパク質の生物活性を、実施例6に記載のとおり、混合リンパ球反応（MLR）または抗CD3同時固定アッセイのいずれかによって実質的に特性解析した。

【0463】

例示的な試験バリエーションについての結合および活性研究の結果を表9に示す。具体的には、表9は、それぞれの同族構造ICOSおよびCD28に対する親和性成熟のスクリーニングにおいて選択されたICOSLのECDにおける例示的なIgSFドメインアミノ酸置換（交換）を

10

20

30

40

50

示す。例示的なアミノ酸置換は、以下のとおり、それぞれの参照未改変ECD配列に対応するアミノ酸位置番号によって示される。例えば、表9中の参照未改変ECD配列は、SEQ ID NO:32に示される未改変のICOSL ECD配列である。アミノ酸位置が中央に示されており、対応する未改変（例えば、野生型）のアミノ酸が番号の前に記載されており、同定されたバリエーションアミノ酸置換が番号の後に記載されている。2列目は、各バリエーションECD-Fc融合分子のバリエーションECDの配列番号を示す。

【0464】

また、同族カウンター構造体リガンドを発現するように改変された細胞への各バリエーションECD-Fc融合分子の結合についての平均蛍光強度（MFI）値と、同じ細胞が発現するカウンター構造体リガンドへのアミノ酸置換を含有しない対応する未改変のECD-Fc融合分子の結合と比較したMFIの比によって測定された場合の、結合活性が示される。また、バリエーションECD-Fc融合分子のT細胞の活性を調節する機能活性が、i) 抗CD3と同時固定された表示のバリエーションECD-Fc融合分子またはii) MLRアッセイ中の表示のバリエーションECD-Fc融合分子のいずれかで生成された培養上清中のIFN- $\gamma$ の計算値（pg/ml）に基づいて示されている。また、表は、両方の機能性アッセイにおける各バリエーションECD-Fcによって生産されたIFN- $\gamma$ の、対応する未改変のECD-Fcと比べた比も示している。

【0465】

示されるとおり、選択は、少なくとも1つ、いくつかの場合では複数の同族カウンター構造体リガンドに対する向上した結合性を示すように親和性が改変された多数のICOSL IgSFドメインバリエーションの同定をもたらした。加えて、その結果は、バリエーション分子の親和性改変がまた、当該分子のフォーマットに応じて免疫活性を増強および低下させる改善された活性を示したことを示した。例えば、リガンドの同時固定は、おそらく、アミノ酸交換を含有しない未改変（例えば、野生型）のECD-Fc分子と比較して、細胞との多価相互作用を提供してクラスター化するか、またはアゴニスト活性を有利にするアピディティを向上させて、T細胞活性化を向上させる。しかしながら、分子が溶液中で二価Fc分子として提供されるとき、同じIgSFドメインバリエーションは、アミノ酸交換を含有しない未改変（例えば、野生型）のECD-Fv分子と比較して、T細胞活性化を低下させるアンタゴニスト活性を示した。

【0466】

（表9）CD28またはICOSに対して選択されたICOSLバリエーション。分子配列、結合データ、および共刺激生物活性データ。

10

20

30

40

50

ICOSL 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合		抗CD3との 同時固定	MLR
		ICOS OD (親に対する 比率)	CD28 MFI (親に対する 比率)	IFN- $\gamma$ pg/ml (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ レベル pg/ml (親に対する 比率)
N52S	109	1.33 (1.55)	162 (9.00)	1334 (1.93)	300 (0.44)
N52H	110	1.30 (1.51)	368 (20.44)	1268 (1.83)	39 (0.06)
N52D	111	1.59 (1.85)	130 (7.22)	1943 (2.80)	190 (0.28)
N52Y/N57Y/ F138L/L203P	112	1.02 (1.19)	398 (22.11)	510* (1.47*)	18 (0.03)
N52H/N57Y/Q100P	113	1.57 (1.83)	447 (24.83)	2199 (3.18)	25 (0.04)
N52S/Y146C/Y152C	114	1.26 (1.47)	39 (2.17)	1647 (2.38)	152 (0.22)
N52H/C198R	115	1.16 (1.35)	363 (20.17)	744* (2.15*)	ND (ND)
N52H/C140del/ T225A	478	ND (ND)	154 (8.56)	522* (1.51*)	ND (ND)
N52H/C198R/T225A	117	1.41 (1.64)	344 (19.11)	778* (2.25*)	0 (0)

10

20

30

40

50



ICOSL 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合		抗CD3との同時固定	MLR
		ICOS OD (親に対する比率)	CD28 MFI (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ pg/ml (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ レベル pg/ml (親に対する比率)
N52H/K92R	118	1.48 (1.72)	347 (19.28)	288* (0.83*)	89 (0.13)
N52H/S99G	119	0.09 (0.10)	29 (1.61)	184* (0.53*)	421 (0.61)
N52Y	120	0.08 (0.09)	18 (1.00)	184* (0.53*)	568 (0.83)
N57Y	121	1.40 (1.63)	101 (5.61)	580* (1.68*)	176 (0.26)
N57Y/Q100P	122	0.62 (0.72)	285 (15.83)	301* (0.87*)	177 (0.26)
N52S/S130G/ Y152C	123	0.16 (0.19)	24 (1.33)	266* (0.77*)	1617 (2.35)
N52S/Y152C	124	0.18 (0.21)	29 (1.61)	238* (0.69*)	363 (0.53)
N52S/C198R	125	1.80 (2.09)	82 (4.56)	1427 (2.06)	201 (0.29)
N52Y/N57Y/ Y152C	126	0.08 (0.09)	56 (3.11)	377* (1.09*)	439 (0.64)
N52Y/N57Y/H129P/C198R	127	ND (ND)	449 (24.94)	1192 (1.72)	ND (ND)
N52H/L161P/ C198R	128	0.18 (0.21)	343 (19.05)	643* (1.86*)	447 (0.65)
N52S/T113E	129	1.51 (1.76)	54 (3.00)	451* (1.30*)	345 (0.50)
S54A	130	1.62 (1.88)	48 (2.67)	386* (1.12*)	771 (1.12)
N52D/S54P	131	1.50 (1.74)	38 (2.11)	476* (1.38*)	227 (0.33)
N52K/L208P	132	1.91 (2.22)	291 (16.17)	1509 (2.18)	137 (0.20)
N52S/Y152H	133	0.85 (0.99)	68 (3.78)	2158 (3.12)	221 (0.32)
N52D/V151A	134	0.90 (1.05)	19 (1.06)	341* (0.99*)	450 (0.66)
N52H/I143T	135	1.83 (2.13)	350 (19.44)	2216 (3.20)	112 (0.16)
N52S/L80P	136	0.09 (0.10)	22 (1.22)	192* (0.55*)	340 (0.49)
F120S/Y152H/ N201S	137	0.63 (0.73)	16 (0.89)	351* (1.01*)	712 (1.04)

10

20

30

40

50

ICOSL 変異	SEQ ID NO (ECD)	結合		抗CD3との同時固定	MLR
		ICOS OD (親に対する比率)	CD28 MFI (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ pg/ml (親に対する比率)	IFN- $\gamma$ レベル pg/ml (親に対する比率)
N52S/R75Q/L203P	138	1.71 (1.99)	12 (0.67)	1996 (2.88)	136 (0.20)
N52S/D158G	139	1.33 (1.55)	39 (2.17)	325* (0.94*)	277 (0.40)
N52D/Q133H	140	1.53 (1.78)	104 (5.78)	365* (1.05*)	178 (0.26)
WT ICOSL	32	0.86 (1.00)	18 (1.00)	692 / 346* (1.00)	687 (1.00)

10

\* : 親に対する比率は、WT ICOSLに対して346pg/mlのIFN- $\gamma$  を使用して計算された  
【 0 4 6 7 】

#### 実施例9

異なる親和性改変ドメインを含有するスタックされた分子の生成および評価

20

この実施例は、同定されたバリエーションCD80ポリペプチドと、もう1つのさらなるバリエーションCD80、CD86、ICOSL、およびNKp30分子とが互いに連結されてFcに融合されたものに由来する、少なくとも2つの異なる親和性が改変されたドメインを含有するスタック構築物として生成された、さらなる免疫調節タンパク質について記載する。

【 0 4 6 8 】

1つまたは複数のカウンター構造体リガンドについて親和性が改変された上記の選択されたバリエーション分子を使用して、2つ以上の親和性改変IgSFドメインを含有する「スタック」分子（すなわち、II型免疫調節タンパク質）を生成した。Gibson assembly kit（New England Biolabs）を使用した標準的なGibsonアセンブリによってFcへのその融合を可能にするフォーマットで該スタックをコードする遺伝子ブロック（Integrated DNA Technologies, Coralville, IA）としてスタック構築物を得た。

