

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-532430

(P2022-532430A)

(43)公表日 令和4年7月14日(2022.7.14)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 7 6
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A 4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全173頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-568608(P2021-568608)	(71)出願人	519302132
(86)(22)出願日	令和2年5月15日(2020.5.15)		シャタック ラボ, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和3年12月8日(2021.12.8)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス
(86)国際出願番号	PCT/US2020/033169		オースティン、ウェスト 5 ストリート
(87)国際公開番号	WO2020/232365		5 0 0、スイート 1 2 0 0
(87)国際公開日	令和2年11月19日(2020.11.19)	(74)代理人	110001519
(31)優先権主張番号	62/848,915		特許業務法人太陽国際特許事務所
(32)優先日	令和1年5月16日(2019.5.16)	(72)発明者	シュライバー、テイラー
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 3 テキサス
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	シュプトライン、ケイシー
			アメリカ合衆国 7 8 7 0 3 テキサス
			オースティン、ウェスト 1 1 ストリート 最終頁に続く

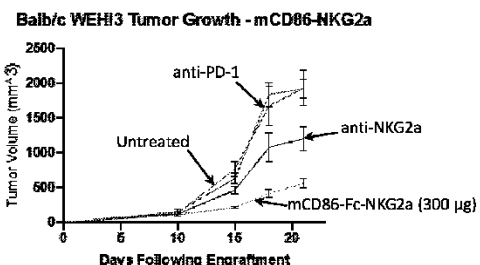
(54)【発明の名称】 N K細胞指向性キメラタンパク質

(57)【要約】

本発明は、特に、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、または膜アンカー細胞外タンパク質の一部、及びI型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部を含む、キメラタンパク質を含む、組成物及び方法に関し、I型膜貫通タンパク質は、がん及びウイルス感染などの疾患の治療において使用が見出される、ナチュラルキラー(NK)細胞の表面上で天然に発現される。

FIG. 96A

NKG2a In Vivo Study – WEHI3 in BALB/c
mCD86-fc-NKG2a



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の一般的な構造のキメラタンパク質であって、
N末端－（a）－（b）－（c）－C末端
式中、

（a）が、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部または膜アンカー細胞外タンパク質の一部を含む、第1のドメインであり、

（b）が、前記第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであり、

（c）が、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部を含む、第2のドメインであって、前記II型膜貫通タンパク質が、ナチュラルキラー（NK）細胞の表面上で天然に発現される、前記第2のドメインである、前記キメラタンパク質。

10

【請求項 2】

前記II型膜貫通タンパク質が、NKG2受容体ファミリーのメンバーである、請求項1に記載のキメラタンパク質。

【請求項 3】

前記NKG2受容体ファミリーの前記メンバーが、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2D、NKG2E、NKG2F、及びNKG2Hから選択される、請求項2に記載のキメラタンパク質。

【請求項 4】

前記NKG2受容体ファミリーの前記メンバーが、NKG2Aである、請求項3に記載のキメラタンパク質。

20

【請求項 5】

前記第2のドメインが、NKG2Aリガンドと結合することが可能である、請求項4に記載のキメラタンパク質。

【請求項 6】

前記NKG2Aリガンドが、HLA-EまたはQa1である、請求項5に記載のキメラタンパク質。

【請求項 7】

前記第2のドメインが、NKG2Aの細胞外ドメインを実質的にすべて含む、請求項4～6のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

30

【請求項 8】

前記NKG2Aリガンドと結合することが、NK細胞への免疫阻害シグナルの伝達を遮断する、請求項5～7のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 9】

前記I型膜貫通タンパク質が、CD80、CD86、CD58、PD-1、SLAMF6、SIRPα及びTGFB2から選択される、請求項1～8のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 10】

前記第1のドメインが、前記I型膜貫通タンパク質のリガンド／受容体と結合することが可能である、請求項9に記載のキメラタンパク質。

40

【請求項 11】

前記I型膜貫通タンパク質が、CD80である、請求項9または請求項10に記載のキメラタンパク質。

【請求項 12】

前記リガンド／受容体が、CTLA-4またはCD28である、請求項11に記載のキメラタンパク質。

【請求項 13】

前記I型膜貫通タンパク質が、CD86である、請求項9または請求項10に記載のキメラタンパク質。

【請求項 14】

50

前記リガンド／受容体が、C T L A－4またはC D 2 8である、請求項 1 3 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 1 5】

前記 I 型膜貫通タンパク質が、C D 5 8 である、請求項 9 または請求項 1 0 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 1 6】

前記リガンド／受容体が、C D 2 である、請求項 1 5 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 1 7】

前記 I 型膜貫通タンパク質が、P D－1 である、請求項 9 または請求項 1 0 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 1 8】

前記リガンド／受容体が、P D－L 1 または P D－L 2 である、請求項 1 7 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 1 9】

前記 I 型膜貫通タンパク質が、S L A M F 6 である、請求項 9 または請求項 1 0 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 0】

前記リガンド／受容体が、S A P または E A T 2 である、請求項 1 9 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 1】

前記 I 型膜貫通タンパク質が、S I R P α である、請求項 9 または請求項 1 0 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 2】

前記リガンドが、C D 4 7 である、請求項 2 1 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 3】

前記 I 型膜貫通タンパク質が、T G F B R 2 である、請求項 9 または請求項 1 0 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 4】

前記リガンドが、T G F β 3 または T G F β 1 である、請求項 2 3 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 5】

前記第 1 のドメインが、前記 I 型膜貫通タンパク質の前記細胞外ドメインを実質的にすべて含む、請求項 9 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 6】

前記膜アンカー細胞外タンパク質が、C D 4 8 である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 7】

前記リガンド／受容体が、2 B 4 または C D 2 である、請求項 2 6 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 8】

前記第 1 のドメインが、成熟 C D 4 8 ポリペプチドを実質的にすべて含む、請求項 2 6 または請求項 2 7 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 9】

前記第 1 のドメインをそのリガンド／受容体に結合することにより、免疫抑制シグナルを阻害する、請求項 1 0 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 3 0】

前記第 1 のドメインをそのリガンド／受容体に結合することにより、免疫抑制シグナルを活性化させる、請求項 1 0 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 3 1】

前記キメラタンパク質が、細胞間の安定性シナプスを形成することが可能である、請求項

10

20

30

40

50

1～30のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項32】

前記細胞が、NK細胞及び腫瘍細胞、またはNK細胞及びウイルス感染細胞である、請求項31に記載のキメラタンパク質。

【請求項33】

前記細胞間の安定性シナプスが、腫瘍の縮小または前記NK細胞によるウイルス感染細胞の死滅に有利な空間的配向を提供する、請求項31に記載のキメラタンパク質。

【請求項34】

前記空間的配向が、腫瘍細胞及びウイルス感染細胞から選択される標的細胞を攻撃するようにNK細胞を配置し、及び／または前記標的細胞が、本発明の前記キメラタンパク質によって遮蔽されたものを超える負のシグナルを含む負のシグナルを送達するのを立体的に防ぐ、請求項33に記載のキメラタンパク質。

10

【請求項35】

前記第1のドメイン及び前記第2のドメインのいずれかまたは両方の、そのリガンド／受容体への結合が、受容体とそのリガンドとの長い相互作用を提供する、遅いオフ速度（K_{off}）で生じる、請求項1～34のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項36】

前記長い相互作用が、持続的な負のシグナル遮蔽効果、免疫抑制シグナルの持続的な阻害、及び／または免疫抑制シグナルの持続的な活性化を提供する、請求項35に記載のキメラタンパク質。

20

【請求項37】

前記長い相互作用が、NK細胞増殖を提供し、及び／または抗腫瘍攻撃もしくはウイルス感染細胞の攻撃を可能にする、請求項35または請求項36に記載のキメラタンパク質。

【請求項38】

前記長い相互作用が、刺激シグナルの放出を提供するのに十分なシグナル伝達を可能とする、請求項35～37のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項39】

前記刺激シグナルが、サイトカインである、請求項38に記載のキメラタンパク質。

【請求項40】

前記キメラタンパク質が、持続的な免疫調節効果を提供することが可能である、請求項1～39のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

30

【請求項41】

前記リンカーが、柔軟なアミノ酸配列、IgGヒンジ領域、及び抗体配列から選択されるポリペプチドである、請求項1～40のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項42】

前記リンカーが、ジスルフィド結合を形成することが可能である少なくとも1つのシステイン残基を含み、及び／またはヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む、請求項1～41のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項43】

前記ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインが、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する、請求項42に記載のキメラタンパク質。

40

【請求項44】

前記IgGが、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、前記IgAが、IgA1及びIgA2から選択される、請求項43に記載のキメラタンパク質。

【請求項45】

前記IgGが、IgG4である、請求項44に記載のキメラタンパク質。

【請求項46】

前記IgG4が、ヒトIgG4である、請求項45に記載のキメラタンパク質。

【請求項47】

前記リンカーが、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも

50

も 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 43～46 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 48】

キメラタンパク質であって、

- (a) CD80 リガンド／受容体と結合することが可能である CD80 の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジ－CH₂－CH₃Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

10

【請求項 49】

配列番号 61 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 48 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 50】

キメラタンパク質であって、

- (a) CD86 リガンド／受容体と結合することが可能である CD86 の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジ－CH₂－CH₃Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

20

【請求項 51】

配列番号 65 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 52】

キメラタンパク質であって、

- (a) CD48 リガンド／受容体と結合することが可能である CD48 の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジ－CH₂－CH₃Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

30

【請求項 53】

配列番号 83 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 52 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 54】

キメラタンパク質であって、

- (a) CD58 リガンド／受容体と結合することが可能である CD58 の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジ－CH₂－CH₃Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

40

【請求項 55】

配列番号 68 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 54 に記載のキメラタンパク質。

50

【請求項 56】

キメラタンパク質であって、

- (a) PD-1 リガンドと結合することが可能である PD-1 の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジー CH2-CH3Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

【請求項 57】

配列番号 71 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 56 に記載のキメラタンパク質。

10

【請求項 58】

キメラタンパク質であって、

- (a) SLAMF6 リガンド／受容体と結合することが可能である SLAMF6 の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジー CH2-CH3Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

20

【請求項 59】

配列番号 75 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 58 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 60】

キメラタンパク質であって、

- (a) SIRP α リガンドと結合することが可能である SIRP α の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジー CH2-CH3Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

30

【請求項 61】

配列番号 86 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 60 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 62】

キメラタンパク質であって、

- (a) TGFBR2 リガンドと結合することが可能である TGFBR2 の一部を含む、第 1 のドメインと、
- (b) NKG2A リガンドと結合することが可能である NKG2A の一部を含む、第 2 のドメインと、
- (c) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを連結し、ヒンジー CH2-CH3Fc ドメインを含む、リンカーと、を含む、前記キメラタンパク質。

40

【請求項 63】

配列番号 79 と少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 62 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 64】

前記ヒンジー CH2-CH3Fc ドメインが、IgG、IgA、IgD、または IgE

50

に由来する、請求項 48～61 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 65】

前記 IgG が、IgG1、IgG2、IgG3、及び IgG4 から選択され、前記 IgA が、IgA1 及び IgA2 から選択される、請求項 64 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 66】

前記 IgG が、IgG4 である、請求項 65 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 67】

前記 IgG4 が、ヒト IgG4 である、請求項 66 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 68】

前記リンカーが、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 48～67 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

10

【請求項 69】

前記キメラタンパク質が、組換え融合タンパク質である、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 70】

がんまたはウイルス感染の治療における薬剤として使用するための、請求項 1～69 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質。

【請求項 71】

薬剤の製造における、請求項 1～69 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質の使用。

20

【請求項 72】

請求項 1～69 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質をコードする核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 73】

請求項 72 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 74】

治療有効量の請求項 1～69 のいずれか 1 項に記載のキメラタンパク質を含む、薬学的組成物。

【請求項 75】

がんを治療するか、またはウイルス感染を治療する方法であって、その治療を必要とする対象に、有効量の請求項 74 に記載の薬学的組成物を投与することを含む、前記方法。

30

【請求項 76】

細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (CTLA-4) と結合することが可能である抗体を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記薬学的組成物及び前記抗体が、同時に提供される、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記薬学的組成物が、前記抗体が提供された後に提供される、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 79】

前記薬学的組成物が、前記抗体が提供される前に提供される、請求項 76 に記載の方法。

40

【請求項 80】

前記抗体が、YERVOY (イピリムマブ)、9D9、トレメリムマブ (例えば、チシリムマブ及び CP-675, 206、MedImmune)、AGEN1884、及び RG2077 からなる群から選択される、請求項 76～79 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 81】

PD-1 と結合するか、または PD-1 リガンドと結合することが可能である抗体を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 82】

前記薬学的組成物及び前記抗体が、同時に提供される、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

50

前記薬学的組成物が、前記抗体が提供された後に提供される、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記薬学的組成物が、前記抗体が提供される前に提供される、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記抗体が、ニボルマブ (ONO 4538、BMS 936558、MDX1106、OPDIVO (Bristol Myers Squibb))、ペンブロリズマブ (KEYTRUDA/MK 3475、Merck)、ピディリズマブ (CT 011、Cure Tech)、RMP1-14、AGEN2034 (Agenus)、及びセミプリマブ (REGN-2810) からなる群から選択される、請求項 8 1～8 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8 6】

抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を媒介することが可能である抗体を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記薬学的組成物及び前記抗体が、同時に提供される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記薬学的組成物が、前記抗体が提供された後に提供される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記薬学的組成物が、前記抗体が提供される前に提供される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記抗体が、セツキシマブ (Eli Lilly and Co)、ダラツムマブ (Genmab)、ガチボツズマブ (Glycotope)、マルゲツキシマブ (Raven biotechnologies)、モガムリズマブ (Kyowa Kirin International PLC)、MED1-551 または イネビリズマブ (MedImmune)、MOR208 または タファシタマブ (MorphoSys AG)、オカラツズマブ (Creative BioLabs)、GAZYVA (登録商標) または オビヌツズマブ (Roche)、RO5083945 または GA201 (Creative BioLabs)、リツキシマブ (Genentech)、トラスツズマブ (Roche)、TrasGEX (Glycotope)、トムゾツキシマブ (Glycotope)、及びユブリツキシマブ (TG Therapeutics) からなる群から選択される、請求項 8 6～8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9 1】

前記がんが、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、AIDS 関連リンパ腫、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、消化器系癌、頭頸部癌、腹膜癌、呼吸器系癌、泌尿器系癌、癌種、子宮頸部癌、絨毛癌、慢性リンパ芽球性白血病 (CLL)、慢性骨髄芽球性白血病、結腸及び直腸癌、結合組織癌、浮腫 (例えば、脳腫瘍に関連する)、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、胃癌 (胃腸癌を含む)、神経膠芽細胞腫、有毛細胞白血病、肝癌、ヘパトーム、上皮内新生物、腎臓もしくは腎臓癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌 (例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌)、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫 (NHL) を含むリンパ腫、ならびに B 細胞リンパ腫 (低グレード／濾胞 NHL、高グレード免疫芽細胞 NHL、高グレードリンパ芽球性 NHL、高グレード小型非切れ込み核細胞性 NHL、中間グレードびまん性 NHL、中間グレード／濾胞性 NHL、巨大病変 NHL、及び小リンパ球性 (SL) NHL)、マントル細胞リンパ腫、メーグス症候群、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌 (唇、舌、口、及び咽頭)、卵巣癌、膵臓癌、移植後リンパ増殖性障害 (PTLD)、ならびに母斑症に関連する異常な血管増殖、前立腺癌、直腸癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宮もしくは子宮内膜癌、外陰癌、ならびにフルデンシュトレーム型マクログロブリン血症からなる群から選択される、請求項 7 5～9 0 のいずれか 1 項に記載の方法または請求項 6 8 に記載のキメラタンパク質。

30

40

【請求項 9 2】

50

前記ウイルス感染が、急性または慢性ウイルス感染、例えば、呼吸器、乳頭腫ウイルス感染、単純ヘルペスウイルス（HSV）感染、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、及び肝炎ウイルス感染などの内臓のウイルス感染からなる群から選択される、請求項75～90のいずれか1項に記載の方法または請求項64に記載のキメラタンパク質。

【請求項93】

前記ウイルス感染が、フラビウイルス科のメンバー、例えば、黄熱病ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、及びC型肝炎ウイルス；ピコルナウイルス科のメンバー、例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス；オルトミキソウイルス科のメンバー、例えば、インフルエンザウイルス；レトロウイルス科のメンバー、例えば、レンチウイルス；パラミクソウイルス科のメンバー、例えば、呼吸器合胞体ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ルブラウイルス（例えば、ムンプスウイルス）、麻疹ウイルス、及びヒトメタニューモウイルス；ブニヤウイルス科のメンバー、例えば、ハンタウイルス；またはレオウイルス科のメンバー、例えば、ロタウイルスによって引き起こされる、請求項92に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、がん及びウイルス感染のための免疫療法など、疾患の治療において使用が見出されるキメラタンパク質を含む、組成物及び方法に関する。

20

【0002】

優先権

本出願は、2019年5月16日に出願された米国出願第62／848,915号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の利益及び優先権を主張する。

【0003】

電子的に提出されたテキストファイルの記載

本出願は、配列表を含む。それは、「SHK-016PC__SequenceListing__ST25」と題されたASCIIテキストファイルとしてEFS-Webを経由して電子的に送信されている。配列表は、サイズが128,123バイトであり、2020年5月15日に作製された。配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【背景技術】

【0004】

免疫系は、疾患の原因となり得る異物に対する体の応答及びがん細胞に対する体の応答の中核である。しかしながら、多くのがん及びウイルス感染細胞は、例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞に免疫抑制シグナルを伝達することにより、免疫系を回避するメカニズムを発展させてきた。NK細胞は、事前の活性化なしに特定の腫瘍細胞及びウイルス感染細胞の溶解を媒介することができるリンパ球である。がん細胞またはウイルス感染細胞に由来する免疫阻害シグナルを遮断する、及び／またはNK細胞による阻害シグナルの受容を防止する治療薬に対するニーズは、依然として満たされていない。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、様々な態様において、本発明は、がん及び抗ウイルス免疫療法に有用な組成物及び方法を提供する。例えば、本発明は、部分的に、がん細胞またはウイルス感染細胞に由来する免疫阻害シグナルを同時に遮断し、NK細胞による阻害シグナルの受容を防止する特異的キメラタンパク質に関する。したがって、本組成物及び方法は、がん及び抗ウイルス免疫療法の分野における様々な欠陥を克服する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、部分的には、キメラタンパク質が、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの

50

一部または膜アンカー細胞外タンパク質の一部と、ⅠⅠ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインであって、当該ⅠⅠ型膜貫通タンパク質がナチュラルキラー（NK）細胞の表面上で天然に発現される、ⅠⅠ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインと、を含むように操作され得るという発見に基づいている。これらのキメラタンパク質は、免疫抑制シグナルの伝達及び／または受容を阻害することができる。いくつかの例では、キメラタンパク質のⅠ型膜貫通タンパク質末端は、例えば、その検出及び／または破壊を回避しようと試みるがん細胞またはウイルス感染細胞に由来する免疫阻害シグナルの伝達を妨害、遮断、減少、阻害、及び／または隔離する。他の例では、Ⅰ型膜貫通タンパク質は、別の免疫細胞の活性を増加させる免疫刺激シグナルを提供し得る。キメラタンパク質のⅠⅠ型膜貫通タンパク質末端は、阻害シグナルを妨害、遮断、減少、阻害、及び／または隔離し、それによってNK細胞によるそれらの受容を防止する。これらの2つの作用を合わせると、抗がん攻撃またはNK細胞によるウイルス感染細胞の攻撃を可能にする。

10

【0007】

本発明の態様は、以下の一般的な構造のキメラタンパク質であって、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端、式中、（a）が、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部または膜アンカー細胞外タンパク質の一部を含む、第1のドメインであり、（b）が、第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであり、（c）が、ⅠⅠ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部を含む、第2のドメインであって、当該ⅠⅠ型膜貫通タンパク質が、ナチュラルキラー（NK）細胞の表面上で天然に発現される、第2のドメインである、キメラタンパク質である。

20

【0008】

本発明の別の態様は、以下の一般的な構造のキメラタンパク質であって、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端、式中、（c）が、NK G2Aリガンドと結合可能であるNK G2Aの一部を含む、キメラタンパク質である。

【0009】

一態様において、本発明は、以下の一般的な構造のキメラタンパク質であって、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端、式中、（a）が、Ⅰ型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部または膜アンカー細胞外タンパク質の一部を含む、第1のドメインであり、（b）が、第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであり、（c）が、NK G2Aリガンドと結合することが可能であるNK G2Aの一部を含む、第2のドメインである、キメラタンパク質を提供する。

30

【0010】

本発明の別の態様は、（a）CD80リガンド／受容体と結合することが可能であるCD80の一部を含む、第1のドメインと、（b）NK G2Aリガンドと結合することが可能であるNK G2Aの一部を含む、第2のドメインと、（c）第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ－CH2－CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。

【0011】

本発明のさらに別の態様は、（a）CD86リガンド／受容体と結合することが可能であるCD86の一部を含む、第1のドメインと、（b）NK G2Aリガンドと結合することが可能であるNK G2Aの一部を含む、第2のドメインと、（c）第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ－CH2－CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。

40

【0012】

一態様において、本発明は、（a）CD48リガンド／受容体と結合することが可能であるCD48の一部を含む、第1のドメインと、（b）NK G2Aリガンドと結合することが可能であるNK G2Aの一部を含む、第2のドメインと、（c）第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ－CH2－CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質を提供する。

【0013】

50

別の態様において、本発明は、(a) CD58リガンド／受容体と結合することが可能であるCD58の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質を提供する。

【0014】

さらに別の態様において、本発明は、(a) PD-1リガンドと結合することが可能であるPD-1の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質を提供する。

10

【0015】

本発明の一態様は、(a) SLAMF6リガンド／受容体と結合することが可能であるSLAMF6の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。

【0016】

本発明の一態様は、(a) SIRPαリガンド／受容体と結合することが可能であるSIRPαの一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質を提供する。

20

【0017】

本発明の別の態様は、(a) TGFBR2リガンドと結合することが可能であるTGFBR2の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。

【0018】

本発明の一態様は、がんまたはウイルス感染の治療における薬剤としての本明細書に開示されるキメラタンパク質の使用である。

30

【0019】

本発明の別の態様は、薬剤の製造における、本明細書に開示されるキメラタンパク質の使用である。

【0020】

本発明のさらに別の態様は、本明細書に開示されるキメラタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターである。

【0021】

一態様では、本発明は、本明細書に開示されるキメラタンパク質をコードする核酸を含む、発現ベクターを含む、宿主細胞を提供する。

40

【0022】

別の態様において、本発明は、治療有効量の本明細書に開示されるキメラタンパク質を含む、薬学的組成物を提供する。

【0023】

さらに別の態様において、本発明は、がんを治療するか、またはウイルス感染を治療する方法であって、その治療を必要とする対象に、治療有効量の本明細書に開示されるキメラタンパク質を含む、有効量の薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0024】

本明細書に開示される任意の態様または実施形態は、本明細書に開示される任意の他の態

50

様または実施形態と組み合わせることができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】Aは、I型膜貫通タンパク質（左のタンパク質）及びII型膜貫通タンパク質（右のタンパク質）の概略図を示す。Bは、2つの膜アンカー細胞外タンパク質を示し、曲線はアンカードメインを表し、左のタンパク質は細胞膜にアンカーされたカルボキシ末端を有し、右のタンパク質は細胞膜にアンカーされたアミノ末端を有する。C及びDは、本発明のキメラタンパク質の図を示し、ここで、リンカーは、2つの細胞外結合ドメインを接続する。

【図2】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスCD86-Fc-NKG2A（mCD86-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、すべてのブロットのレーン2に負荷した。レーン3中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。レーン4中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。各レーン1は、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗NKG2A抗体（左ブロット）、抗Fc抗体（中央ブロット）、または抗CD86抗体（右ブロット）を使用してプローブした。

【図3A】mCD86-Fc-NKG2AのFcドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図3B】mCD86-Fc-NKG2AのNKG2Aドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図3C】mCD86-Fc-NKG2AのCD86ドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図4】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスCD80-Fc-NKG2A（mCD80-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、すべてのブロットのレーン2に負荷した。レーン3中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。レーン4中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。各レーン1は、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の2つのECDドメインは、抗NKG2A抗体（左ブロット）または抗CD80抗体（右ブロット）を使用してプローブした。

【図5A】mCD80-Fc-NKG2AのFcドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図5B】mCD80-Fc-NKG2AのNKG2Aドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図5C】mCD80-Fc-NKG2AのCD80ドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD80ドメインをCD28に結合させた。

【図5D】mCD80-Fc-NKG2AのCD80ドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD80ドメインをCTLA-4に結合させた。

【図6】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスCD48-Fc-NKG2A（mCD48-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウ

エスタンプロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、すべてのロットのレーン2に負荷した。レーン3中の試料を、還元剤、 β -メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。レーン4中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。各レーン1は、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗NKG2A抗体（左プロット）、抗Fc抗体（中央プロット）、または抗CD48抗体（右プロット）を使用してプローブした。

【図7A】mCD48-Fc-NKG2AのFcドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

10

【図7B】mCD48-Fc-NKG2AのNKG2Aドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図7C】mCD48-Fc-NKG2AのCD48ドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD48ドメインをCD2に結合させた。

【図7D】mCD48-Fc-NKG2AのCD48ドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD48ドメインを2B4に結合させた。

【図8】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：ヒトPD-1-Fc-hNKG2A（hPD-1-Fc-hNKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンプロットである。ウエスタンプロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、すべてのロットのレーン2に負荷した。レーン3中の試料を、還元剤、 β -メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。レーン4中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。各レーン1は、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の2つのECDドメインは、抗NKG2A抗体（左プロット）または抗PD-1抗体（右プロット）を使用してプローブした。

20

【図9A】hPD-1-Fc-hNKG2AのFcドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

30

【図9B】hPD-1-Fc-hNKG2AのPD-1ドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図9C】hPD-1-Fc-hNKG2AのhNKG2Aドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図9D】hPD-1-Fc-hNKG2AのhNKG2Aドメインの結合パートナーとの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。

【図10A】本発明の例示的なキメラタンパク質のための天然の非変性（非SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）の画像を示す。Aのゲル画像中のタンパク質はクマシーブリリアントブルーでは染色されなかったが、Bのゲル画像中のタンパク質はクマシー染色された。

40

【図10B】本発明の例示的なキメラタンパク質のための天然の非変性（非SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）の画像を示す。Aのゲル画像中のタンパク質はクマシーブリリアントブルーでは染色されなかったが、Bのゲル画像中のタンパク質はクマシー染色された。

【図11A】本発明によるがん治療の方法に起因する、腫瘍体積サイズのインビボでの減少を示す。

【図11B】本発明によるがん治療の方法に起因する、腫瘍体積サイズのインビボでの減少を示す。

【図11C】本発明によるがん治療の方法に起因する、腫瘍体積サイズのインビボでの減

50

少を示す。

【図 1 1 D】本発明によるがん治療の方法に起因する、腫瘍体積サイズのインビボでの減少を示す。

【図 1 1 E】本発明によるがん治療の方法に起因する、腫瘍体積サイズのインビボでの減少を示す。

【図 1 2】A は、本発明の例示的なキメラタンパク質：ヒト CD 8 6 - F c - h N K G 2 A (h C D 8 6 - F c - N K G 2 A) の構造を示すカートゥーン図である。B は、h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットの NR としてマークしたレーンに負荷した。R としてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。D G としてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。L としてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗 CD 8 6 抗体（左プロット）、抗 F c 抗体（中央プロット）、または抗 N K G 2 A 抗体（右プロット）を使用してプローブした。

10

【図 1 3】A は、本発明の例示的なキメラタンパク質：ヒト CD 4 8 - F c - h N K G 2 A (h C D 4 8 - F c - N K G 2 A) の構造を示すカートゥーン図である。B は、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットの NR としてマークしたレーンに負荷した。R としてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。D G としてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。L としてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗 CD 4 8 抗体（左プロット）、抗 F c 抗体（中央プロット）、または抗 N K G 2 A 抗体（右プロット）を使用してプローブした。

20

【図 1 4】A は、本発明の例示的なキメラタンパク質：ヒト CD 5 8 - F c - h N K G 2 A (h C D 5 8 - F c - N K G 2 A) の構造を示すカートゥーン図である。B は、h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットの NR としてマークしたレーンに負荷した。R としてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。D G としてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。L としてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗 h C D 5 8 抗体（左プロット）、抗 F c 抗体（中央プロット）、または抗 N K G 2 A 抗体（右プロット）を使用してプローブした。