30

【 0 4 6 9 】

以下のとおり設計されたタンパク質をコードする全てのスタックのコーディング核酸分子を生成した：シグナルペプチド、続いて関心対象の第一のバリエーションIgV、続いて3つのGGGGS（G4S）モチーフから構成される15アミノ酸リンカー（SEQ ID NO:228）、続いて関心対象の第二のIgV、続いて2つのGGGGSリンカー（SEQ ID NO:229）、続いて3つのアラニン（AAA）、続いて上記のとおりヒトIgG1 Fc。各スタックにおけるIgVドメインの正確なホールディングの可能性を最大限にするため、第一のIgVの前に、通常野生型タンパク質で生じる全ての残基をこのIgVとシグナルペプチド（リーディング配列）との間に置く。同様に、第一のIgVの後に、通常該IgVを野生型タンパク質中で次のIgドメイン（典型的には、IgCドメイン）またはこのような第二のIgVドメインが存在しない場合は該IgVを膜貫通ドメイン（トレーリング配列）に接続する残基のいずれかに接続する全ての残基が続く。両方のIgVドメインが同じ親タンパク質由来であった（例えば、別のCD80 IgVでスタックされたCD80 IgV）場合は両方の間のリンカーが繰り返し存在しなかったこと以外は、同じ設計原理を第二のIgVドメインに適用した。

40

【 0 4 7 0 】

表10は、例示的なスタックされた構築物の設計を示す。表10に示される例示的なスタック分子は、表示のとおりIgVドメインおよびさらに上記のとおりリーディング配列またはトレーリング配列を含有する。表には、以下の成分が次の順序で存在する：シグナルペプチド（SP; SEQ ID NO:225）、IgVドメイン1（IgV1）、トレーリング配列1（TS

50

1)、リンカー1(LR1; SEQ ID NO:228)、IgVドメイン2(IgV2)、トレーリング配列2(TS2)、リンカー2(LR2; SEQ ID NO:230)およびFcドメイン(C5S/R77C/N82G/V87Cアミノ酸置換を含有するSEQ ID NO:226)。いくつかの場合では、リーディング配列1(LS1)は、シグナルペプチドとIgV1の間に存在し、いくつかの場合では、リーディング配列2(LS2)は、リンカーとIgV2の間に存在する。

【0471】

(表10) 例示的なスタックされた構築物の成分のアミノ酸配列(SEQ ID NO)

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン1: NKp30 WT	+	-	214	235	+	-	152	371	+	+
ドメイン2: CD80 WT										
ドメイン1: NKp30 WT	+	-	214	235	+	236	220	237	+	+
ドメイン2: CD86 WT										
ドメイン1: NKp30 L30V/A60V/S64P/ S86G	+	-	215	235	+	-	192	371	+	+
ドメイン2: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S										

10

20

30

40

50

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/ S86G  ドメイン 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S	+	-	215	235	+	-	175	371	+	+
ドメイン 1: CD80 WT  ドメイン 2: Nkp30 WT	+	-	152	371	+	-	214	235	+	+
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S  ドメイン 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/ S86G	+	-	192	371	+	-	215	235	+	+
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S  ドメイン 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/ S86G	+	-	175	371	+	-	215	235	+	+
ドメイン 1: CD80 WT  ドメイン 2: ICOSL WT	+	-	152	371	+	-	196	233	+	+
ドメイン 1: CD80 WT  ドメイン 2: CD86 WT	+	-	152	371	+	236	220	237	+	+
ドメイン 1: CD80 WT  ドメイン 2: CD80 WT	+	-	152	371	+	-	152	371	+	+
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R  ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S	+	-	189	371	+	-	192	371	+	+

10

20

30

40

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S	+	-	193	371	+	-	192	371	+	+
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S	+	-	193	371	+	-	175	371	+	+
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R  ドメイン 2: CD86 Q35H/H90L/Q102 H	+	-	189	371	+	236	221	237	+	+
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: CD86 Q35H/H90L/Q102 H	+	-	193	371	+	236	221	237	+	+
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R  ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S	+	-	189	371	+	-	213	233	+	+
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S	+	-	193	371	+	-	213	233	+	+

10

20

30

40

50

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: ICOSL N52D	+	-	193	371	+	-	199	233	+	+
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R  ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P	+	-	189	371	+	-	201	233	+	+
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P	+	-	193	371	+	-	201	233	+	+
ドメイン 1: ICOSL WT  ドメイン 2: CD80 WT	+	-	196	233	+	-	152	371	+	+
ドメイン 1: CD86 WT  ドメイン 2: CD80 WT	+	236	220	237	+	-	152	371	+	+
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S  ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R	+	-	192	371	+	-	189	371	+	+
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S  ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T	+	-	192	371	+	-	193	371	+	+

10

20

30

40

50

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S  ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R	+	-	175	371	+	-	189	371	+	+
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S  ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T	+	-	175	371	+	-	193	371	+	+
ドメイン 1: CD86 Q35H/H90L/Q102 H  ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R	+	236	221	237	+	-	189	371	+	+
ドメイン 1: CD86 Q35H/H90L/Q102 H  ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T	+	236	221	237	+	-	193	371	+	+
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S  ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R	+	-	213	233	+	-	189	371	+	+
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S  ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T	+	-	213	233	+	-	193	371	+	+

10

20

30

40

50

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: ICOSL N52D	+	-	199	233	+	-	189	371	+	+
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R										
ドメイン 1: ICOSL N52D	+	-	199	233	+	-	193	371	+	+
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T										
ドメイン 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P	+	-	201	233	+	-	189	371	+	+
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R										
ドメイン 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P	+	-	201	233	+	-	193	371	+	+
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T										
ドメイン 1: CD80 V68M/L70P/L72P/ K86E	+	-	195	371	+	-	189	371	+	+
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R										
ドメイン 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/ M38L/M43Q/E81R /V83I/L85I/K89R/ D90L/A91E/F92N/ K93Q/R94G	+	-	194	371	+	-	189	371	+	+
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R										
ドメイン 1: CD80 V68M/L70P/L72P/ K86E	+	-	195	371	+	-	193	371	+	+
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T										

10

20

30

40

50



	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/ M38L/M43Q/E81R /V83I/L85I/K89R/ D90L/A91E/F92N/ K93Q/R94G  ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T	+	-	194	371	+	-	193	371	+	+
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R  ドメイン 2: CD80 V68M/L70P/L72P/ K86E	+	-	189	371	+	-	195	371	+	+
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R  ドメイン 2: CD80 R29V/Y31F/K36G/ M38L/M43Q/E81R /V83I/L85I/K89R/ D90L/A91E/F92N/ K93Q/R94G	+	-	189	371	+	-	194	371	+	+
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: CD80 V68M/L70P/L72P/ K86E	+	-	193	371	+	-	195	371	+	+
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/ F59L/E77K/P109S/ I118T  ドメイン 2: CD80 R29V/Y31F/K36G/ M38L/M43Q/E81R /V83I/ L85I/K89R/D90L/ A91E/F92N/K93Q/ R94G	+	-	193	371	+	-	194	371	+	+

10

20

30

40

50

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S  ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S	+	-	192	371	+	-	213	233	+	+
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S  ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S	+	-	175	371	+	-	213	233	+	+
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S  ドメイン 2: ICOSL N52D	+	-	192	371	+	-	199	233	+	+
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S  ドメイン 2: ICOSL N52D	+	-	175	371	+	-	199	233	+	+
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S  ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P	+	-	192	371	+	-	201	233	+	+
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S  ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P	+	-	175	371	+	-	201	233	+	+

10

20

30

40

50

	SP	第一のドメイン			LR1	第二のドメイン			LR2	Fc
		LS1	IgV1	TS1		LS2	IgV2	TS2		
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S  ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S	+	-	213	233	+	-	192	371	+	+
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/ L96F/L98F/Q100R/ G103E/ F120S  ドメイン 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S	+	-	213	233	+	-	175	371	+	+
ドメイン 1: ICOSL N52D  ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S	+	-	199	233	+	-	192	371	+	+
ドメイン 1: ICOSL N52D  ドメイン 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T 120S	+	-	199	233	+	-	175	371	+	+
ドメイン 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100 P  ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/ Y87N/E88G/K89E/ D90N/A91G/P109S	+	-	201	233	+	-	192	371	+	+

10

20

30

## 【 0 4 7 2 】

少なくとも1つの親和性改変IgVドメインを含有するCD80、CD86、ICOSLまたはNkp 30由来のバリエーションIgVドメインの種々の組み合わせを含有するバリエーションのIgVがスタックされたFc融合分子のハイスループット発現および精製を、実質的に実施例5に記載のとおりに行った。また、バリエーションのIgVがスタックされたFc融合分子のそれぞれのカウンター構造体に対する結合性および抗CD3同時固定アッセイによる機能活性を、実質的に実施例6に記載されるとおりに評価した。例えば、スタックされたIgSF Fc融合タンパク質の共刺激生物活性を上記と同様の固定化抗CD3アッセイで決定した。この場合、4nMの抗CD3 (OKT3, Biolegend, USA) を、組織培養処理96ウェルプレート (Corning, USA) 上で4nM ~ 120nMのヒトrB7-H6.Fc (R&D Systems, USA) またはヒトrPD-L1.Fc (R&D Systems, USA) と一晩同時固定した。翌日、未結合タンパク質をPBSで洗い出し、そして、100,000個の精製したpan T細胞を各ウェルのEx-Vivo 15培地 (Lonza, Switzerland) 100ulに加えた。その後、スタックされたIgSFドメインを100ulの容量中8nM ~ 40nMの濃度で合計200ulの容量で加えた。細胞を3日間培養した後、培養上清を収集し、上に述べたとおりDuoset ELISA kit (R&D Systems, USA) でヒトIFN- レベルを測定した。

40

50

## 【 0 4 7 3 】

結果を表11～14に示す。表11は、NKp30 IgVドメインとCD80またはCD86のIgVドメインとを含有するバリエーションIgVスタックFc融合分子についての結合および機能活性結果を示す。表12は、バリエーションCD80 IgVドメインと、バリエーションCD80、CD86、またはICOSL IgVドメインとを含有するバリエーションIgVスタックFc融合分子についての結合および機能活性の結果を示す。表13は、2つのバリエーションCD80 IgVドメインを含有するバリエーションIgVスタックFc融合分子についての結合および機能活性の結果を示す。表14は、バリエーションCD80 IgVドメインとバリエーションICOSL IgVドメインとを含有するバリエーションIgVスタックFc融合分子についての結果を示す。

## 【 0 4 7 4 】

表11～14の各々について、1列目は、アミノ末端（N末端）ドメインから始まり、続いてC末端ヒトIgG1 Fcドメインの前に中央のWTまたは親和性が改変されたドメインが位置する、スタックされた、親和性が改変されたまたは野生型（WT）ドメインの構造的構成および配向を示す。2列目は、各「スタック」分子中に含有される各IgVドメインの配列の配列番号を示す。3列目は結合パートナーを示しており、当該結合パートナーに対して、1列目に表示されている親和性が改変されたスタックされたドメインが選択された。

## 【 0 4 7 5 】

また、種々のカウンター構造体リガンドを発現するように改変された細胞への各スタック分子の結合についての平均蛍光強度（MFI）値と、同じ細胞が発現するカウンター構造体リガンドへのアミノ酸置換を含有しない未改変IgVドメインを含有する対応するスタック分子の結合と比較したMFIの比率とによって測定された場合の、結合活性が示される。また、バリエーションスタック分子の、T細胞の活性を調節する機能活性が、溶液の表示のバリエーションスタック分子および実施例6に記載されるとおりの抗CD3と同時固定された適切なリガンドで生成された培養上清中のIFN- $\gamma$  の計算レベル（pg/ml）に基づいて示されている。また、表は、同時固定アッセイにおける各バリエーションスタック分子によって生産されたIFN- $\gamma$  の、対応する未改変のスタック分子と比べた比率も示している。

## 【 0 4 7 6 】

示されるとおり、結果は、それぞれの未改変（例えば、野生型）のIgVドメインを含有する対応するスタック分子と比較して、少なくとも1つの同族カウンター構造体リガンドに対して親和性が改変された向上した結合活性を示した少なくとも1つのバリエーションIgSFドメインを含有するスタック分子を生成することが可能であったことを示した。いくつかの場合では、分子中の両方のバリエーションIgSFドメインのうち的一方または組み合わせのいずれかに由来するスタック分子は、複数の同族カウンター構造体リガンドに対する向上した結合性を示した。結果はまた、スタックされた分子中のIgVドメインの順序が、いくつかの場合では、改善された結合活性の程度も変化させうることを示した。いくつかの場合では、標的化同時固定アッセイで評価したときに機能的T細胞活性もまた変化した。

## 【 0 4 7 7 】

（表11）NKp30 IgVドメインとCD80またはCD86 IgVドメインとを含有するスタックされたバリエーションIgV Fc融合タンパク質

10

20

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		抗CD3 同時固定 アッセイ  pg/ml IFN- γ  (WT 親の IFN- γ に対する比率)
			B7H6 MFI  (WT 親の MFIに対する 比率)	CD28 MFI  (WT 親の MFIに対する 比率)	
ドメイン 1: NKp30 WT	214	-	88823 (1.00)	7022 (1.00)	68 (1.00)
ドメイン 2: CD80 WT	152				
ドメイン 1: NKp30 WT	214	-	14052 (1.00)	1690 (1.00)	92 (1.00)
ドメイン 2: CD86 WT	220				
ドメイン 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6			
ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	53279 (0.60)	9027 (1.29)	94 (1.38)
ドメイン 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6			
ドメイン 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	41370 (0.47)	11240 (1.60)	60 (0.88)
ドメイン 1: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)/	215	B7-H6			
ドメイン 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	68480 (4.87)	9115 (5.39)	110 (1.19)

10

20

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		抗CD3 同時固定 アッセイ  pg/ml IFN- γ  (WT 親の IFN- γ に対する比率)
			B7H6 MFI  (WT 親の MFIに対する 比率)	CD28 MFI  (WT 親の MFIに対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 WT	152	-	110461 (1.00)	13654 (1.00)	288 (1.00)
ドメイン 2: Nkp30 WT	214				
ドメイン 1: CD86 WT	220		128899 (1.00)	26467 (1.00)	213 (1.00)
ドメイン 2: Nkp30 WT	214	B7-H6			
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	55727 (0.50)	4342 (0.32)	100 (0.35)
ドメイン 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6			
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	40412 (0.37)	7094 (0.52)	84 (0.29)
ドメイン 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6			
ドメイン 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	220836 (1.71)	11590 (0.44)	113 (0.53)
ドメイン 2: NKp30 (L30V A60V S64P S86G)	215	B7-H6			

10

20

## 【 0 4 7 8 】

(表 1 2) CD80 IgVドメインとCD80またはCD86 IgVドメインとを含有するスタックされたバリエーションIgV Fc融合タンパク質

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性			抗CD3 同時固定 アッセイ  pg/ml IFN- γ  (WT 親の IFN-γ に対する 比率)
			CD28 MFI  (WT 親の MFIに対する 比率)	PD-L1 MFI  (WT 親の MFIに対する 比率)	ICOS MFI  (WT 親の MFIに対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 WT	152		1230 (1.00)	2657 (1.00)	11122 (1.00)	69 (1.00)
ドメイン 2: ICOSL WT	196					
ドメイン 1: CD80 WT	152		60278 (1.00)	2085 (1.00)		59 (1.00)
ドメイン 2: CD86 WT	220					
ドメイン 1: CD80 WT	152		1634 (1.00)	6297 (1.00)		98 (1.00)
ドメイン 2: CD80 WT	152					

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性			抗CD3 同時固定 アッセイ  pg/ml IFN- γ  (WT 親の IFN-γ に対する 比率)
			CD28 MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	PD-L1 MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	ICOS MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1				
ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	4308 (2.64)	4234 (0.67)		214 (2.18)
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1				
ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	7613 (4.66)	2030 (0.32)		137 (1.40)
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1				
ドメイン 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	3851 (2.36)	3657 (0.58)		81 (0.83)
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1				
ドメイン 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	4117 (0.07)	2914 (1.40)		96 (1.63)
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1				
ドメイン 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28	2868 (0.05)	3611 (1.73)		94 (1.60)
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1				
ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOS/CD28	3383 (2.75)	4515 (1.70)	5158 (0.46)	90 (1.30)

10

20

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性			抗CD3 同時固定 アッセイ  pg/ml IFN- γ  (WT 親の IFN-γ に対する 比率)
			CD28 MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	PD-L1 MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	ICOS MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1				
ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOS/CD28	2230 (1.81)	2148 (0.81)	3860 (0.35)	112 (1.62)
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1 ICOS/CD28				
ドメイン 2: ICOSL N52D	199		5665 (4.61)	6446 (2.43)	15730 (1.41)	126 (1.83)
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1				
ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28	6260 (5.09)	4543 (1.71)	11995 (1.08)	269 (3.90)
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1				
ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28	3359 (2.73)	3874 (1.46)	8541 (0.77)	97 (1.41)
ドメイン 1: ICOSL WT	196		3000 (1.00)	2966 (1.00)	14366 (1.00)	101 (1.00)
ドメイン 2: CD80 WT	152					
ドメイン 1: CD86 WT	220		4946 (1.00)	1517 (1.00)		125 (1.00)
ドメイン 2: CD80 WT	152					
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	2832 (1.73)	3672 (0.58)		114 (1.16)
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1				