30

40

【図 1 5】A は、本発明の例示的なキメラタンパク質：ヒト CD 8 0 - F c - h N K G 2 A (h C D 8 0 - F c - N K G 2 A) の構造を示すカートゥーン図である。B は、h C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。h C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットの NR としてマークしたレーンに負荷した。R としてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。D G としてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。L としてマークしたレーンは、タンパク質サイズ

50

ラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗CD80抗体（左プロット）、抗Fc抗体（中央プロット）、または抗NKG2A抗体（右プロット）を使用してプローブした。

【図16】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：ヒトSLAMF6-Fc-hNKG2A（hSLAMF6-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、hSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。hSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットのNRとしてマークしたレーンに負荷した。Rとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。DGとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。Lとしてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗hSLAMF6抗体（左プロット）、抗Fc抗体（中央プロット）、または抗NKG2A抗体（右プロット）を使用してプローブした。

10

【図17】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスCD80-Fc-hNKG2A（mCD80-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットのNRとしてマークしたレーンに負荷した。Rとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。DGとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。Lとしてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗mCD80抗体（左プロット）、抗Fc抗体（中央プロット）、または抗NKG2A抗体（右プロット）を使用してプローブした。

20

【図18】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスCD86-Fc-hNKG2A（mCD86-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットのNRとしてマークしたレーンに負荷した。Rとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。DGとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。Lとしてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗mCD86抗体（左プロット）、抗Fc抗体（中央プロット）、または抗NKG2A抗体（右プロット）を使用してプローブした。

30

【図19】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスPD-1-Fc-hNKG2A（mPD-1-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各プロットのNRとしてマークしたレーンに負荷した。Rとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。DGとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。Lとしてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗mPD-1抗体（左プロット）、抗Fc抗体（中央プロット）、または抗NKG2A抗体（右プロット）を使用してプローブした。

40

50

）を使用してプローブした。

【図20】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスmSIRPα-Fc-hNKG2A（mSIRPα-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各ブロットのNRとしてマークしたレーンに負荷した。Rとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。DGとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。Lとしてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗mSIRPα抗体（左ブロット）、抗Fc抗体（中央ブロット）、または抗NKG2A抗体（右ブロット）を使用してプローブした。

10

【図21】Aは、本発明の例示的なキメラタンパク質：マウスTGFB R2-Fc-hNKG2A（mTGFB R2-Fc-NKG2A）の構造を示すカートゥーン図である。Bは、mTGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の特徴付けを示すウエスタンブロットである。ウエスタンブロットは、キメラタンパク質の天然状態及び多量体を形成する傾向を示す。mTGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の未処理試料（すなわち、還元剤または脱グリコシル化剤を伴わず、まだ煮沸されていない）を、各ブロットのNRとしてマークしたレーンに負荷した。Rとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤、β-メルカプトエタノールで処理し、煮沸した。DGとしてマークしたレーン中の試料を、還元剤である脱グリコシル化剤で処理し、煮沸した。Lとしてマークしたレーンは、タンパク質サイズラダーを含んでいた。キメラタンパク質の個々のドメインはそれぞれ、抗mSIRPα抗体（左ブロット）、抗Fc抗体（中央ブロット）、または抗mTGFB R2抗体（右ブロット）を使用してプローブした。

20

【図22】mSLAMF6-Fc-NKG2A及びmPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のFcドメインの、抗Fc抗体への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。抗mFcをプレート上にコーティングし、増加量の示されるキメラタンパク質をプレートに添加した。結合を、抗mFc HRPを使用して検出し、mFc IgGを、陽性対照として使用した。

30

【図23】hCD86-Fc-NKG2A及びhTGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のFcドメインの、抗ヒトFc抗体への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。抗ヒトIgGをプレート上にコーティングし、増加量の示されるキメラタンパク質をプレートに添加した。hIgGを、陽性対照として使用し、mCD80-Fc-NKG2Aを、陰性対照として使用した。結合を、抗ヒトFcガンマHRPを使用して検出した。

【図24】hCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aのキメラタンパク質のFcドメインの、抗ヒトFc抗体への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。抗ヒトIgGは、プレート上にコーティングし、増加量の示されるキメラタンパク質をプレートに添加した。hIgGを、陽性対照として使用した。結合を、抗ヒトFcガンマHRPを使用して検出した。

40

【図25】hCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、HLA-Eへの用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。HLA-Eをプレート上にコーティングし、増加量の示されるキメラタンパク質をプレートに添加した。結合を、抗ヒトFcガンマHRPを使用して検出した。

【図26】hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、HLA-Eへの用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。HLA-Eをプレート上にコーティングし、増加量のhCD86-Fc-NKG2Aをプレートに添加した。結合を、抗ヒトFcガンマHRPを使用して検出した。

50

【図27】hCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、HLA-Eへの用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。増加量の示されるキメラタンパク質をプレート上にコーティングし、抗ヒトHLA-E-Hisを使用して検出した。NKG2A以外のII型膜貫通タンパク質のECDを含むキメラタンパク質を、陰性対照として使用した。

【図28】hTGFB β 2-Fc-NKG2A及びhSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、HLA-Eへの用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。増加量の示されるキメラタンパク質をプレート上にコーティングし、抗ヒトHLA-E-Hisを使用して検出した。NKG2A以外のII型膜貫通タンパク質のECDを含むキメラタンパク質を、陰性対照として使用した。

10

【図29】hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、h2B4への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。陰性対照として使用したh2B4またはhCD28-Hisをプレート上にコーティングし、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を使用して検出した。

【図30】mTGFB β 2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、mTGFB β 1への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。mTGFB β 1をプレート上にコーティングし、mTGFB β 2-Fc-NKG2AまたはmCD80-Fc-NKG2Aを使用して検出し、これを陰性対照として使用した。

【図31】hCD48-Fc-NKG2A及びhCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、hCD2への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。組換えヒトCD2(rhCD2)タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量の示されるキメラタンパク質または組換えヒトCD58-Fc融合タンパク質(rhCD58-Fc)を添加し、抗mFc-HRP(mCD80-Fc-NKG2A用)または抗hFc-HRP(残りのタンパク質用)を使用して検出した。

20

【図32】hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、組換えヒト2B4タンパク質(rh2B4)への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。rh2B4-Hisをプレート上にコーティングした。増加量の示されるキメラタンパク質またはrhCD48-Fcを添加し、抗mFc-HRP(mCD80-Fc-NKG2A用)または抗hFc-HRP(残りのタンパク質用)を使用して検出した。

【図33】mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、mCD28への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。mCD28-Fcをプレート上にコーティングした。増加量のmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を添加し、抗mFc-HRPを使用して検出した。

30

【図34】hCD80-Fc-NKG2A、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、組換えヒトCD28(rhCD28)への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。rhCD28-Hisをプレート上にコーティングした。増加量の示されるキメラタンパク質またはhCD86-Fc(陽性対照)を添加し、抗mFc-HRPを使用して検出した。mCD48-Fc-NKG2Aを陰性対照として使用した。

【図35】mPD1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、mPD-L1への用量依存的結合を実証するELISAアッセイの結果を示す。増加量のmPD1-Fc-NKG2Aをプレート上にコーティングし、mPD-L1-Hisを使用して検出した。

40

【図36】mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が、Qa1と抗CD48の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証するELISAアッセイの結果を示す。抗マウスQa1抗体をプレート上にコーティングした。組換えQa1タンパク質、及び増加量のmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をその順に添加し、抗mCD48抗体を用いて検出した。

【図37】mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が、HLA-Eと抗CD86の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証するELISAアッセイの結果を示す。HLA-E-Hisをプレート上にコーティングした。増加量のmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を添加し、抗mCD86を使用して検出した。NKG2A

50

以外の I I 型膜貫通タンパク質の E C D を含むキメラタンパク質を、陰性対照として使用した。

【図 38】 m S I R P α - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、抗 N K G 2 A と m C D 4 7 の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する E L I S A アッセイの結果を示す。抗 N K G 2 A をプレート上にコーティングした。増加量の m S I R P α - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、m C D 4 7 - H i s を使用して検出した。C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を陰性対照として使用した。

【図 39】 h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、h P D - L 1 と H L A - E の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する E L I S A アッセイの結果を示す。h P D - L 1 - F c をプレート上でコーティングした。増加量の h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、H L A - E - H i s を使用して検出した。N K G 2 A 以外の I I 型膜貫通タンパク質の E C D を含むキメラタンパク質を、陰性対照として使用した。

【図 40】 h C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、r h C D 2 8 と H L A - E の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する E L I S A アッセイの結果を示す。r h C D 2 8 - F c をプレート上でコーティングした。増加量の h C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、H L A - E - H i s を使用して検出した。

【図 41】 h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、r h C D 2 8 と H L A - E の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する E L I S A アッセイの結果を示す。r h C D 2 8 - F c をプレート上でコーティングした。増加量の h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、H L A - E - H i s を使用して検出した。N K G 2 A 以外の I I 型膜貫通タンパク質の E C D を含むキメラタンパク質を、陰性対照として使用した。

【図 42】 h S L A M F 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、組換えヒト S L A M F 6 (r h S L A M F 6) と H L A - E の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する E L I S A アッセイの結果を示す。r h S L A M F 6 - F c をプレート上でコーティングした。増加量の h S L A M F 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、H L A - E - H i s を使用して検出した。N K G 2 A 以外の I I 型膜貫通タンパク質の E C D を含むキメラタンパク質を、陰性対照として使用した。

【図 43】 m P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、組換えマウス P D - L 1 (r m P D - L 1) と H L A - E の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する E L I S A アッセイの結果を示す。r m P D - L 1 - F c をプレート上でコーティングした。増加量の m P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、H L A - E - H i s を使用して検出した。N K G 2 A 以外の I I 型膜貫通タンパク質の E C D を含むキメラタンパク質を、陰性対照として使用した。

【図 44】 本明細書に開示されるキメラタンパク質による 2 つのリガンドへの同時結合を実証する E L I S A アッセイの結果を示す。(i) 組換えヒト 2 B 4 - F c 融合タンパク質 (r h 2 B 4 - F c) をプレート上にコーティングした。増加量の h C D 4 8 - F c - N K G 2 A または h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、H L A - E - H i s を使用して検出した。h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を陰性対照として使用した (陰性対照番号 1) 。これらのデータは、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、r h 2 B 4 と H L A - E の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する。(i i) 組換えヒト C D 2 - F c 融合タンパク質 (r h C D 2 - F c) をプレート上にコーティングした。増加量の h C D 5 8 - F c - N K G 2 A または h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を添加し、H L A - E - H i s を使用して検出した。h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を陰性対照として使用した (陰性対照番号 2) 。これらのデータは、h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、ヒト C D 2 と H L A - E の両方に対して同時に用量依存的に結合することを実証する。

【図 45】 h 2 B 4 (C D 4 8 の結合パートナー) を発現する C H O - K 1 細胞の生成を

示すフローサイトメトリー分析を示す。陽性クローンを抗 2 B 4 抗体で染色した。対照クローンをアイソタイプ対照抗体で染色した。

【図 4 6】A 及び B は、フローサイトメトリーによって測定した、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、野生型 (W T) C H O - K 1 細胞 (A) または C H O - K 1 / h 2 B 4 細胞 (B) への結合を示す。W T C H O - K 1 細胞ではなく、C H O - K 1 / h 2 B 4 細胞における用量依存的シフトは、C H O - K 1 / h 2 B 4 細胞によって発現される h 2 B 4 に対する h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の用量依存的結合を示す。

【図 4 7】フローサイトメトリーによって測定した、W T C H O - K 1 細胞と比較した、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、C H O - K 1 / h 2 B 4 細胞への結合の定量を示す。

10

【図 4 8】m 2 B 4 (C D 4 8 の結合パートナー) を発現する C H O - K 1 細胞の生成を示すフローサイトメトリー分析を示す。陽性クローンを抗 2 B 4 抗体で染色した。対照をアイソタイプ対照抗体で染色した。染色していない対照も分析した。

【図 4 9】A 及び B は、フローサイトメトリーによって測定した、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、W T C H O - K 1 細胞 (A) または C H O - K 1 / m 2 B 4 細胞 (B) への結合を示す。W T C H O - K 1 細胞ではなく、C H O - K 1 / m 2 B 4 細胞における用量依存的シフトは、C H O - K 1 / m 2 B 4 細胞によって発現される m 2 B 4 に対する m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の用量依存的結合を示す。

20

【図 5 0】フローサイトメトリーによって測定した、W T C H O - K 1 細胞と比較した、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、C H O - K 1 / m 2 B 4 細胞への結合の定量を示す。

【図 5 1】h P D - L 1 を発現する C H O - K 1 細胞の生成を示すフローサイトメトリー分析を示す。陽性クローンを抗 h P D - L 1 抗体で染色した。未染色細胞を陰性対照として使用した。

【図 5 2】A 及び B は、フローサイトメトリーによって測定した、h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、W T C H O - K 1 細胞 (A) または C H O - K 1 / h P D - L 1 細胞 (B) への結合を示す。W T C H O - K 1 細胞ではなく、C H O - K 1 / h P D - L 1 細胞における用量依存的シフトは、C H O - K 1 / h P D - L 1 細胞によって発現される h P D - L 1 に対する h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の用量依存的結合を示す。

30

【図 5 3】フローサイトメトリーによって測定した、W T C H O - K 1 細胞と比較した、h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、C H O - K 1 / h P D - L 1 細胞への結合の定量を示す。

【図 5 4】m P D - L 1 を発現する C H O - K 1 細胞の生成を示すフローサイトメトリー分析を示す。陽性クローンを抗 m P D - L 1 抗体で染色した。未染色細胞を陰性対照として使用した。

【図 5 5】A 及び B は、フローサイトメトリーによって測定した、m P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、W T C H O - K 1 細胞 (A) または C H O - K 1 / m P D - L 1 細胞 (B) への結合を示す。C H O - K 1 / m P D - L 1 細胞における、W T C H O - K 1 細胞と比較してより大きな用量依存的シフトは、C H O - K 1 / m P D - L 1 細胞によって発現される m P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、m P D - L 1 への用量依存的結合を示す。

40

【図 5 6】フローサイトメトリーによって測定した、W T C H O - K 1 細胞と比較した、m P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、C H O - K 1 / m P D - L 1 細胞への結合の定量を示す。

【図 5 7】m Q a 1 (C D 4 8 の結合パートナー) を発現する C H O - K 1 細胞の生成を示すフローサイトメトリー分析を示す。陽性クローンを抗 m Q a 1 抗体で染色した。対照をアイソタイプ対照抗体で染色した。染色していない対照も分析した。