10

20

30

40

50



ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性			抗CD3 同時固定 アッセイ  pg/ml IFN- γ  (WT 親の IFN-γ に対する 比率)
			CD28 MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	PD-L1 MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	ICOS MFI  (WT 親の MFIに 対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28				
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	4542 (2.78)	2878 (0.45)		142 (1.45)
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28				
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	938 (0.57)	995 (0.16)		102 (1.04)
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28				
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	4153 (2.54)	2827 (0.45)		108 (1.10)
ドメイン 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28				
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	14608 (2.95)	2535 (1.67)		257 (2.06)
ドメイン 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H	221	CD28				
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	2088 (0.42)	2110 (1.39)		101 (0.81)
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOS/CD28				
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	3634 (1.21)	4893 (1.65)	6403 (0.45)	123 (1.22)

10

20

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性			抗CD3 同時固定 アッセイ  pg/ml IFN- γ  (WT 親の IFN-γ に対する 比率)
			CD28 MFI  (WT 親の MFI に対する 比率)	PD-L1 MFI  (WT 親の MFI に対する 比率)	ICOS MFI  (WT 親の MFI に対する 比率)	
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOS/CD28				
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	1095 (0.37)	5929 (2.0)	7923 (0.55)	127 (1.26)
ドメイン 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28				
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	2023 (0.67)	5093 (1.72)	16987 (1.18)	125 (1.24)
ドメイン 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28				
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	3441 (1.15)	3414 (1.15)	20889 (1.45)	165 (1.63)
ドメイン 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28				
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	7835 (2.61)	6634 (2.24)	20779 (1.45)	95 (0.94)
ドメイン 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28				
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	8472 (2.82)	3789 (1.28)	13974 (0.97)	106 (1.05)

## 【 0 4 7 9 】

(表 1 3) 2つのCD80 IgVドメインを含有するスタックされたバリエーションIgV Fc融合タンパク質

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		機能活性 MLR IFN-γ pg/ml
			PD-L1 MFI  (WT 親の MFI に対する 比率)	CTLA-4 MFI  (WT 親の MFI に対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 WT	152		6297 (1.00)	4698 (1.00)	35166 (1.00)
ドメイン 2: CD80 WT	152				

10

20

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		機能活性 MLR IFN- $\gamma$ pg/ml
			PD-L1 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	CTLA-4 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195	CTLA-4			
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	2464 (0.39)	4955 (1.05)	5705 (0.16)
ドメイン 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/M 43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/ D90L/A91E/F92N/K93Q/R9 4G	194	CTLA-4			
ドメイン 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1	1928 (0.31)	1992 (0.42)	1560 (0.04)
ドメイン 1: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195	CTLA-4			
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	1215 (0.19)	1382 (0.29)	2171 (0.06)
ドメイン 1: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/M 43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/ D90L/A91E/F92N/K93Q/R9 4G	194	CTLA-4			
ドメイン 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	1592 (0.25)	1962 (0.42)	1512 (0.04)
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1			
ドメイン 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195	CTLA-4	1747 (0.28)	2057 (0.44)	9739 (0.28)
ドメイン 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F9 2Y/K93R	189	PD-L1			
ドメイン 2: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/M 43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/ D90L/A91E/F92N/K93Q/R9 4G	194	CTLA-4	1752 (0.28)	1772 (0.38)	5412 (0.15)

10

20

30

40

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		機能活性 MLR IFN- $\gamma$ pg/ml
			PD-L1 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	CTLA-4 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1	1636 (0.26)	1887 (0.40)	7608 (0.22)
ドメイン 2: CD80 V68M/L70P/L72P/K86E	195	CTLA-4			
ドメイン 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E7 7K/P109S/I118T	193	PD-L1			
ドメイン 2: CD80 R29V/Y31F/K36G/M38L/M 43Q/E81R/V83I/ L85I/K89R/D90L/A91E/F92 N/K93Q/R94G	194	CTLA-4	2037 (0.32)	4822 (1.03)	11158 (0.32)

10

## 【 0 4 8 0 】

( 表 14 ) CD80 IgVドメインとICOSL IgVドメインとを含有するスタックされたバリアントIgV Fc融合タンパク質

20

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		機能活性 MLR IFN- $\gamma$ pg/ml
			PD-L1 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	CTLA-4 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	
ドメイン 1: CD80 WT	152		1230 (1.00)	11122 (1.00)	1756 (1.00)
ドメイン 2: ICOSL WT	196				
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28			
ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOS/CD28	2280 (1.85)	3181 (0.29)	2281 (1.30)
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28			
ドメイン 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOS/CD28	2309 (1.88)	26982 (2.43)	1561 (0.89)
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	4285 (3.48)	22744 (2.04)	1612 (0.92)

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		機能活性 MLR IFN- $\gamma$ pg/ml
			PD-L1 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	CTLA-4 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	
ドメイン 2: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28			
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	3024 (2.46)	16916 (1.52)	3857 (2.20)
ドメイン 2: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28			
ドメイン 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	6503 (5.29)	7240 (0.65)	6886 (3.92)
ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28			
ドメイン 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28	3110 (2.53)	4848 (0.44)	3393 (1.93)
ドメイン 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28			
ドメイン 1: ICOSL WT	196		3000 (1.00)	14366 (1.00)	4113 (1.00)
ドメイン 2: CD80 WT	152				
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOSL/CD2 8	10426 (3.48)	51286 (3.57)	18680 (4.54)
ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28			
ドメイン 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L9 8F/Q100R/G103E/ F120S	213	ICOS/CD28	17751 (5.92)	29790 (2.07)	10637 (2.59)
ドメイン 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	175	CD28			
ドメイン 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28			
ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	2788 (0.93)	25870 (1.80)	6205 (1.51)
ドメイン 1: ICOSL N52D	199	ICOS/CD28	2522 (0.84)	13569 (0.94)	5447 (1.32)
ドメイン 2: CD80	175	CD28			

10

20

30

40

50

ドメイン構造 N末端からC末端： ドメイン1/ドメイン2/Fc	SEQ ID NO (IgV)	カウンター 構造 選択対象	結合活性		機能活性 MLR IFN- $\gamma$ pg/ml
			PD-L1 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	CTLA-4 MFI (WT 親の MFIに対する 比率)	
I67T/L70Q/A91G/T120S					
ドメイン 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	201	ICOS/CD28			
ドメイン 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E8 8G/K89E/D90N/A91G/P109 S	192	CD28	9701 (3.23)	9187 (0.64)	5690 (1.38)

10

## 【 0 4 8 1 】

実施例10：膜貫通型免疫調節タンパク質を発現する改変細胞の生成および評価

上記のバリエーションCD80、またはICOSL親和性改変IgSFドメインのいずれかを含有する細胞外ドメイン（ECD）を含有する膜貫通型免疫調節タンパク質（TIP）がキメラ抗原受容体（CAR）と共発現された、改変されたT細胞を生成した。当該TIPは、対応する野生型CD80またはICOSL膜貫通型タンパク質配列の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインも含有していた。改変細胞の免疫調節活性を、CARだけを発現している細胞または対応する野生型CD80もしくはICOSL膜貫通型タンパク質をCARと共発現している細胞と比較した。

20

## 【 0 4 8 2 】

例示的なCD80-TIPは、SEQ ID NO：28に示されるCD80細胞外ドメインならびにSEQ ID NO：1の243～288番目の残基に対応する膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの位置に関してI67T/L70Q/A91G/T120Sに対応するIgVおよびIgCドメインにアミノ酸変異を含有する親和性改変IgSFドメインを有するバリエーションCD80であった。例示的なCD80-TIPのアミノ酸配列は、SEQ ID NO：241に示され、かつ、SEQ ID NO：242に示されるヌクレオチドの配列によってコードされている。対応する野生型CD80膜貫通型タンパク質は、SEQ ID NO：1の35～288番目のアミノ酸残基として示されるアミノ酸配列を有しており、かつ、SEQ ID NO：251に示されるアミノ酸配列によってコードされている。

30

## 【 0 4 8 3 】

例示的なICOSL-TIPは、SEQ ID NO：32に示されるICOSL細胞外ドメインならびにSEQ ID NO：5の257～302番目の残基に対応する膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインにおける位置に関してN52H/I143Tに対応するIgVドメインにおけるアミノ酸変異を含有する親和性改変IgSFドメインを有するバリエーションICOSLであった。例示的なICOSL-TIPのアミノ酸配列は、SEQ ID NO：243に示され、かつ、SEQ ID NO：244に示されるヌクレオチドの配列によってコードされている。対応する野生型ICOSL膜貫通型タンパク質は、SEQ ID NO：5の19～302番目のアミノ酸残基として示されるアミノ酸配列を有しており、かつ、SEQ ID NO：252に示されるアミノ酸配列によってコードされている。

40

## 【 0 4 8 4 】

親和性改変ドメインを含有するTIPまたは対応する親和性が改変されていないIgSFドメインを含有する野生型膜貫通型タンパク質を、T細胞においてCD3 細胞内シグナル伝達ドメインを含有する第1世代キメラ抗原受容体（CAR）と共発現させた。第1世代CARは、CD19に特異的なscFv（SEQ ID NO：245）、CD8に由来するヒンジおよび膜貫通ドメイン（SEQ ID NO：246）ならびにCD3 に由来する細胞内シグナル伝達ドメイン（SEQ ID NO：247に示される）を含んだ。CD19 scFv-CD3 CARをコードするヌクレオチド配列は、SEQ ID NO：248に示され、CD19 scFv-CD3 CARのアミノ酸配列は、SEQ ID NO：479に示される。

## 【 0 4 8 5 】

CARをコードする核酸分子のみ、または自己切断性T2A配列によってCARから分離され

50

た例示的なTIPもしくは野生型膜貫通型タンパク質の1つ（SEQ ID NO：249に示されるヌクレオチドの配列によってコードされているSEQ ID NO：250）コードする核酸分子を生成した。例示的な構築物は、表15に示される核酸配列を含有した。対照として、CD28共刺激ドメインを追加で含有する第2世代CARをコードする核酸構築物も生成した（CD19 scFv-CD28-CD3 $\zeta$ ）。

【0486】

（表15）核酸構築物

	CAR (SEQ ID NO)	T2Aリンカー (SEQ ID NO)	TIP (SEQ ID NO)
CD19 scFv – CD3 $\zeta$	+ (248)	-	-
CD19 scFv – CD3 $\zeta$ – T2A – B7-1	+ (248)	+ (249)	野生型CD80 (251)
CD19 scFv – CD3 $\zeta$ – T2A – B7-1_TIP	+ (248)	+ (249)	CD80 TIP (242)
CD19 scFv – CD3 $\zeta$ – T2A – ICOSL	+ (248)	+ (249)	野生型 ICOSL (252)
CD19 scFv – CD3 $\zeta$ – T2A – ICOSL_TIP	+ (248)	+ (249)	ICOSL TIP (244)

【0487】

核酸分子をレンチウイルスベクターに個別にクローニングし、これを使用して3人の異なる健康なドナーから得られたヒトPBMC試料から単離されたT細胞を形質導入した。ベクターおよびレンチウイルスパッケージング構築物でのHEK293細胞の同時トランスフェクション後に、核酸配列を含有するレンチウイルス粒子を生産した。レンチウイルス粒子を超遠心分離によって培養培地から収集し、qRT-PCRによって滴定した。ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を、3人の正常な血液ドナーから密度沈降法を使用して単離した。PBMCを抗CD3および抗CD28抗体ならびにIL-2と一晩培養し、次いで、レンチウイルス調製物を感染多重度5：1で形質導入した。対照の第2世代CARをコードするレンチウイルスベクターを、1人のドナー由来の細胞を形質導入するためだけに使用した。

【0488】

培養の2週間（14日）後、細胞を、96ウェルマイクロエレクトロニクスプレート（E-プレート）の培養培地中のインピーダンス変化を測定し、かつリアルタイムプロットで細胞の数および形態学の変化を示すAcea Real-Time Cell Analyzer（RTCA）を使用して、標的抗原を発現する細胞との共培養後の細胞傷害性について分析した。CD19発現HeLa標的細胞（HeLa-CD19）を96ウェルE-プレートに播種し、RTCAシステムを使用して各単層のインピーダンスを24時間モニタリングした。改変されたT細胞をウェルにエフェクター：標的比10：1で加え、ウェルをさらに48時間モニタリングした。その結果を、測定された電気インピーダンスの変化から生じる細胞指数（Cell Index）（CI）値として表示および記録し、次いで、全ての時点の全てのウェルのCI読み取り値を同じ時間（基準時間）の個々のウェルのCI値で割って比率変換し、基準時間での値の割合を表すノーマライズされた細胞指数値を得た（Zhang et al. “Introduction to the Data Analysis of the Roche xCELLigence（登録商標）System with RTCA Package.” Bioconductor. May, 3, 2016, [bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/RTCA/inst/doc/aboutRTCA.pdf](http://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/RTCA/inst/doc/aboutRTCA.pdf). Accessed September 9, 2016を参照のこと）。このアッセイでは、単層のインピーダンスの減少は、形質導入細胞による標的細胞の殺傷を反映する。

【0489】

結果は、形質導入されていないT細胞と比較して第1世代CARを発現する細胞で減少したインピーダンスが得られたが、第1世代CARを発現する細胞についての減少したインピーダンスの程度は、第2世代CARを発現する細胞よりも小さかったことを示した。第1世代C

ARを発現する細胞における減少したインピーダンスは、概して、アッセイの最初の8時間まで続いたが、一方で、第2世代CARを発現する細胞のみその後もインピーダンスの減少が続いた。

【0490】

図8に示されるとおり、1人のドナーでは、TIPまたは対応する野生型膜貫通型タンパク質を第1世代CARと共発現する細胞の各々は、インピーダンスのより大きな減少を示し、このことは、第1世代CARのみを発現する細胞と比較して大きい細胞傷害活性を示した。さらに、結果は、親和性が改変されていないIgSFドメインを含有する対応する野生型CD80またはICOSL膜貫通型タンパク質を共発現しているCAR発現細胞と比較して、CD80-TIPまたはICOSL-TIPを共発現しているCAR発現細胞において細胞傷害活性がより大きかったことを示した。これらのTIP改変細胞の観察された結果は、CD80-TIPまたはICOSL-TIPをCARと共発現する細胞における細胞傷害活性が、抗原特異的T細胞、例えばCAR発現T細胞の細胞傷害性免疫応答を調節する活性の増強を発揮したこと示した。

10

【0491】

その他の2人のドナーでは、CD80-TIPを発現する細胞は、対応する野生型CD80膜貫通型タンパク質を発現する細胞と比較してより大きなインピーダンスの減少をもたらさなかった。1人のドナーでは、野生型膜貫通型タンパク質構築物を細胞に形質導入するのに十分ではなかったが、このドナーでは、ICOS-L TIPは、試験したその他の構築物と比較して最良の細胞傷害性を与えた。他のドナーでは、ICOS-L-TIPを発現する細胞は、対応する野生型ICOS-L膜貫通型タンパク質を発現する細胞と比較してより大きなインピーダンスの減少をもたらさなかった。試験した細胞において、CD80-TIP、ICOSL-TIPまたは対応する野生型膜貫通型タンパク質のいずれかをCARと共発現する全ての細胞は、第1世代CARのみを発現する細胞よりも大きな細胞傷害活性を示した。ドナーの中で観察された結果の違いは、ドナーの中のT細胞の違い、細胞の表面の種々の改変されたタンパク質の発現レベルの違い、細胞における殺傷の評価（例えば、14日目の形質導入細胞の評価、単一のエフェクター：標的細胞比の評価）のためのこの例示的アッセイにおいて使用された特定の条件、または他の要因に関連し得る。

20

【0492】

実施例11

CD80 IgSFドメインバリエーションの結合性および活性の評価

30

追加のECD CD80バリエーションを同定し、これを使用して、実施例5に記載のとおりEC D-Fc融合タンパク質を生産した。結合研究を実施して、実施例6に記載のとおり同族結合パートナーに対するCD80ドメインバリエーション免疫調節タンパク質の特異性および親和性を実質的に評価した。細胞が発現したカウンター構造体への追加のCD80 IgSFドメインバリエーションの結合および抗CD3同時固定アッセイからの生物活性の例示的な結果を表16に示す。