50

【図58】A及びBは、フローサイトメトリーによって測定した、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、WT CHO-K1細胞(A)またはCHO-K1/mQa1細胞(B)への結合を示す。WT CHO-K1細胞ではなく、CHO-K1/mQa1細胞における用量依存的シフトは、CHO-K1/mQa1細胞によって発現されるmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、mQa1への用量依存的結合を示す。

【図59】フローサイトメトリーによって測定した、WT CHO-K1細胞と比較した、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、CHO-K1/mQa1細胞への結合の定量を示す。

【図60】hCD2を発現するCHO-K1細胞の生成を示すフローサイトメトリー分析を示す。陽性クローンを抗hCD2抗体で染色した。未染色細胞及びアイソタイプ対照染色細胞を負の対照として使用した。

【図61】A及びBは、フローサイトメトリーによって測定した、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、WT CHO-K1細胞(A)またはCHO-K1/hCD2細胞(B)への結合を示す。WT CHO-K1細胞ではなく、CHO-K1/hCD2細胞における用量依存的シフトは、CHO-K1/hCD2細胞によって発現されるhCD2に対するhCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的結合を示す。

【図62】フローサイトメトリーによって測定した、WT CHO-K1細胞と比較した、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、CHO-K1/hCD2細胞への結合の定量を示す。

【図63】hCD28を発現するCHO-K1細胞の生成を示すフローサイトメトリー分析を示す。2つの陽性クローンを抗hCD28抗体で染色した。未染色細胞及びアイソタイプ対照染色細胞を負の対照として使用した。

【図64】A及びBは、フローサイトメトリーによって測定した、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、WT CHO-K1細胞(A)またはCHO-K1/hCD28細胞(B)への結合を示す。WT CHO-K1細胞ではなく、CHO-K1/hCD28細胞における用量依存的シフトは、CHO-K1/hCD28細胞によって発現されるhCD28に対するhCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的結合を示す。

【図65】フローサイトメトリーによって測定した、WT CHO-K1細胞と比較した、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、CHO-K1/hCD28細胞への結合の定量を示す。

【図66】mCD28を発現するCHO-K1細胞の生成を示すフローサイトメトリー分析を示す。2つの陽性クローンを抗mCD28抗体で染色した。未染色細胞及びアイソタイプ対照染色細胞を負の対照として使用した。

【図67】A及びBは、フローサイトメトリーによって測定した、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、WT CHO-K1細胞(A)またはCHO-K1/mCD28細胞(B)への結合を示す。WT CHO-K1細胞ではなく、CHO-K1/mCD28細胞における用量依存的シフトは、CHO-K1/mCD28細胞によって発現されるmCD28に対するmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的結合を示す。

【図68】フローサイトメトリーによって測定した、WT CHO-K1細胞と比較した、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、CHO-K1/mCD28細胞への結合の定量を示す。

【図69】A及びBは、フローサイトメトリーによって測定した、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、WT CHO-K1細胞(A)またはCHO-K1/mCD28細胞(B)への結合を示す。WT CHO-K1細胞と比較して、CHO-K1/mCD28細胞における用量依存的シフトは、CHO-K1/mCD28細胞によって発現されるmCD28に対するmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依

10

20

30

40

50

的結合を示す。

【図70】フローサイトメトリーによって測定した、WT CHO-K1細胞と比較した、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、CHO-K1/mCD28細胞への結合の定量を示す。

【図71】mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が2B4シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/m2B4細胞は、細胞が発現するm2B4タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/m2B4細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、m2B4の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

10

【図72】mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がm2B4及びmCD2シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/m2B4及びCHO-K1/mCD2細胞は、細胞が発現するm2B4及びmCD2タンパク質それぞれへのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/m2B4細胞、CHO-K1/mCD2細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、m2B4細胞またはmCD2の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

20

【図73】mSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmSLAMF6シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/mSLAMF6細胞は、細胞が発現するmSLAMF6タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のmSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/mSLAMF6細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、CHO-K1/mSLAMF6細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

【図74】hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD28シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/CD28細胞は、細胞が発現するCD28タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/CD28細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、CD28の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

30

【図75】hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhCD28シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/hCD28細胞は、細胞が発現するhCD28タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のhCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/hCD28細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、hCD28の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

40

【図76】hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がHLA-Eシグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/HLA-E細胞は、細胞が発現するHLA-Eタンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のhPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/HLA-E細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、HLA-Eの活性化をルシフェラーゼアッセイによって測

50

定した。

【図 77】mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がQa1シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/Qa1細胞は、細胞が発現するQa1タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/Qa1細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、Qa1の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

【図 78】mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がQa1シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/Qa1細胞は、細胞が発現するQa1タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のmPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/Qa1細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、Qa1の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

【図 79】TGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がQa1シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/Qa1細胞は、細胞が発現するQa1タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のTGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/Qa1細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、Qa1の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

【図 80】hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がh2B4シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/h2B4細胞は、細胞が発現するh2B4タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のhCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/h2B4細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、h2B4の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

【図 81】hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhCD2シグナル伝達を用量依存的に活性化することを示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。これらのアッセイで使用されるCHO-K1/hCD2細胞は、細胞が発現するhCD2タンパク質へのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。WT CHO-K1細胞を陰性対照として使用した。増加量のhCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/hCD2細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、hCD2の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

【図 82】フローサイトメトリーによって測定される、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のNK92-CD16V細胞への結合を示す。用量依存的シフトは、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への用量依存的結合を示す。

【図 83A】hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への結合を示す。Aは、フローサイトメトリーベースの結合アッセイの結果である。

【図 83B】hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への結合を示す。Bは、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16Vエフェクター細胞への結合の定量を示す。用量依存性結合は、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がNK92-CD16V細胞と効果的に結合することを実証する。

【図 84】フローサイトメトリーによって測定される、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のNK92-CD16V細胞への結合を示す。用量依存的シフトは、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への用量依

10

20

30

40

50

的結合を示す。

【図 8 5】フローサイトメトリーによって測定される、h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、N K 9 2 - C D 1 6 V 細胞への結合を示す。用量依存的シフトは、h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、N K 9 2 - C D 1 6 V 細胞への用量依存的結合を示す。

【図 8 6】m C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、用量依存的に、抗原活性化 T 細胞（O T - 1 ナイーブ T 細胞）によって媒介される抗原陽性（O V A +）標的細胞のアポトーシスを誘導することを実証する。増加量の m C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を、O T - 1 ナイーブ T 細胞（エフェクター細胞）及び O V A + 細胞（標的細胞）とともに、エフェクター細胞：標的細胞比 5：1 でインキュベートした。カスパーゼ 3 / 7 活性を測定することによって、アポトーシスを評価した。

10

【図 8 7】h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、抗 E G F R 抗体と組み合わせて、E G F R 陽性 A 4 3 1 ヒト非小細胞肺癌（N S C L C）細胞（標的細胞）において、N K 細胞媒介抗体依存性細胞傷害を用量依存的に誘導することを実証する。増加量の h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質及び $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ のセツキシマブ N K 9 2 - C D 1 6 V 細胞（エフェクター細胞）及び A 4 3 1 細胞（標的細胞）エフェクター細胞：標的細胞比 5：1。アネキシン V を測定することによって、アポトーシスを評価した。

【図 8 8】h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、抗 E G F R 抗体と組み合わせて、E G F R 陽性 A 5 4 9 ヒト肺癌細胞（標的細胞）において、N K 細胞媒介抗体依存性細胞傷害を用量依存的に誘導することを実証する。増加量の h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質及び $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ のセツキシマブを、N K 9 2 - C D 1 6 V 細胞（エフェクター細胞）及び A 5 4 9 細胞（標的細胞）とともに、エフェクター細胞：標的細胞比率 5：1 でインキュベートした。アネキシン V を測定することによって、アポトーシスを評価した。

20

【図 8 9 A】m C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、用量依存的に、マウス網状細胞肉腫 A 2 0 細胞内で新たに単離された脾細胞によって媒介されるアポトーシスを誘導することを実証する。増加量の m C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を、新たに単離した脾細胞（エフェクター細胞）及び A 2 0 細胞（標的細胞）とともにインキュベートした。陰性対照には、脾細胞のみ（標的細胞なし）及び A 2 0 細胞のみ（エフェクター細胞なし）が含まれた。カスパーゼ 3 / 7 活性を測定することによって、アポトーシスを評価した。時間の関数としてカスパーゼ 3 / 7 活性を示す。

30

【図 8 9 B】m C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、用量依存的に、マウス網状細胞肉腫 A 2 0 細胞内で新たに単離された脾細胞によって媒介されるアポトーシスを誘導することを実証する。増加量の m C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を、新たに単離した脾細胞（エフェクター細胞）及び A 2 0 細胞（標的細胞）とともにインキュベートした。陰性対照には、脾細胞のみ（標的細胞なし）及び A 2 0 細胞のみ（エフェクター細胞なし）が含まれた。カスパーゼ 3 / 7 活性を測定することによって、アポトーシスを評価した。3 . 5 時間におけるカスパーゼ 3 / 7 活性を示す棒グラフを示す。脾細胞なし（黒色の棒）ではアポアトーシスは観察されなかったことに留意されたい。

40

【図 9 0】A 及び B は、ネズミ結腸直腸癌細胞株 C T 2 6 同種移植片に対する C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の有効性を実証する。マウスに C T 2 6 細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：（1）未処理、（2） $100 \mu\text{g} / \text{マウス}$ の抗 Q a 1 抗体（B i o x c e l l クローン 4 C 2 . 4 A 7 . 5 H 1 1）、及び（3） $300 \mu\text{g} / \text{マウス}$ の C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質。マウスを、接種後 5、8、11、14、16 及び 18 日目に処理した。腫瘍体積を測定した。A は、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。B は、18 日目の腫瘍体積を示す。* * は指示基間の $p \leq 0 . 0 1$ を示し、* * * は指示基間の $p \leq 0 . 0 0 1$ を示す。

【図 9 1】A 及び B は、ネズミ結腸直腸癌細胞株 C T 2 6 同種移植片に対する C D 8 0 -

50

Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性を実証する。マウスにCT26細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗Qa1抗体(Bioxcellクローン4C2.4A7.5H11)、及び(3) 300 μ g/マウスのCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後5、8、11、14、16、及び18日目に処理した。腫瘍体積を測定した。Aは、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。Bは、18日目の腫瘍体積を示す。**は、指示基間の $p \leq 0.01$ を示す。

【図92】A及びBは、ネズミ結腸直腸癌細胞株CT26同種移植片に対するCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性を実証する。マウスにCT26細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗Qa1抗体(Bioxcellクローン4C2.4A7.5H11)、及び(3) 300 μ g/マウスのCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後5、8、11、14、16、及び18日目に処理した。腫瘍体積を測定した。Aは、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。Bは、18日目の腫瘍体積を示す。**は、指示基間の $p \leq 0.01$ を示す。

【図93】A及びBは、ネズミ結腸直腸癌細胞株CT26同種移植片に対するPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性を実証する。マウスにCT26細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗Qa1抗体(Bioxcellクローン4C2.4A7.5H11)、及び(3) 300 μ g/マウスPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後5、8、11、及び14日目に処理した。腫瘍体積を測定した。Aは、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。Bは、11日目の腫瘍体積を示す。*は、指示基間の $p \leq 0.05$ を示す。

【図94】A及びBは、新規抗原OVA(EG7-OVA)を発現するように操作されたネズミリンパ腫細胞株EG7の同種移植片に対するCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性を示す。マウスにEG7-OVA細胞を接種し、CD4及びCD8 OVA特異的T細胞を注入した。マウスを、以下の4つの処理群のうちの1つに無作為に割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗PD1抗体(BioxcellクローンRMP1-14)、(3) 100 μ g/マウスの抗NKG2A(Bioxcellクローン20D5)、及び(4) 300 μ g/マウスのCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。マウスを、接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。腫瘍体積を、指示した日に測定した。Aは、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。Bは、7日目の腫瘍体積を示す。**は、指示基間の $p \leq 0.01$ を示す。

【図95】腫瘍同種移植片に対するCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質エフェクターメモリーT細胞(TEM細胞)の効果を示す。図94A及び図94Bの説明に記載されているマウスから尾血液を採取し、示された日に末梢系の免疫構成を分析した。0日目及び3日目のエフェクターメモリーT細胞(TEM細胞)の画分をプロットする。トランスジェニックからOT-1マウスまでのOT-I:GFPからの細胞を使用して、OT-1細胞を測定した。

【図96】A及びBは、ネズミ骨髄単球性白血病細胞株WEHI-3の同種移植片に対するCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性を実証する。Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗PD1抗体(BioxcellクローンRMP1-14)、(3) 100 μ g/マウスの抗NKG2A抗体(Bioxcellクローン20D5)、及び(4) 300 μ g/マウスのCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。マウスは、2日空けて6回処理した。腫瘍体積を、指示した日に測定した。Aは、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。Bは、18日目の腫瘍体積を示す。*は示された基間の $p \leq 0.05$ を示し、***は示された基間の $p \leq 0.001$ を示す。

【図 97】A 及び B は、ネズミ骨髄単球性白血病細胞株 WEHI-3 の同種移植片に対する SIRP α -Fc-NKG2A キメラタンパク質の有効性を実証する。Balb/c マウスに WEHI-3 細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗 PD1 抗体 (Bioxcell クロニン RMP1-14)、(3) 100 μ g/マウスの抗 NKG2A 抗体 (Bioxcell クロニン 20D5)、及び (4) 300 μ g/マウスの SIRP α -Fc-NKG2A キメラタンパク質。マウスを、接種後 0、2、4、6、8 及び 10 日目に処理した。マウスは、2 日空けて 6 回処理した。腫瘍体積を、指示した日に測定した。A は、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。B は、18 日目の腫瘍体積を示す。* は示された基間の $p \leq 0.05$ を示し、*** は示された基間の $p \leq 0.001$ を示す。

10

【図 98】A 及び B は、ネズミ骨髄単球性白血病細胞株 WEHI-3 の同種移植片に対する CD48-Fc-NKG2A キメラタンパク質の有効性を実証する。Balb/c マウスに WEHI-3 細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗 PD1 抗体 (Bioxcell クロニン RMP1-14)、(3) 100 μ g/マウスの抗 NKG2A 抗体 (Bioxcell クロニン 20D5)、及び (4) 300 μ g/マウスの CD48-Fc-NKG2A キメラタンパク質。マウスを、接種後 0、2、4、6、8 及び 10 日目に処理した。マウスは、2 日空けて 6 回処理した。腫瘍体積を、指示した日に測定した。A は、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。B は、18 日目の腫瘍体積を示す。* は指示基間の $p \leq 0.05$ を示し、** は指示基間の $p \leq 0.01$ を示す。

20

【図 99】A 及び B は、ネズミ骨髄単球性白血病細胞株 WEHI-3 の同種移植片に対する TGFBR2-Fc-NKG2A キメラタンパク質の有効性を実証する。Balb/c マウスに WEHI-3 細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗 PD1 抗体 (Bioxcell クロニン RMP1-14)、(3) 100 μ g/マウスの抗 NKG2A 抗体 (Bioxcell クロニン 20D5)、及び (4) 300 μ g/マウスの TGFBR2-Fc-NKG2A キメラタンパク質。マウスを、接種後 0、2、4、6、8 及び 10 日目に処理した。マウスは、2 日空けて 6 回処理した。腫瘍体積を、指示した日に測定した。A は、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。B は、18 日目の腫瘍体積を示す。* は指示基間の $p \leq 0.05$ を示し、** は指示基間の $p \leq 0.01$ を示す。

30

【図 100】A 及び B は、CD8⁺ T 細胞が、ネズミ骨髄単球性白血病細胞株 WEHI-3 の同種移植片に対する CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質の抗腫瘍効果に必要であることを実証する。Balb/c マウスに WEHI-3 細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 250 μ g/マウスの抗 CD8a 抗体 (Bioxcell クロニン 2.43)、(2) 300 μ g/マウスの CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質、及び (3) 250 μ g/マウスの抗 CD8a 抗体 (Bioxcell クロニン 2.43) + 300 μ g/マウスの CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質。腫瘍体積を、指示した日に測定した。A は、時間の関数としてプロットされた腫瘍体積を示す。B は、18 日目の腫瘍体積を示す。* は、指示基間の $p \leq 0.05$ を示す。

40

【図 101】A~C は、CD86-Fc-NKG2A が、未処理及び抗 NKG2A 抗体療法の両方と比較して、脾臓におけるサイトカイン分泌細胞の増殖を誘導したことを実証する。Balb/c マウスに WEHI-3 細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗 NKG2A 抗体 (Bioxcell クロニン 20D5)、及び (3) 300 μ g/マウスの CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質。マウスを、接種後 1、3、5、及び 7 日目に処理した。処理後 8 日目に、マウスを殺し、脾臓を単離し、消化し、異なる免疫細胞の量について分析した。A は、示された処理群からのマウスの脾臓における CD3⁺CD11b⁺CD27⁺ 細胞を示す。B は、示された処理群からのマウスの脾臓における

50

CD3-NKP46+CD11b+CD27+細胞を示す。Cは、示された処理群からのマウスの脾臓におけるCD3-KLRG1+CD11b+CD27+細胞を示す。統計解析は、スチューデントT検定を用いて実行し、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ であった。

【図102】A及びBは、CD86-Fc-NKG2Aが、未処理マウスと比較して、処理マウスの脾臓における活性化された細胞傷害性T細胞及びCD107+細胞（細胞傷害性向上のためのマーカー）の成長を誘導したことを実証する。Aは、示される処理群からのマウスの脾臓におけるPD-1+細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を示す。Bは、示された処理群からのマウスの脾臓におけるCD107+細胞を示す。統計解析は、スチューデントT検定を用いて実行し、* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ であった。

10

【図103】CD86-Fc-NKG2Aが、未処理と比較して、処理マウスの腫瘍において、細胞溶解性マーカーグランザイムBを用いて、免疫細胞の腫瘍への浸潤強化を誘導したことを実証する。Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。統計解析は、スチューデントT検定を用いて実行し、* $p < 0.05$ であった。

【図104】A～Cは、CD86-Fc-NKG2Aが、強力な活性化マーカー（CD137、IFN- γ 、及びPD1）を発現する腫瘍への免疫細胞の浸潤を強化したことを実証する。Aは、示された処理群からのマウスの腫瘍におけるCD137+細胞を示す。Bは、示された処理群からのマウスの腫瘍におけるIFN γ +細胞を示す。Cは、示される処理群からのマウスの腫瘍におけるPD-1+細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を示す。統計解析は、スチューデントT検定を用いて実行し、* $p < 0.05$ であった。

20

【図105】A～Cは、CD86-Fc-NKG2A質が、エフェクターメモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びNKG2A+CD8+T細胞の流入領域リンパ節における免疫細胞の浸潤増強を誘導したことを実証し、mCD86-Fc-NKG2Aがこれらの重要なエフェクター免疫細胞の浸潤及び増殖を誘導することができたことを示す。Aは、示される治療群からのマウスのリンパ節におけるエフェクターメモリーT細胞を示す。Bは、示される治療群からのマウスのリンパ節におけるセントラルメモリーT細胞を示す。Cは、示される治療群からのマウスのリンパ節におけるNKG2a+細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を示す。統計解析は、スチューデントT検定を用いて実行し、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ であった。

30

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、部分的に、がん細胞またはウイルス感染細胞に由来する免疫阻害シグナルを遮断する、及び／またはナチュラルキラー（NK）細胞による阻害シグナルの受容を防止する、キメラタンパク質の開発に基づいている。

【0027】

NK細胞は、事前の活性化なしに特定の腫瘍細胞及びウイルス感染細胞の溶解を媒介することができるリンパ球であり、それらはまた、特定の体液性及び細胞媒介性免疫を調節することができる。NK細胞は、非古典的なMHCクラスIタンパク質、例えば、HLA-E（ヒト）及びQa1（マウス）に結合したときに阻害シグナルを受け取るC型レクチン受容体を発現する。HLA-E/Qa1は、事実上すべての細胞によって発現され、しばしばがん細胞によって上方制御される。NK細胞によって発現されるC型レクチン受容体の一例は、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2D、NKG2E、NKG2F、及びNKG2Hを含むNKG2受容体ファミリーのメンバーである。NKG2Aは、例えば、CD94（KLRD1）と二量体化し、これは、表面でNKG2Aを安定化させ、NKG2A/CD94ヘテロ二量体がHLA-Eを認識し、HLA-Eと結合することを可能にし、それによって、免疫阻害シグナルを受け取る。NKG2Aはまた、細胞傷害性T細胞、ガンマデルタ（ $\gamma\delta$ ）T細胞、及びナチュラルキラーT（NKT）細胞によって発現される。がん細胞またはウイルス感染細胞からの免疫阻害シグナルの、NKG2Aの受容を遮断することにより、NK細胞の阻害が防止され、がん細胞もしくはウイルス感染細胞を死滅させることが可能になる。

40

50

【0028】

本発明のキメラタンパク質は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部または膜アンカー細胞外タンパク質の一部と、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインであって、当該II型膜貫通タンパク質がナチュラルキラー（NK）細胞の表面上で天然に発現される、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインと、を含むように操作され得る。これらのキメラタンパク質は、免疫抑制シグナルの伝達及び／または受容を阻害することができる。いくつかの例では、キメラタンパク質のI型膜貫通タンパク質末端は、例えば、その検出及び／または破壊を回避しようと試みるがん細胞またはウイルス感染細胞に由来する免疫阻害シグナルの伝達を妨害、遮断、減少、阻害、及び／または隔離する。他の例では、I型膜貫通タンパク質は、別の免疫細胞の活性を増加させる免疫刺激シグナルを提供し得る。キメラタンパク質のII型膜貫通タンパク質末端は、阻害シグナルを妨害、遮断、減少、阻害、及び／または隔離し、それによってNK細胞によるそれらの受容を防止する。これらの2つの作用を合わせると、抗がん攻撃またはNK細胞によるウイルス感染細胞の攻撃を可能にする。

10

【0029】

実施形態では、細胞外ドメインは、細胞外環境と相互作用することが可能である膜貫通タンパク質の一部を指す。実施形態では、細胞外ドメインは、リガンドまたは受容体に結合するのに十分であり、細胞にシグナルを伝達するのに有効である膜貫通タンパク質の一部を指す。実施形態では、細胞外ドメインは、細胞または細胞膜の外部に通常存在する膜貫通タンパク質のアミノ酸配列全体である。実施形態では、細胞外ドメインは、細胞または細胞膜の外部にあり、当技術分野で既知である方法を使用してアッセイされ得るような（例えば、インビトロでのリガンド結合及び／または細胞活性化アッセイ）、シグナル伝達及び／またはリガンド結合に必要とされる膜貫通タンパク質のアミノ酸配列の一部であり得る。

20

【0030】

膜貫通タンパク質は典型的に、細胞外ドメイン、1つまたは一連の膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインからなる。理論に拘束されることを望まないが、膜貫通タンパク質の細胞外ドメインは、可溶性受容体またはリガンドまたは膜結合型受容体またはリガンド（すなわち、隣接する細胞の膜）との相互作用に関与する。理論に拘束されることを望まないが、膜貫通ドメイン（複数可）は、膜貫通タンパク質を原形質膜に局在化させる原因となる。理論に拘束されることを望まないが、膜貫通タンパク質の細胞内ドメインは、細胞内シグナル伝達分子との相互作用を調整して、細胞内応答を細胞外環境と調整する（またはその逆）原因となる。

30

【0031】

シングルパス膜貫通タンパク質には、一般的に2つの種類があり、細胞外アミノ末端及び細胞内カルボキシ末端を有するI型膜貫通タンパク質（図1A、左のタンパク質を参照されたい）、及び細胞外カルボキシ末端及び細胞内アミノ末端を有するII型膜貫通タンパク質（図1A、右のタンパク質を参照されたい）である。I型及びII型膜貫通タンパク質は、受容体またはリガンドのいずれかであり得る。I型膜貫通タンパク質について、タンパク質のアミノ末端は、細胞の外側を向いており、したがって、細胞外環境において他の結合パートナー（リガンドまたは受容体のいずれか）との相互作用に関与する機能ドメインを含む。II型膜貫通タンパク質について、タンパク質のカルボキシ末端は、細胞の外側を向いており、したがって、細胞外環境において他の結合パートナー（リガンドまたは受容体のいずれか）との相互作用に関与する機能ドメインを含む。したがって、これらの2種類の膜貫通タンパク質は、細胞膜に対して互いに反対の配向を有し、I型膜貫通タンパク質のアミノ末端は、細胞膜から離れて配向されるが、II型膜貫通タンパク質のアミノ末端は、細胞膜から離れて配向される。

40

【0032】

実施形態では、キメラタンパク質は、膜アンカー細胞外タンパク質の一部を含む。一般に、膜アンカー細胞外タンパク質は、細胞外環境に存在し、細胞外環境と相互作用する。実

50

施形態では、膜アンカー細胞外タンパク質の一部は、リガンドまたは受容体に結合するのに十分である。実施形態では、当該一部は、膜アンカー細胞外タンパク質のアミノ酸配列全体である。膜アンカー細胞外タンパク質の一部が、リガンド／受容体結合が可能であるかどうかを決定することは、当技術分野で既知の方法を使用してアッセイされてもよい（例えば、インビトロリガンド結合及び／または細胞活性化アッセイ）。図1Bは、2つの膜アンカー細胞外タンパク質を示し、曲線はアンカードメインを表し、左のタンパク質は細胞膜にアンカーされたカルボキシ末端を有し、右のタンパク質は細胞膜にアンカーされたアミノ末端を有する。

【0033】

本発明のキメラタンパク質において、I型膜貫通タンパク質及びII型膜貫通タンパク質は、それらの膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインが取り除かれ、膜貫通タンパク質の細胞外ドメインがリンカー配列を使用して隣接し、単一のキメラタンパク質を生成するように操作され得る。あるいは、2つの膜アンカー細胞外タンパク質は、それらの細胞外ドメインの一部がリンカー配列を使用して隣接し、単一のキメラタンパク質を生成するように操作され得る。最後に、1つの膜アンカー細胞外タンパク質及び1つの膜貫通タンパク質（その膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを欠く）は、リンカー配列を使用して隣接し、単一のキメラタンパク質を生成し得る。図1C及び図1Dに示されるように、I型膜貫通タンパク質またはカルボキシ末端アンカー細胞外タンパク質の細胞外ドメインと、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインまたはアミノアンカー細胞外タンパク質の細胞外ドメインとを組み合わせ、単一のキメラタンパク質とする。図1Cは、リンカー配列によって隣接された、遊離I型膜貫通タンパク質（その膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインから）、または遊離カルボキシ末端アンカー細胞外タンパク質（そのアンカードメインから）と、遊離II型膜貫通タンパク質（その膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインから）、または遊離アミノ末端アンカー細胞外タンパク質（そのアンカードメインから）との連結を示す。この描写における細胞外ドメインは、I型タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列全体、またはカルボキシアンカー細胞外タンパク質のアミノ酸配列全体、あるいはその画分（fraction）を含み得、当該一部は、意図されたリガンド／受容体と結合する能力を保持する。同様に、この描写における細胞外ドメインは、II型タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列全体、またはアミノアンカー細胞外タンパク質のアミノ酸配列全体、あるいはその画分を含み得、当該一部は、意図されたリガンド／受容体と結合する能力を保持する。さらに、キメラタンパク質は、第1の細胞外ドメイン（図1C及び図1Dのキメラタンパク質の左端に示される）がその受容体／リガンドと立体的に結合することができ、及び／または第2の細胞外ドメイン（図1C及び図1Dのキメラタンパク質の右端に示される）がその受容体／リガンドと立体的に結合することができるように、ドメイン間の十分な全体的柔軟性及び／または物理的距離を含む。図1Dは、キメラタンパク質の各細胞外ドメインが「外向き」に面する、線形キメラタンパク質における隣接する細胞外ドメインを示す。

【0034】

重要なのは、本発明のキメラタンパク質が、1つのドメインとの免疫抑制シグナルの伝達を妨害、遮断、減少、阻害、及び／または隔離し、ならびに（i）免疫抑制シグナルの受容、もしくは（ii）他のドメインとの免疫刺激シグナルのいずれかを提供するので、それは、2つの異なる経路によって抗腫瘍効果及び／または抗ウイルス効果を提供することができ、この二重作用は、患者に治療効果を提供する、及び／または患者に増強された治療効果を提供する可能性が高い。さらに、かかるキメラタンパク質は、2つの異なる経路を介して機能することができるため、少なくとも、2つの経路のうちの1つを標的とする治療に対する応答が不十分である患者において有効であり得る。したがって、2つの経路のうちの1つを介して作用する治療に対して不十分な応答者である患者は、他の経路を標的とすることによって治療効果を達成することができる。