【0493】

表16に示す例示的なアミノ酸置換は、SEQ ID NO:28に示されるそれぞれの参照未改変CD80 ECD配列に対応するアミノ酸位置番号によって指定される。アミノ酸位置が中央に示され、対応する未改変（例えば、野生型）アミノ酸が番号の前に記載され、同定されたバリエーションアミノ酸置換が番号の後に記載される。2列目は、各バリエーションECD-Fc融合分子のバリエーションECDの配列番号を示す。また、同族カウンター構造体リガンドを発現するように改変された細胞への各バリエーションFc融合分子の結合についての平均蛍光強度（MFI: Mean Fluorescence Intensity）値によって測定した結合活性、および同じ細胞が発現するカウンター構造体リガンドへのアミノ酸置換を含有しない対応する未改変ECD-Fc融合分子の結合についてのMFIと比べた比によって測定した結合活性も示している。また、バリエーションFc融合分子の、T細胞の活性を調節する機能活性が、抗CD3と同時に固定された表示のバリエーションECD-Fc融合分子を用いて生成された細胞上清中のIFN- $\gamma$ の計算レベル（pg/ml）、および対応する未改変（親）ECD-Fcと比較したIFN- $\gamma$ の比に基づいて示されている。結果は、少なくとも1つの同族カウンター構造体リガンドに対する親和性が改変さ

40

50



れたCD80 IgSFドメインバリエーションの、結合親和性の変化（向上を含む）、および/または免疫学的活性の改善を示す。

【 0 4 9 4 】

（表 1 6）CTLA-4またはPD-L1に対して選択されたCD80バリエーション。分子配列、結合データ、および共刺激生物活性データ

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	CD28 t <sub>fxn</sub> MFI (親に対する比率)	CTLA-4 t <sub>fxn</sub> MFI (親に対する比率)	PD-L1 t <sub>fxn</sub> MFI (親に対する比率)	抗CD3 IFN- $\gamma$ 同時固定アッセイ pg/ml (親に対する比率)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, K169E	446	3536 (0.08)	5731 (0.01)	173405 (0.08)	109 (0.24)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A,	447	4962 (0.11)	2027 (0.01)	626341 (0.11)	162 (0.36)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, K169E	448	3489 (0.08)	2521 (0.01)	215826 (0.08)	206 (0.46)

10

20

30

40

50

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	CD28 tfxn MFI (親に対する 比率)	CTLA-4 tfxn MFI (親に対する 比率)	PD-L1 tfxn MFI (親に対する 比率)	抗CD3 IFN- γ 同時固定 アッセイ pg/ml (親に対する比率)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, T130A, K169E, M174T	449	2736 (0.06)	2493 (0.01)	157897 (0.06)	141 (0.31)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, N48D, F59L, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, H188D	450	2393 (0.05)	2663 (0.01)	137062 (0.05)	230 (0.51)
H18R, R29D, Y31L, Q33H, K36G, K37E, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, T130A, K169E, H188D	451	3023 (0.07)	2303 (0.01)	158977 (0.07)	305 (0.68)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, E143G, K169E, M174V, H188D	452	2135 (0.05)	2816 (0.01)	374117 (0.05)	291 (0.65)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, K169E	446	2157 (0.05)	2819 (0.01)	114963 (0.05)	197 (0.44)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A	447	2126 (0.05)	2377 (0.01)	530029 (0.05)	135 (0.30)
R29D, I30V, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, H188D	453	1914 (0.04)	2024 (0.01)	179536 (0.04)	127 (0.28)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, K169E	455	2377 (0.05)	2177 (0.01)	438352 (0.05)	203 (0.45)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A	456	2106 (0.05)	2122 (0.01)	14201 (0.05)	226 (0.50)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, K169E, H188D	457	1887 (0.04)	2201 (0.01)	110092 (0.04)	231 (0.51)
R29D, I30V, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, H188D	453	2060 (0.05)	2385 (0.01)	94786 (0.05)	237 (0.53)

10

20

30

40

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	CD28 tfxn MFI (親に対する 比率)	CTLA-4 tfxn MFI (親に対する 比率)	PD-L1 tfxn MFI (親に対する 比率)	抗CD3 IFN- γ 同時固定 アッセイ pg/ml (親に対する比率)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, F108L, I118V, T120S, T130A, K169E, H188D	458	2009 (0.04)	2623 (0.01)	110589 (0.04)	165 (0.37)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, T130A, H188D	293	1925 (0.04)	2979 (0.01)	379558 (0.04)	213 (0.47)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, T130A, N149D, K169E, H188D	459	2245 (0.05)	2842 (0.01)	631549 (0.05)	118 (0.26)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, T130A, K169E, H188D	460	2759 (0.06)	2247 (0.01)	760438 (0.06)	157 (0.35)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, C128Y, T130A, H188D	461	1585 (0.03)	2736 (0.01)	456003 (0.03)	278 (0.62)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94F, T130A, K169E	297	2633 (0.06)	3379 (0.01)	133095 (0.06)	190 (0.42)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, E99D, T130A	462	1732 (0.04)	2082 (0.01)	117465 (0.04)	174 (0.39)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, T130A, K169E	463	2011 (0.04)	2502 (0.01)	711479 (0.04)	232 (0.51)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93I, R94L, L97R, T130A	300	2026 (0.04)	2443 (0.01)	572017 (0.04)	202 (0.45)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93I, R94L, L97R, T130A, L148S	301	1296 (0.03)	2119 (0.01)	777509 (0.03)	101 (0.22)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, K169E	302	1188 (0.03)	2161 (0.01)	190176 (0.03)	97 (0.22)

10

20

30

40

50

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	CD28 tfxn MFI (親に対する 比率)	CTLA-4 tfxn MFI (親に対する 比率)	PD-L1 tfxn MFI (親に対する 比率)	抗CD3 IFN- γ 同時固定 アッセイ pg/ml (親に対する比率)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, I61N, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94F, V104A, I118V, T120S, I126V, T130A	464	1203 (0.03)	1863 (0.01)	217243 (0.03)	288 (0.64)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94F, I118V, T120S, T130A	465	1289 (0.03)	2625 (0.01)	124188 (0.03)	111 (0.25)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, T62S, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, T130A, K169E, T175A	466	1228 (0.03)	1973 (0.01)	145285 (0.03)	114 (0.25)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, F116S, T130A, H188D	306	1244 (0.03)	2091 (0.01)	109646 (0.03)	114 (0.25)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, L142S, H188D	467	1221 (0.03)	2251 (0.01)	89654 (0.03)	143 (0.32)
C16S, H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, T110A, I118V, H188D	468	1212 (0.03)	1800 (0.01)	4497 (0.03)	247 (0.55)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, A91G, I118V, T120S, I127T, T130A, H188D	469	2620 (0.06)	2241 (0.01)	66183 (0.06)	125 (0.28)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, L70Q, D76G, A91G, S103L, I118V, T120S, I127T, T130A	470	1907 (0.04)	1726 (0.01)	3508 (0.04)	224 (0.50)
Y53C, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, K169E	471	1396 (0.03)	1459 (0.01)	2552 (0.03)	75 (0.17)
T62S, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, T130A, K169E	472	2947 (0.06)	2377 (0.01)	179622 (0.06)	107 (0.24)
L70Q, A91G, I118V, T120S, T130A, K169E	417	12262 (0.27)	90597 (0.01)	4168 (0.27)	115 (0.25)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, S129L, H188D	313	1696 (0.04)	9960 (0.01)	4067 (0.04)	87 (0.19)
Y53C/L70Q/D90G/T130A/N149D/N15 2T/H188D	473	1990 (0.04)	3106 (0.01)	3289 (0.04)	122 (0.27)
WT CD80	28	45607	883950	93079	451 (1.00)

10

20

30

40

50

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	CD28 tfxn MFI (親に対する 比率)	CTLA-4 tfxn MFI (親に対する 比率)	PD-L1 tfxn MFI (親に対する 比率)	抗CD3 IFN- γ 同時固定 アッセイ pg/ml (親に対する比率)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118V, T120S, I127T, T130A, H188D	474	16232 (0.26)	140241 (0.88)	182403 (2.61)	108 (0.96)
K89E, T130A	73	46923 (0.75)	225651 (1.41)	196544 (2.82)	317 (2.81)
K89E, K93E, T130A	316	39137 (0.63)	181037 (1.13)	206713 (2.96)	571 (5.06)
K89E, T130A	73	61349 (0.99)	156244 (0.98)	126961 (1.82)	2539 (22.53)
WT CD80	28	62220 (1.00)	160148 (1.00)	69786 (1.00)	113 (1.00)
S21P, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, N48I, V68A, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, P109H, I126L, K169I	317	4467 (0.20)	4434 (0.02)	146638 (5.87)	137 (0.65)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, P74L, Y80N, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, L97R	318	4523 (0.21)	4565 (0.02)	4731 (0.19)	18 (0.09)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, S21P, P74L, Y80N, D90N, T130A, N149S, E162G	319	4675 (0.21)	4686 (0.02)	4098 (0.16)	54 (0.26)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, H18L, V68M, T130A	320	4413 (0.20)	4618 (0.02)	221788 (8.88)	51 (0.24)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, V68M, T130A, N149S, R190S	321	4354 (0.20)	4413 (0.02)	201513 (8.06)	80 (0.38)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, H18L, P74L, Y80N, T130A, R190S	322	4381 (0.20)	4491 (0.02)	5075 (0.20)	8 (0.04)
C16G, V22A, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, V68M, D76G, I118T, T130A, S140T, N149S, K169I, H178R, N192D	323	4459 (0.20)	4582 (0.02)	4383 (0.18)	45 (0.21)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94F, E117V, I118T, N149S, S168G, H188Q	324	4371 (0.20)	4613 (0.02)	247135 (9.89)	61 (0.29)