【0035】

本発明のキメラタンパク質は、使用の容易さ及び産生の容易さを含むがこれらに限定され

ない利点を提供する。これは、2つの異なる免疫療法剤が、2つの独立した製造プロセスの代わりに単一の製造プロセスを可能にし得る単一の生成物に組み合わせるからである。さらに、2つの別々の薬剤の代わりに単一の薬剤を投与することは、より容易な投与及びより高い患者コンプライアンスを可能にする。さらに、例えば、多数のジスルフィド結合及びグリコシル化などの翻訳後修飾を含有する大型多量体タンパク質であるモノクローナル抗体とは対照的に、本発明のキメラタンパク質は、製造するのにより容易であり、より費用効果が高い。

【0036】

キメラタンパク質

本発明のキメラタンパク質は、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部または膜アンカー細胞外タンパク質の一部と、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインであって、当該II型膜貫通タンパク質がナチュラルキラー（NK）細胞、例えば、NK G2受容体ファミリーの表面上で天然に発現される、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインと、を含む。これらのキメラタンパク質は、少なくとも、抗腫瘍攻撃またはウイルス感染細胞の攻撃を可能にする免疫阻害シグナルのNK細胞への伝達を遮断することができる。

10

【0037】

本発明の態様は、以下の一般的な構造のキメラタンパク質であって、N末端－（a）－（b）－（c）－C末端、式中、（a）が、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部または膜アンカー細胞外タンパク質の一部を含む、第1のドメインであり、（b）が、第1及び第2のドメインに隣接するリンカーであり、（c）が、II型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインの一部を含む、第2のドメインであって、当該II型膜貫通タンパク質が、ナチュラルキラー（NK）細胞の表面上で天然に発現される、第2のドメインである、キメラタンパク質である。

20

【0038】

実施形態では、II型膜貫通タンパク質は、NK G2受容体ファミリーのメンバーである。

【0039】

実施形態では、NK G2受容体ファミリーのメンバーは、NK G2 A、NK G2 B、NK G2 C、NK G2 D、NK G2 E、NK G2 F、及びNK G2 Hから選択され、例えば、NK G2受容体ファミリーのメンバーは、NK G2 Aである。実施形態では、第2のドメインは、NK G2 Aリガンド、例えば、HLA-E（ヒト）またはQa1（マウス）と結合することが可能である。実施形態では、第2のドメインは、NK G2 Aの細胞外ドメインを実質的にすべて含む。実施形態では、NK G2 Aリガンドと結合することにより、NK細胞への免疫阻害シグナルの伝達を遮断する。

30

【0040】

実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、CD80、CD86、CD58、PD-1、SLAMF6、SIRPα及びTGFB R2から選択される。実施形態では、第1のドメインは、I型膜貫通タンパク質のリガンド／受容体と結合することが可能である。実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、CD80である。実施形態では、リガンド／受容体は、CTLA-4またはCD28である。実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、CD86である。実施形態では、リガンド／受容体は、CTLA-4またはCD28である。実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、CD58である。実施形態では、リガンド／受容体は、CD2である。実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、PD-1である。実施形態では、リガンド／受容体は、PD-L1またはPD-L2である。実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、SLAMF6である。実施形態では、リガンド／受容体は、SAPまたはEAT2である。実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、SIRPαである。実施形態では、リガンド／受容体は、CD47である。実施形態では、I型膜貫通タンパク質は、TGFB R2である。実施形態では、リガンドは、TGFBβ3またはTGFBβ1である。実施形態では、第1のドメインは、I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインを実質的にすべて含む。実施形態では、第1のドメインをそのリガンド／受容体に結合することに

40

50

より、免疫抑制シグナルを阻害する。実施形態では、第1のドメインをそのリガンド／受容体に結合することにより、免疫抑制シグナルを活性化させる。

【0041】

実施形態では、膜アンカー細胞外タンパク質は、CD48である。実施形態では、リガンド／受容体は、CD2である。実施形態では、リガンド／受容体は、2B4である。実施形態では、第1のドメインは、成熟CD48ポリペプチドを実質的にすべて含む。実施形態では、第1のドメインをそのリガンド／受容体に結合することにより、免疫抑制シグナルを阻害する。実施形態では、第1のドメインをそのリガンド／受容体に結合することにより、免疫抑制シグナルを活性化させる。

【0042】

実施形態では、キメラタンパク質は、細胞間、例えば、NK細胞と腫瘍細胞との間、またはNK細胞とウイルス感染細胞との間で安定性シナプスを形成することが可能である。実施形態では、細胞間の安定性シナプスは、腫瘍の縮小またはNK細胞によるウイルス感染細胞の死滅に有利な空間的配向を提供する。実施形態では、空間的配向は、腫瘍細胞及びウイルス感染細胞から選択される標的細胞を攻撃するようにNK細胞を配置し、及び／または標的細胞は、本発明のキメラタンパク質によって遮蔽されたものを越える負のシグナルを含む負のシグナルを送達するのを立体的に防ぐ。

【0043】

実施形態では、第1のドメイン及び第2のドメインのいずれかまたは両方の、そのリガンド／受容体への結合は、受容体とそのリガンドとの長い相互作用を提供する、遅いオフ速度（K_{off}）で生じる。実施形態では、長い相互作用は、持続的な負のシグナル遮蔽効果、免疫抑制シグナルの持続的な阻害、及び／または免疫抑制シグナルの持続的な活性化を提供する。実施形態では、長い相互作用は、NK細胞増殖を提供し、及び／または抗腫瘍攻撃もしくはウイルス感染細胞の攻撃を可能にする。実施形態では、長い相互作用は、刺激シグナル、例えば、サイトカインの放出を提供するのに十分なシグナル伝達を可能とする。

【0044】

実施形態では、キメラタンパク質は、持続的な免疫調節効果を提供することが可能である。

【0045】

実施形態では、リンカーは、柔軟なアミノ酸配列、IgGヒンジ領域、及び抗体配列から選択されるポリペプチドである。

【0046】

実施形態では、リンカーは、ジスルフィド結合を形成することが可能である少なくとも1つのシステイン残基を含み、及び／または、例えば、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来するヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインを含む。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0047】

本発明の別の態様は、（a）CD80リガンド／受容体と結合することが可能であるCD80の一部を含む、第1のドメインと、（b）NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、（c）第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。実施形態では、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少な

10

20

30

40

50

くとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0048】

本発明のさらに別の態様は、(a) CD86リガンド／受容体と結合することが可能であるCD86の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。実施形態では、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

10

【0049】

一態様において、本発明は、(a) CD48リガンド／受容体と結合することが可能であるCD48の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。実施形態では、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

20

【0050】

別の態様において、本発明は、(a) CD58リガンド／受容体と結合することが可能であるCD58の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。実施形態では、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0051】

さらに別の態様において、本発明は、(a) PD-1リガンドと結合することが可能であるPD-1の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。実施形態では、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

40

【0052】

本発明の一態様は、(a) SLAMF6リガンド／受容体と結合することが可能であるSLAMF6の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む、リンカーと、を

50

含む、キメラタンパク質である。実施形態では、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0053】

本発明の一態様は、(a) SIRPαリガンド／受容体と結合することが可能であるSIRPαの一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質を提供する。実施形態では、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

10

【0054】

本発明の別の態様は、(a) TGFBR2リガンドと結合することが可能であるTGFBR2の一部を含む、第1のドメインと、(b) NKG2Aリガンドと結合することが可能であるNKG2Aの一部を含む、第2のドメインと、(c) 第1のドメイン及び第2のドメインを連結し、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインを含む、リンカーと、を含む、キメラタンパク質である。実施形態では、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

20

【0055】

実施形態では、ヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、またはIgEに由来する。実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から選択され、IgAは、IgA1及びIgA2から選択される。実施形態では、IgGは、IgG4、例えば、ヒトIgG4である。実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0056】

本発明のキメラタンパク質では、キメラタンパク質は、組換え融合タンパク質、例えば、本明細書に開示される細胞外ドメインを有する単一のポリペプチドである。例えば、実施形態では、キメラタンパク質は、原核細胞、真核細胞、または無細胞発現系において単一の単位として翻訳される。

40

【0057】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、分泌可能及び完全な機能性単一ポリペプチド鎖として哺乳動物宿主細胞において生成可能である。

【0058】

実施形態では、キメラタンパク質は、複数のポリペプチド、例えば、本明細書に開示される複数の細胞外ドメインの組換えタンパク質を指し、それらを組み合わせて（共有または非共有結合を介して）、例えば、インビトロで単一の単位（例えば、本明細書に開示される1つ以上の合成リンカーとともに）を生成する。

【0059】

実施形態では、キメラタンパク質は、1つのポリペプチドとして化学的に合成されるか、

50

または各ドメインは、別々に化学的に合成され、次いで組み合わされ得る。実施形態では、キメラタンパク質の一部が翻訳され、一部が化学的に合成される。

【0060】

第1及び第2のドメインの他の構成、例えば、第1のドメインが外向きであり、かつ第2のドメインが内向きであること、第1のドメインが内向きであり、かつ第2のドメインが外向きであること、第1及び第2のドメインが両方とも内向きであることが想定される。両方のドメインが「内向き」である場合、キメラタンパク質は、II型タンパク質の細胞外ドメインの一部、またはアミノアンカー細胞外タンパク質の一部と、リンカーと、I型タンパク質の細胞外ドメインの一部、またはカルボキシアンカー細胞外タンパク質の一部と、を含む、アミノ末端からカルボキシ末端への構成を有するであろう。かかる構成では、キメラタンパク質のドメインがその受容体／リガンドの一方または両方と結合することを可能にするために、本明細書の他の場所に記載されるように、キメラタンパク質が余分な「緩み」を含むことが必要であり得る。

10

【0061】

本発明のキメラタンパク質は、そのリガンド／受容体と立体的に結合することが可能である第1のドメイン、及び／またはそのリガンド／受容体と立体的に結合することが可能である第2のドメインを有する。これは、細胞外ドメインのリガンド／受容体結合ドメインがそのリガンド／受容体の結合を立体的に妨げられないように、キメラタンパク質及び／または細胞外ドメイン（またはその一部）と残りのキメラタンパク質との間の物理的距離に十分な全体的な柔軟性があることを意味する。この柔軟性及び／または物理的距離（本明細書では「緩み」と称される）は通常、細胞外ドメイン（複数可）に存在し、通常はリンカーに存在し、及び／または通常はキメラタンパク質に（全体として）存在し得る。代替的にまたは追加的に、キメラタンパク質は、立体障害を回避するために必要な追加の緩みを提供する1つ以上の追加のアミノ酸配列（例えば、以下に記載される結合リンカー）または合成リンカー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー）を含むことによって修飾され得る。

20

【0062】

NKG2Aタンパク質は、ナチュラルキラー（NK）細胞において優先的に発現される膜貫通タンパク質群であるNKG2ファミリーとも呼ばれるキラー細胞レクチン様受容体ファミリーに属する。このタンパク質ファミリーは、II型膜の配向及びC型レクチンドメインの存在によって特徴付けられる。このタンパク質は、別のファミリーメンバーであるKLRD1／CD94と複合体を形成し、NK細胞におけるMHCクラスIのHLA-E分子の認識に関与している。

30

【0063】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、NKG2Aの細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、NKG2Aの既知のアミノ酸配列、例えば、ヒトNKG2Aと少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

40

50

【0064】

実施形態では、ヒトNKG2Aの細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

PSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYI
GKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSS
WIGVFRNSSSHHPWVTMNGLA FKHEIKDSDNAELNCAVLQV
NRLKSAQCGSSIIYHCKHKL（配列番号57）。

【0065】

実施形態では、キメラタンパク質は、NKG2Aの細胞外ドメインのバリエーションを含む。

例として、バリエーションは、配列番号57と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

【0066】

実施形態では、キメラタンパク質の第2のドメインは、配列番号57のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0067】

実施形態では、NKG2Aの細胞外ドメインの一部は、配列番号57のトランケーションである。しかしながら、トランケーションは、NKG2Aリガンド、例えば、HLA-Eと結合する能力を保持する。

【0068】

当業者は、文献、例えば、Houchins et al., “DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells” J. Exp. Med. 173 (4), 1017-1020 (1991)、Sullivan et al., “The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition” Immunity 27 (6), 900-911 (2007)、Petrie et al., “CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence.” J. Exp. Med. 205 (3), 725-735 (2008)、及びKaiser et al., “Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E.” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (18), 6696-6701 (2008)を参照することにより、NKG2Aの既知のアミノ酸配列のバリエーションを選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0069】

CD80は、CD28または細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）の

結合によって活性化される膜受容体である。活性化されたタンパク質は、T細胞増殖及びサイトカイン産生を誘導する。CD80は、アデノウイルスサブグループBの受容体として作用することができ、ループス神経障害において役割を果たし得る。

【0070】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD80の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、CD80の既知のアミノ酸配列、例えば、ヒトCD80と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

10

20

【0071】

実施形態では、ヒトCD80の細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

V I H V T K E V K E V A T L S C G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q K E K K M V L
T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D I T N N L S I V I L A L R P S D E G T Y
E C V V L K Y E K D A F K R E H L A E V T L S V K A D F P T P S I S D F E I P T
S N I R R I I C S T S G G F P E P H L S W L E N G E E L N A I N T T V S Q D P E
T E L Y A V S S K L D F N M T T N H S F M C L I K Y G H L R V N Q T F N W N T T
K Q E H F P D N（配列番号59）。

【0072】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD80の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号59と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

30

40

【0073】

実施形態では、キメラタンパク質の第1のドメインは、配列番号59のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0074】

実施形態では、CD80の細胞外ドメインの一部は、配列番号59のトランケーションである。しかしながら、トランケーションは、CD80リガンド／受容体、例えば、CTL

50

A-4及びCD28と結合する能力を保持する。

【0075】

当業者は、文献、例えば、Freeman et al., "B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells." J. Immunol. 143 (8), 2714-2722 (1989)、Freeman et al., "Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7." J. Exp. Med. 174 (3), 625-631 (1991)、Lanier et al., "CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL." J. Immunol. 154 (1), 97-105 (1995)、Vandenborre et al., "Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation." Immunology 98 (3), 413-421 (1999)、Ikemizu et al., "Structure and dimerization of a soluble form of B7-1." Immunity 12 (1), 51-60 (2000)、及びStamper et al., "Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses." Nature 410 (6828), 608-611 (2001)を参照することにより、CD80の既知のアミノ酸配列のバリエーションを選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0076】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1)配列番号59のアミノ酸配列を含む第1のドメイン、(b)配列番号57のアミノ酸配列を含む第2のドメイン、及び(c)配列番号1、配列番号2、または配列番号3と少なくとも95%同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