10

20

30

40

50

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	CD28 tfxn MFI (親に対する 比率)	CTLA-4 tfxn MFI (親に対する 比率)	PD-L1 tfxn MFI (親に対する 比率)	抗CD3 IFN- γ 同時固定 アッセイ pg/ml (親に対する比率)
V22A, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, V68M, T130A	325	4222 (0.19)	4381 (0.022)	235307 (9.42)	96 (0.46)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94F, N64S, I118T, T130A, N149S, K169I	326	4216 (0.19)	4305 (0.022)	149085 (5.97)	30 (0.14)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, V22A, V68M, D115G, I118T, T130A, G133D, N149S	327	4361 (0.20)	4459 (0.022)	95558 (3.82)	88 (0.42)
S129P	328	4458 (0.20)	5914 (0.03)	6669 (0.27)	0 (0.0)
A91G, S129P	329	5144 (0.23)	26635 (0.12)	13569 (0.54)	0 (0.0)
I69T, L70Q, A91G, T120S	330	74296 (3.37)	203363 (0.89)	6242 (0.25)	509 (2.42)
S129P	328	5086 (0.23)	8957 (0.04)	6603 (0.26)	125 (0.60)
Y31H, S129P	331	4553 (0.21)	4874 (0.02)	5788 (0.23)	76 (0.36)
WT CD80	28	22053 (1.00)	227691 (1.00)	24989 (1.00)	211 (1.00)
T28A, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, V104L, T130A, N149S	332	2636 (0.17)	2169 (0.03)	99658 (9.45)	116 (0.62)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, L97R, N149S, H188Q	333	2680 (0.17)	2165 (0.03)	107747 (10.22)	125 (0.68)
H18L, R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, L97R, T130A, N149S	475	2482 (0.16)	2179 (0.03)	100116 (9.50)	96 (0.52)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, H18L, V68A, T130A, N149S, T154I	335	2455 (0.15)	2084 (0.03)	11855 (1.12)	132 (0.71)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, A12G, V68A, L97R, T130A, L183H	336	2804 (0.18)	2310 (0.03)	216297 (20.51)	191 (1.03)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118T, T130A, S140T, N149S, K169S	337	2460 (0.15)	2188 (0.03)	109263 (10.36)	150 (0.81)

10

20

30

40

CD80 変異	SEQ ID NO (ECD)	CD28 tfxn MFI (親に対する 比率)	CTLA-4 tfxn MFI (親に対する 比率)	PD-L1 tfxn MFI (親に対する 比率)	抗CD3 IFN- γ 同時固定 アッセイ pg/ml (親に対する比率)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118T, T130A, N149S, K169I, Q193L	338	2569 (0.16)	2198 (0.03)	100074 (9.49)	130 (0.70)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, V22A, I118T, T130A, N149S	339	2500 (0.16)	2188 (0.03)	147900 (14.03)	124 (0.67)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118T, T130A, N149S	340	2615 (0.16)	2210 (0.03)	118150 (11.21)	89 (0.48)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94L, I118T, T130A, N149S, K169I	341	2444 (0.15)	2246 (0.03)	115420 (10.95)	101 (0.55)
R29D, Y31L, Q33H, K36G, M38I, T41A, M43R, M47T, E81V, L85R, K89N, A91T, F92P, K93V, R94F, T130A, N149S, K169I	342	2378 (0.15)	2123 (0.03)	112712 (10.69)	114 (0.61)
I118T, C128R	343	3093 (0.19)	3180 (0.03)	2620 (0.25)	122 (0.66)
Q27R, R29C, M42T, S129P, E160G	344	2827 (0.18)	2623 (0.03)	2326 (0.22)	139 (0.75)
S129P, T154A	345	3062 (0.19)	2622 (0.03)	2606 (0.25)	156 (0.84)
WT CD80	28	15948 (1.00)	75099 (1.00)	10544 (1.00)	185 (1.00)

## 【 0 4 9 5 】

本発明は、例えば本発明の種々の局面を例示するために提供される、特定の開示された態様に範囲が限定されることを意図していない。記載の組成物および方法に対する種々の改変は、本明細書の説明および教示から明らかとなるであろう。そのような変更は、本開示の真の範囲および精神から逸脱することなく実践されてよく、これが本開示の範囲内にあることが意図される。

10

20

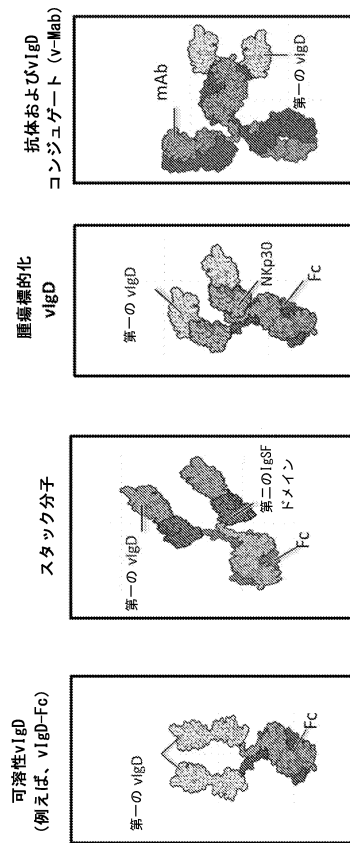
30

40

50

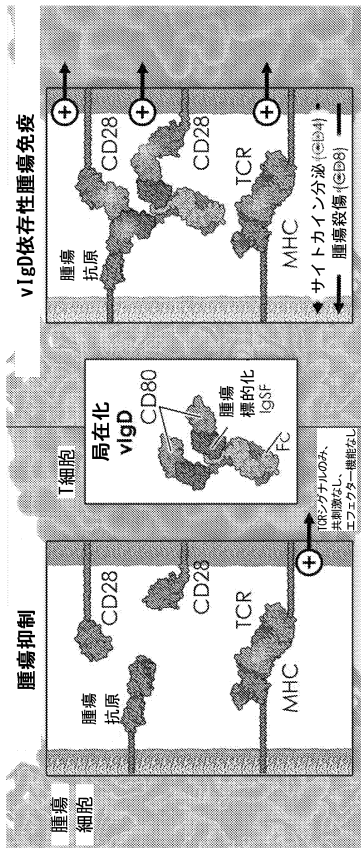
【 図面 】

【 図 1 A 】

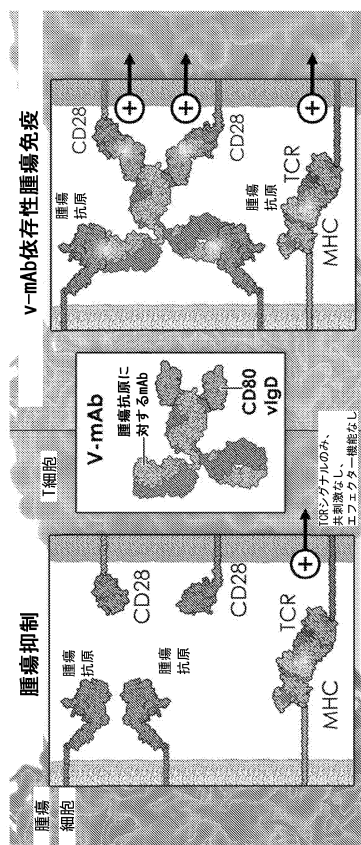




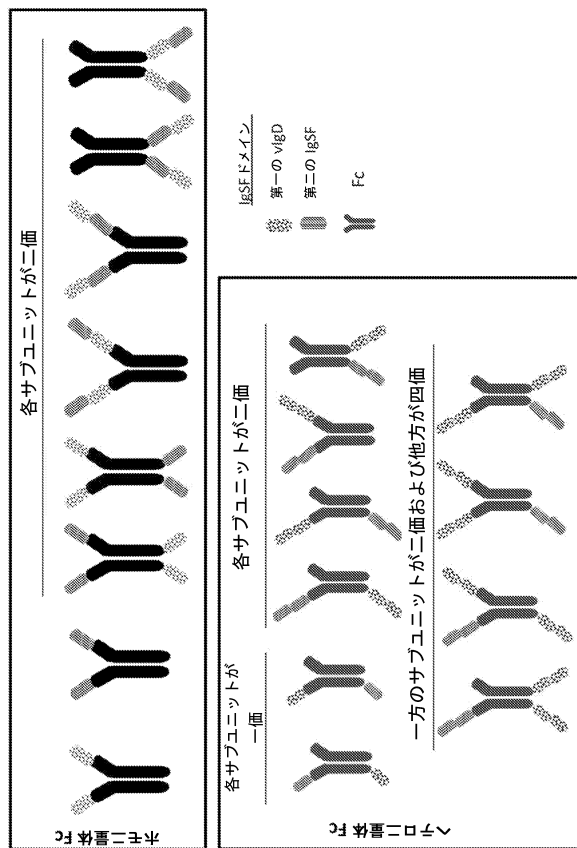
【図 3】



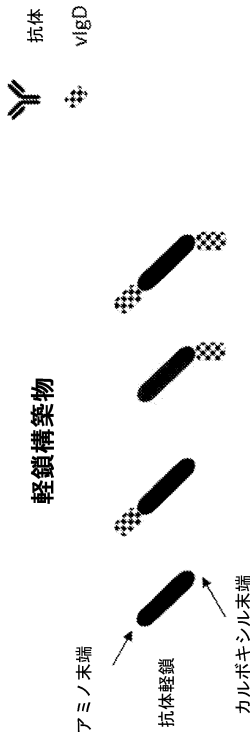
【図 5】



【図 4】



【図 6 A】



10

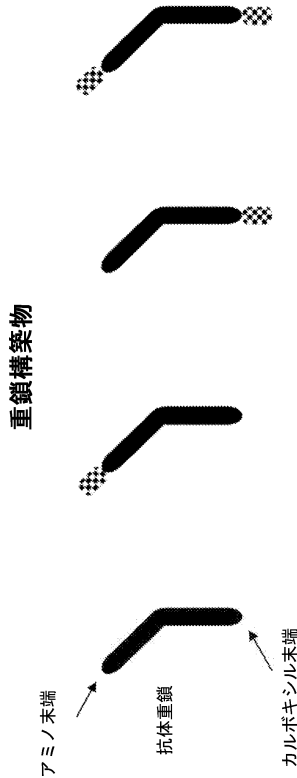
20

30

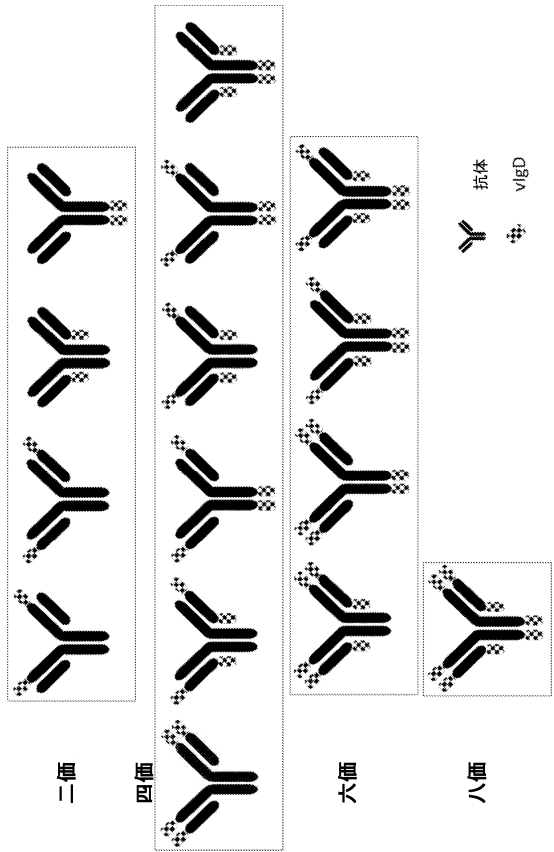
40

50

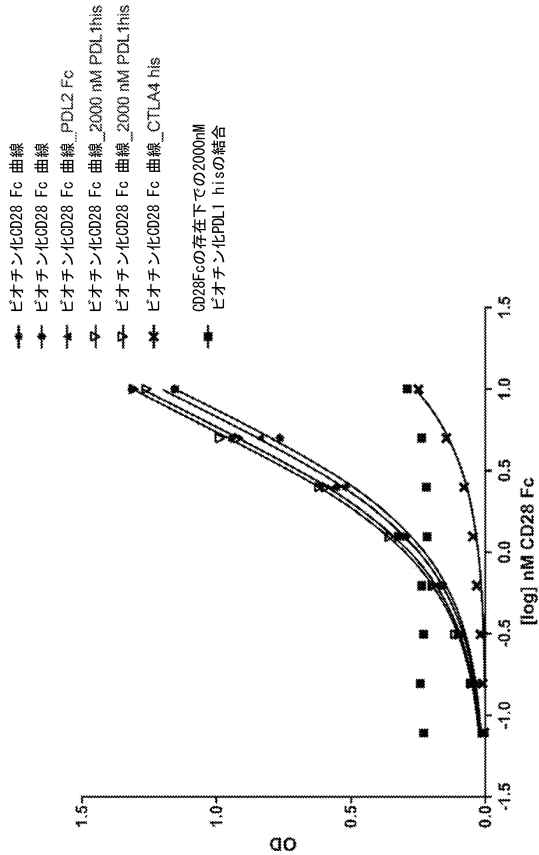
【図 6 B】



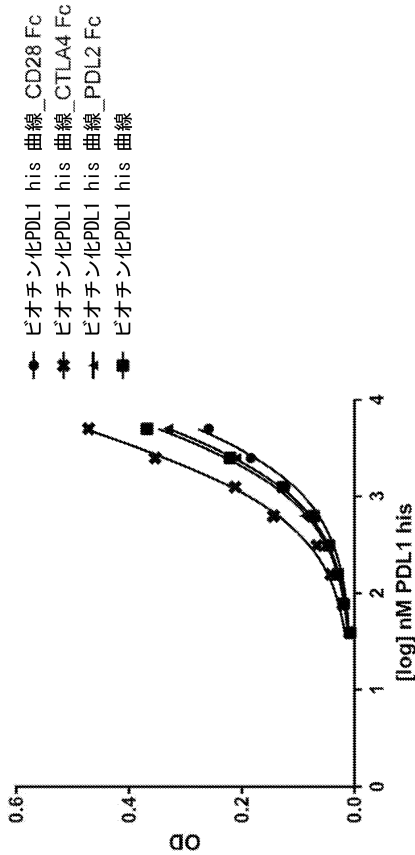
【図 6 C】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

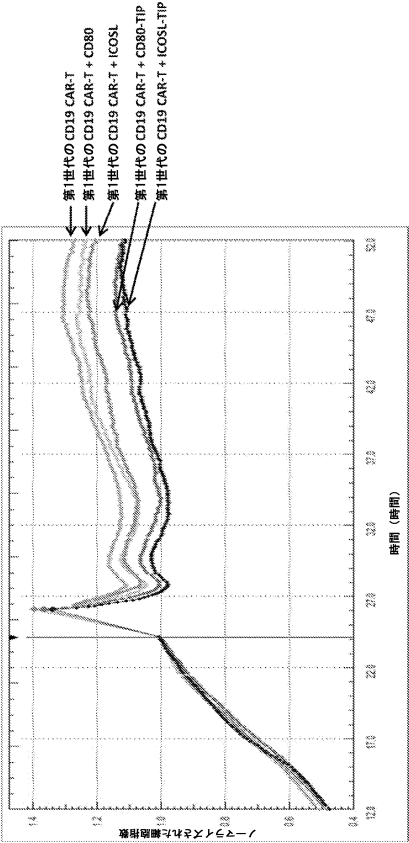
20

30

40

50

【 図 8 】



【 配列表 】

0007527758000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
		C 1 2 N	15/63	Z

(31)優先権主張番号 62/323,595

(32)優先日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/410,844

(32)優先日 平成28年10月20日(2016.10.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/472,570

(32)優先日 平成29年3月16日(2017.3.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/475,201

(32)優先日 平成29年3月22日(2017.3.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スワンソン ライアン

アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2 0 1  
スイート 2 3 0

(72)発明者 コルナッカー マイケル

アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウェスト 2 0 1  
スイート 2 3 0

## 合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 中根 知大

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 4 / 0 2 9 1 9 7 ( W O , A 2 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00 - 15/90