【0077】

実施形態では、本発明のCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL
TMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPT
SNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPE
TELYAVSSKLD FNM TTNH S F M C L I K Y G H L R V N Q T F N W N T T
KQEHFPDNSKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDQL
MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL SGKEYKCKVSSSKGLPSS
IEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSLGLGKIEGR
MDPSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCY
YIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISP
SSWIGVFRNSSHHPWVTMNGLA FKHEIKDSDNAELNCAVL
QVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL (配列番号61)。

【0078】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号61と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

10

20

30

40

50

【0079】

CD86は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであるI型膜タンパク質である。このタンパク質は抗原提示細胞によって発現され、T細胞の細胞表面にある2つのタンパク質、CD28抗原及び細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）のリガンドである。CD86とCD28抗原との結合は、T細胞の活性化のための共刺激シグナルである。CD86とCTLA-4との結合は、T細胞活性化を負に調節し、免疫応答を減少させる。

【0080】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD86の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、CD86の既知のアミノ酸配列、例えば、ヒトCD86と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

【0081】

実施形態では、ヒトCD86の細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

APLKIQAYFNETADLP CQFANSQ NQSLSELVVFWDQENL
VLNEVYLGKEKFDSVHSKYMGRTS FDS DSWTLRLHNLQIK
DKGLYQCI IHHKKPTGMIRI HQMNSEL SVLANFSQPEIVP
ISNITENVYINLTCS SIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYD
GVMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVT SNMTIFCILETD
KTRL LSSPFSIELED P Q P P P D H I P（配列番号63）。

【0082】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD86の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号63と少なくとも約60%、または少なくとも約61%

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

10

【0083】

実施形態では、キメラタンパク質の第1のドメインは、配列番号63のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0084】

実施形態では、CD86の細胞外ドメインの一部は、配列番号63のランケーションである。しかしながら、ランケーションは、CD86リガンド／受容体、例えば、CTLA-4及びCD28と結合する能力を保持する。

20

【0085】

当業者は、文献、例えば、Azuma et al., "B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28" *Nature* 366 (6450), 76-79 (1993)、Freeman et al., "Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation." *Science* 262 (5135), 909-911 (1993)、Lanier et al., "CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL." *J. Immunol.* 154 (1), 97-105 (1995)、Engel et al., "The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen." *Blood* 84 (5), 1402-1407 (1994)、Schwartz et al., "Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex." *Nature* 410 (6828), 604-608 (2001)、及びZhang et al., "Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: insights into organization and signaling." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (5), 2586-2591 (2003)を参照することにより、CD86の既知のアミノ酸配列のバリエーションを選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

30

40

【0086】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1)配列番号63のアミノ酸配列を含む第1のドメイン、(b)配列番号57のアミノ酸配列を含む第2のドメイン、及び(c)配列番号1、配列番号2、または配列番号3と少なくとも95%同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

50

【0087】

実施形態では、本発明のCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

APLKIQAYFNETADLP CQFANSQNQSLSELVVFWQDQENL
VLNEVYLGKEKFDSVHSKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIK
DKGLYQCIHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPEIVP
ISNITENVYINLTCS SIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYD
GVMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETD
KTRLLSSPFSIELEDPPPPDHIPSKYGP C P C P A P E F L
GGPSVFLFPKPKDKQLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLS
GKEYKCKVSSKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNH
YTQKSLSLSLGKIEGRMDPSTLIQRHNNSSLNTRTQKARH
CGHCPEEWITYSNSCY YIGKERRTWEESLLACTSKNSSLL
SIDNEEEMKFLSII SPSSWIGVFRNSSSHHPWVTMNGLAFK
HEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKHL (配
列番号65)。

10

【0088】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号65と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

20

30

【0089】

CD58は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。コードされたタンパク質は、Tリンパ球CD2タンパク質のリガンドであり、Tリンパ球の接着及び活性化に機能する。

【0090】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD58の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、CD58の既知のアミノ酸配列、例えば、ヒトCD58と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約8

40

50

4 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または少なくとも約 87 %、または少なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を有し得る。

【0091】

実施形態では、ヒト CD58 の細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKQKDKVAELEN
SEFRAFFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEMESP
NITDTMKFFLYVLES LPSPTLTCA LTNGSIEVQCMIP EHY
NSHRGLIMYSWDCPMEQCKRNSTSIYFKMENDLPQKIQC
T LSNPLFNTTSSIIILTTCIPSSGHSRHR (配列番号 67)。

10

【0092】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD58 の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号 67 と少なくとも約 60 %、または少なくとも約 61 %、または少なくとも約 62 %、または少なくとも約 63 %、または少なくとも約 64 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 66 %、または少なくとも約 67 %、または少なくとも約 68 %、または少なくとも約 69 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 71 %、または少なくとも約 72 %、または少なくとも約 73 %、または少なくとも約 74 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 76 %、または少なくとも約 77 %、または少なくとも約 78 %、または少なくとも約 79 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 81 %、または少なくとも約 82 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 84 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または少なくとも約 87 %、または少なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を有し得る。

20

【0093】

実施形態では、キメラタンパク質の第 1 のドメインは、配列番号 67 のアミノ酸配列と少なくとも約 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0094】

実施形態では、CD58 の細胞外ドメインの一部は、配列番号 67 のトランケーションである。しかしながら、トランケーションは、CD58 リガンド／受容体、例えば、CD2 と結合する能力を保持する。

【0095】

当業者は、文献、例えば、Wallner et al., "Primary structure of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3). The ligand of the T lymphocyte CD2 glycoprotein." J. Exp. Med. 166 (4), 923-932 (1987)、Omaetxebarria et al., "Computational approach for identification and characterization of GPI-anchored peptides in proteomics experiments." Proteomics 7 (12), 1951-1960 (2007)、Wang et al., "Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors." Cell 97 (6), 791-803 (1999)、及び Ikemizu et al., "Crystal structure o

40

50

f the CD2-binding domain of CD58 (lymphocyte function-associated antigen 3) at 1.8-Å resolution." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (8), 4289-4294 (1999)を参照することにより、CD58の既知のアミノ酸配列のバリエーションを選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0096】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1)配列番号67のアミノ酸配列を含む第1のドメイン、(b)配列番号57のアミノ酸配列を含む第2のドメイン、及び(c)配列番号1、配列番号2、または配列番号3と少なくとも95%同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

10

【0097】

実施形態では、本発明のCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

F S Q Q I Y G V V Y G N V T F H V P S N V P L K E V L W K K Q K D K V A E L E N
S E F R A F S S F K N R V Y L D T V S G S L T I Y N L T S S D E D E Y E M E S P
N I T D T M K F F L Y V L E S L P S P T L T C A L T N G S I E V Q C M I P E H Y
N S H R G L I M Y S W D C P M E Q C K R N S T S I Y F K M E N D L P Q K I Q C T
L S N P L F N T T S S I I L T T C I P S S G H S R H R S K Y G P P C P P C P A P
E F L G G P S V F L F P P K P K D Q L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E
V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D
W L S G K E Y K C K V S S K G L P S S I E K T I S N A T G Q P R E P Q V Y T L P
P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K
T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V L H E A L
H N H Y T Q K S L S L S L G K I E G R M D P S T L I Q R H N N S S L N T R T Q K
A R H C G H C P E E W I T Y S N S C Y Y I G K E R R T W E E S L L A C T S K N S
S L L S I D N E E E M K F L S I I S P S S W I G V F R N S S H H P W V T M N G L
A F K H E I K D S D N A E L N C A V L Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C K H K
L (配列番号68)。

20

【0098】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号68と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

30

40

【0099】

PD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面膜タンパク質である。このタンパク質は、プロB細胞で発現し、それらの分化に役割を果たしていると考えられている。マウスにおいて、PD-1発現は、抗CD3抗体が注入され、大量の胸腺細胞がアポトーシスを受けるときに胸腺において誘導される。BALB/cバックグラウンドで繁殖し

50

たその遺伝子が欠損したマウスは、拡張型心筋症を発症し、うっ血性心不全により死亡した。これらの研究は、PD-1がT細胞機能においても重要であり、自己免疫疾患の予防に貢献する可能性があることを示唆している。

【0100】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、PD-1の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、PD-1の既知のアミノ酸配列、例えば、ヒトPD-1と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

10

20

【0101】

実施形態では、ヒトPD-1の細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

L D S P D R P W N P P T F S P A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V
L N W Y R M S P S N Q T D K L A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L P N G R
D F H M S V V R A R R N D S G T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V
T E R R A E V P T A H P S P S P R P A G Q F Q (配列番号69)。

【0102】

実施形態では、キメラタンパク質は、PD-1の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号69と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

30

40

【0103】

実施形態では、キメラタンパク質の第1のドメインは、配列番号69のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0104】

実施形態では、PD-1の細胞外ドメインの一部は、配列番号69のトランケーションである。しかしながら、トランケーションは、PD-1リガンド、例えば、PD-L1及びPD-L2と結合する能力を保持する。

【0105】

50

当業者は、文献、例えば、Zhang et al "Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1" Immunity. 2004 Mar; 20 (3) : 337-47、Lin et al "The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors", Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 26; 105 (8) : 3011-6、Zak et al "Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1", Structure. 2015 Dec 1; 23 (12) : 2341-2348、及び Cheng et al "Structure and Interactions of the Human Programmed Cell Death 1 Receptor", J Biol Chem. 2013 Apr 26; 288 (17) : 11771-85を参照することにより、PD-1の既知のアミノ酸配列のバリエーションを選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

10

【0106】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1) 配列番号69のアミノ酸配列を含む第1のドメイン、(b) 配列番号57のアミノ酸配列を含む第2のドメイン、及び(c) 配列番号1、配列番号2、または配列番号3と少なくとも95%同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

20

【0107】

実施形態では、本発明のPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

LDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFV
LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR
DFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQSKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSG
KEYKCKVSSKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHY
TQKSLSLSLGLKIEGRMDPSTLIQRHNNSSLNTRRTQKARHC
GHCPEEWITYSNSCYIYIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLS
IDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSSHHPWVTMNGLAFAKH
EIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL (配列
番号71)。

30

【0108】

実施形態では、キメラタンパク質は、PD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号71と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%

40

50

、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を有し得る。

【0109】

SLAMF6 は、I 型膜貫通タンパク質であり、免疫グロブリンスーパーファミリーの CD2 サブファミリーに属する。SLAMF6 は、ナチュラルキラー（NK）、T、及び B リンパ球に発現する。SLAMF6 は、チロシンリン酸化を受け、Src ホモロジー 2 ドメイン含有タンパク質（SH2D1A）、及び SH2 ドメイン含有ホスファターゼ（SHIP）と会合する。SLAMF6 は、NK 細胞活性化の過程でコアセプターとして機能する。これはまた、X 連結リンパ増殖性患者からの NK 細胞における阻害シグナルを媒介することができる。

10

【0110】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、SLAMF6 の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、SLAMF6 の既知のアミノ酸配列、例えば、ヒト SLAMF6 と少なくとも約 60 %、または少なくとも約 61 %、または少なくとも約 62 %、または少なくとも約 63 %、または少なくとも約 64 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 66 %、または少なくとも約 67 %、または少なくとも約 68 %、または少なくとも約 69 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 71 %、または少なくとも約 72 %、または少なくとも約 73 %、または少なくとも約 74 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 76 %、または少なくとも約 77 %、または少なくとも約 78 %、または少なくとも約 79 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 81 %、または少なくとも約 82 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 84 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または少なくとも約 87 %、または少なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を有し得る。

20

【0111】

実施形態では、ヒト SLAMF6 の細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

QSSLTPLMVNGILGESVTLPLEFPAGEKVNFIITWLFNETSLAFIVPHETKSP EIHVTNPKQGKRLNFTQSYSLQLSNLKMEDTGSYRAQISTKTS AKLSSSYTLRI LRQLRNIQVTNHSQLFQNMTC ELHLTCSVEDADDNV SFRWEALGNTLSSSQPNLTVSWDPRISSEQDYTCIAENAVSNLSFSVSAQKLCEDVKIQYTDTKM（配列番号 73）。

30

【0112】

実施形態では、キメラタンパク質は、SLAMF6 の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号 73 と少なくとも約 60 %、または少なくとも約 61 %、または少なくとも約 62 %、または少なくとも約 63 %、または少なくとも約 64 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 66 %、または少なくとも約 67 %、または少なくとも約 68 %、または少なくとも約 69 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 71 %、または少なくとも約 72 %、または少なくとも約 73 %、または少なくとも約 74 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 76 %、または少なくとも約 77 %、または少なくとも約 78 %、または少なくとも約 79 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 81 %、または少なくとも約 82 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 84 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または少なくとも約 87 %、または少なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも

40

50

も約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%の配列同一性を有し得る。

【0113】

実施形態では、キメラタンパク質の第1のドメインは、配列番号73のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0114】

実施形態では、SLAMF6の細胞外ドメインの一部は、配列番号73のトランケーションである。しかしながら、トランケーションは、SLAMF6リガンド、例えば、SAP及びEAT2と結合する能力を保持する。

【0115】

当業者は、文献、例えば、Bottino et al., “NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease.” J. Exp. Med. 194 (3), 235-246 (2001)、Eissmann et al., “Molecular analysis of NTB-A signaling: a role for EAT-2 in NTB-A-mediated activation of human NK cells.” J. Immunol. 177 (5), 3170-3177 (2006)、Mayya et al., “Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions.” Sci Signal 2 (84), ra46 (2009)、及びCao et al., “NTB-A receptor crystal structure: insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family.” Immunity 25 (4), 559-570 (2006)を参照することにより、SLAMF6の既知のアミノ酸配列の変異体を選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0116】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1)配列番号73のアミノ酸配列を含む第1のドメイン、(b)配列番号57のアミノ酸配列を含む第2のドメイン、及び(c)配列番号1、配列番号2、または配列番号3と少なくとも95%同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

【0117】

実施形態では、本発明のSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

QSSLTPLMVNGILGESVTLPLEFPAGEKVNFITWLFNETS
LAFIVPHETKSP EIHVTNP KQGKRLNFTQS YSLQLSNLKM
EDTGSYRAQISTKTS AKLSSYT LRI LRQLRNIQVTNHSQL
FQNMTC ELHLTCSVEDADDNV SFRWEALGNTLSSQP NLTV
SWDPRISSEQDYTCIAENAVSNLSFSVSAQKLCEDVKIQY
TDTKMSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDQLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEK
TISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDK

SRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSLGKIEGRMDP
STLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIIG
KERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSW
IGVFRNSSSHHPWVTMNGLAFFKHEIKDSDNAELNCAVLQVN
RLKSAQCGSSIIYHCKHKL (配列番号75)。

【0118】

実施形態では、キメラタンパク質は、SLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号75と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

10

20

【0119】

CD172aまたはSHP基質1 (SHPs-1) としても知られているシグナル制御タンパク質α (SIRPα) は、I型膜貫通タンパク質である。SIRPαは、IgVドメインを保有する免疫受容体として確立される。SIRPαは、ナチュラルキラー (NK)、単球、顆粒球、樹状細胞及び造血幹細胞、骨髄系幹細胞ならびにニューロンに発現する。SIRPαは、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼシグナル伝達及びマイトジェン活性化プロテインキナーゼ経路の負の調節因子である。ほぼすべての細胞型で発現される膜タンパク質であるCD47は、SIRPαの機能を調節する。CD47のIgドメインとSIRPαのN末端Igドメインとの結合は、経細胞双方向性シグナル伝達を媒介するのに十分であると考えられる。SIRPαのCD47への結合は、SIRPαの細胞質領域のチロシンリン酸化を促進する。次に、タンパク質チロシンホスファターゼSHP-2 (チロシン-タンパク質ホスファターゼ非受容体II型としても知られている) は、SIRPαの細胞質領域に結合して、その基質を脱リン酸化することによって、SIRPαの負のシグナル伝達調節機能を媒介する。最適なヒトT細胞及びナチュラルキラー (NK) 細胞の恒常性には、機能的CD47/SIRPα相互作用が必要である。

30

【0120】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、SIRPαの細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、SIRPαの既知のアミノ酸配列、例えば、ヒトSIRPαと少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約9

40

50

3%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

【0121】

実施形態では、SIRP α の細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFR
GAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGN
ITPADAGTYCYVKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSVRAKPSA
PVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNE
LSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTREDVHSQVICEV
AHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVN
VTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTY
NWM SWLLVNVSAHRDDVKLT CQVEHDGQPAVSKSHDLKVS
AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIY（配列番号85）。

10

【0122】

実施形態では、キメラタンパク質は、SIRP α の細胞外ドメインのバリエーションを含む。

例として、バリエーションは、配列番号73と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

20

30

【0123】

実施形態では、キメラタンパク質の第1のドメインは、配列番号85のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0124】

実施形態では、SIRP α の細胞外ドメインの一部は、配列番号85のトランケーションである。しかしながら、トランケーションは、SIRP α リガンド、例えば、CD47と結合する能力を保持する。

【0125】

当業者は、文献、例えば、Sano et al., "Gene structure of mouse BIT/SHPS-1." Biochem J. 344 Pt 3:667-75 (1999)、Ho et al., "'Velcro' engineering of high affinity CD47 ectodomain as signal regulatory protein α (SIRP α) antagonist that enhance antibody-dependent cellular phagocytosis." J Biol Chem. 290 (20):12650-63. (2015)、Wong et al., "Polymorphism in the innate immune receptor SIRP α controls CD47 binding and autoimmunity in the nonobese diabetic mouse." J Immunol. 193 (10):4833-44 (2014)、Pan et al., "Studying the

40

50

mechanism of CD47-SIRP α interactions on red blood cells by single molecule force spectroscopy." *Nanoscale* 6 (17): 9951-4 (2014)、及び Hatherley et al., "Structure of signal-regulatory protein α : a link to antigen receptor evolution." *J Biol Chem.* 284 (39): 26613-9 (2009) を参照することにより、SIRP α の既知のアミノ酸配列の変異体を選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0126】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1) 配列番号 85 のアミノ酸配列を含む第 1 のドメイン、(b) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む第 2 のドメイン、及び (c) 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

【0127】

実施形態では、本発明の SIRP α -Fc-NKG2A キメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFR
GAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGN
ITPADAGTYCYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSA
PVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNE
LSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICEV
AHVTLQGDPLRG TANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVN
VTCQVRKFFYPQRLQLTWLENGNVSRTE TASTVTENKDGTY
NWM SWLLVNVSAHRDDVKLT CQVEHDGQPAVSKSHDLKVS
AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYSKYGP PCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSG
KEYKCKVSSKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDS DGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHY
TQKSLSLSLGKIEGRMDPSTLIQRHNNSSSLNTRTQKARHC
GHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTWEESLLACTSKNSSLS
IDNEEEMKFLSII SPSSWIGVFRNSSSHHPWVTMNGLA FKH
EIKDSDNAELNCAVLQVNRLLKSAQCGSSIIYHCKHKL (配列
番号 86)。

【0128】

実施形態では、キメラタンパク質は、SIRP α -Fc-NKG2A キメラタンパク質のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号 86 と少なくとも約 60%、または少なくとも約 61%、または少なくとも約 62%、または少なくとも約 63%、または少なくとも約 64%、または少なくとも約 65%、または少なくとも約 66%、または少なくとも約 67%、または少なくとも約 68%、または少なくとも約 69%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 71%、または少なくとも約 72%、または少なくとも約 73%、または少なくとも約 74%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 76%、または少なくとも約 77%、または少なくとも約 78%、または少なくとも約 79%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 81%、または少なくとも約 82%、または少なくとも約 83%、または少なくとも約 84%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 86%、または少なくとも約 87%、または少なくとも約 88%、または少なくとも約 89%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 91%、または少なくとも約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、

または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有し得る。

【0129】

TGFR2 は、タンパク質キナーゼドメインを有し、TGFR 受容体 I 型とヘテロ二量体複合体を形成し、TGFR と結合する膜貫通タンパク質である。この受容体／リガンド複合体は、タンパク質をリン酸化し、タンパク質は次いで核内に入り、細胞増殖、細胞周期停止、創傷治癒、免疫抑制、及び腫瘍形成に関連する遺伝子の転写を調節する。TGFR2 をコードする遺伝子の変異は、マルファン症候群、ロイス・ディーツ大動脈瘤症候群、及び様々な種類の腫瘍の発生と関連付けられている。

【0130】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、TGFR2 の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、TGFR2 の既知のアミノ酸配列、例えば、ヒト TGFR2 と少なくとも約 60%、または少なくとも約 61%、または少なくとも約 62%、または少なくとも約 63%、または少なくとも約 64%、または少なくとも約 65%、または少なくとも約 66%、または少なくとも約 67%、または少なくとも約 68%、または少なくとも約 69%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 71%、または少なくとも約 72%、または少なくとも約 73%、または少なくとも約 74%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 76%、または少なくとも約 77%、または少なくとも約 78%、または少なくとも約 79%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 81%、または少なくとも約 82%、または少なくとも約 83%、または少なくとも約 84%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 86%、または少なくとも約 87%、または少なくとも約 88%、または少なくとも約 89%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 91%、または少なくとも約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有し得る。

【0131】

実施形態では、ヒト TGFR2 の細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列を有する：

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC D VRFSTCD
NQKSCMSNCSITSI CEKPEVCVA VWRKNDENITLET VCH
DPKLPYHDFILEDAASP KCIMKEKKKPGETF FMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD LLLVIFQ (配列番号 77)。

【0132】

実施形態では、キメラタンパク質は、TGFR2 の細胞外ドメインのバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号 77 と少なくとも約 60%、または少なくとも約 61%、または少なくとも約 62%、または少なくとも約 63%、または少なくとも約 64%、または少なくとも約 65%、または少なくとも約 66%、または少なくとも約 67%、または少なくとも約 68%、または少なくとも約 69%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 71%、または少なくとも約 72%、または少なくとも約 73%、または少なくとも約 74%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 76%、または少なくとも約 77%、または少なくとも約 78%、または少なくとも約 79%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 81%、または少なくとも約 82%、または少なくとも約 83%、または少なくとも約 84%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 86%、または少なくとも約 87%、または少なくとも約 88%、または少なくとも約 89%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 91%、または少なくとも約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有し得る。

【0133】

実施形態では、キメラタンパク質の第 1 のドメインは、配列番号 77 のアミノ酸配列と少

なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0134】

実施形態では、TGFB β 2の細胞外ドメインの一部は、配列番号77のランケーションである。しかしながら、ランケーションは、TGFB β 2リガンド、例えば、TGFB β 3またはTGFB β 1と結合する能力を保持する。

【0135】

当業者は、文献、例えば、Lin et al., "Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase." Cell 68 (4), 775-785 (1992)、Daub et al., "Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle." Mol. Cell 31 (3), 438-448 (2008)、Hart et al., "Crystal structure of the human T β 2 ectodomain-TGF- β 3 complex." Nat. Struct. Biol. 9 (3), 203-208 (2002)、Boesen et al., "The 1.1 Å crystal structure of human TGF- β type II receptor ligand binding domain." Structure 10 (7), 913-919 (2002)、Deep et al., "Solution structure and backbone dynamics of the TGF β type II receptor extracellular domain." Biochemistry 42 (34), 10126-10139 (2003)、Groppe et al., "Cooperative assembly of TGF- β superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding." Mol. Cell 29 (2), 157-168 (2008)、及びRadaev et al., "Ternary complex of transforming growth factor- β 1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily." J. Biol. Chem. 285 (19), 14806-14814 (2010)を参照することにより、TGFB β 2の既知のアミノ酸配列のバリエーションを選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

【0136】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1)配列番号77のアミノ酸配列を含む第1のドメイン、(b)配列番号57のアミノ酸配列を含む第2のドメイン、及び(c)配列番号1、配列番号2、または配列番号3と少なくとも95%同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

【0137】

実施形態では、本発明のTGFB β 2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC
DPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQSKYGPCCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
SGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPSQ

E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V L H E A L H N H
Y T Q K S L S L S L G K I E G R M D P S T L I Q R H N N S S L N T R T Q K A R H
C G H C P E E W I T Y S N S C Y Y I G K E R R T W E E S L L A C T S K N S S L L
S I D N E E E M K F L S I I S P S S W I G V F R N S S H H P W V T M N G L A F K
H E I K D S D N A E L N C A V L Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C K H K L (配
列番号 79)。

【0138】

実施形態では、キメラタンパク質は、T G F B R 2 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質
のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号 79 と少なくとも約 60 %、ま
たは少なくとも約 61 %、または少なくとも約 62 %、または少なくとも約 63 %、または
少なくとも約 64 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 66 %、または
少なくとも約 67 %、または少なくとも約 68 %、または少なくとも約 69 %、または少
なくとも約 70 %、または少なくとも約 71 %、または少なくとも約 72 %、または少
なくとも約 73 %、または少なくとも約 74 %、または少なくとも約 75 %、または少
なくとも約 76 %、または少なくとも約 77 %、または少なくとも約 78 %、または少
なくとも約 79 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 81 %、または少
なくとも約 82 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 84 %、または少
なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または少なくとも約 87 %、または少
なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少
なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少
なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少
なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を有し得る。

【0139】

C D 48 は、S L A M (シグナル伝達リンパ球活性化分子) タンパク質を含む免疫グロブ
リン様受容体の C D 2 サブファミリーのメンバーである。C D 48 は、リンパ球及び他の
免疫細胞、樹状細胞及び内皮細胞の表面上に見出され、これらの細胞における活性化及び
分化経路に参与する。C D 48 は、膜貫通ドメインを有しないが、しかしながら、C 末端
ドメインを介して G P I アンカーによって細胞表面に保持され、C 末端ドメインは、切断
されて可溶性形態の受容体を生じ得る。

【0140】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、膜アンカー細胞外タンパク質 C D 48 の一
部のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、C D 48 の既知のアミノ酸配列、例え
ば、ヒト C D 48 と少なくとも約 60 %、または少なくとも約 61 %、または少なくとも
約 62 %、または少なくとも約 63 %、または少なくとも約 64 %、または少なくとも約
65 %、または少なくとも約 66 %、または少なくとも約 67 %、または少なくとも約 6
8 %、または少なくとも約 69 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 71
%、または少なくとも約 72 %、または少なくとも約 73 %、または少なくとも約 74 %
、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 76 %、または少なくとも約 77 %、
または少なくとも約 78 %、または少なくとも約 79 %、または少なくとも約 80 %、ま
たは少なくとも約 81 %、または少なくとも約 82 %、または少なくとも約 83 %、また
は少なくとも約 84 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または
少なくとも約 87 %、または少なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少
なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少
なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少
なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少
なくとも約 99 % の配列同一性を有し得る。

【0141】

実施形態では、膜アンカー細胞外タンパク質ヒト C D 48 は、以下のアミノ酸配列を有す
る：

Q G H L V H M T V V S G S N V T L N I S E S L P E N Y K Q L T W F Y T F D Q K I
V E W D S R K S K Y F E S K F K G R V R L D P Q S G A L Y I S K V Q K E D N S T
Y I M R V L K K T G N E Q E W K I K L Q V L D P V P K P V I K I E K I E D M D D
N C Y L K L S C V I P G E S V N Y T W Y G D K R P F P K E L Q N S V L E T T L M
P H N Y S R C Y T C Q V S N S V S S K N G T V C L S P P C T L A R (配列番号 8 1
)

【0142】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD48のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号81と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有し得る。

10

20

【0143】

実施形態では、キメラタンパク質の第1のドメインは、配列番号81のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0144】

実施形態では、CD48の一部は、配列番号81のトランケーションである。しかしながら、トランケーションは、CD48リガンド／受容体、例えば、CD2及び2B4と結合する能力を保持する。

【0145】

当業者は、文献、例えば、Korinek et al., "The human leucocyte antigen CD48 (MEM-102) is closely related to the activation marker Blast-1" Immunogenetics 33 (2), 108-112 (1991)、Del Porto et al., "TCT. 1, a target molecule for gamma/delta T cells, is encoded by an immunoglobulin superfamily gene (Blast-1) located in the CD1 region of human chromosome 1." J. Exp. Med. 173 (6), 1339-1344 (1991)、Wollscheid et al., "Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins." Nat. Biotechnol. 27 (4), 378-386 (2009)、及びRIKEN structural genomics initiative (RSGI) Submitted AUG 2007を参照することにより、CD48の既知のアミノ酸配列の変異体を選択することができ、これら文献の各々は、その全体が参照により組み込まれる。

30

40

【0146】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、(1) 配列番号81のアミノ酸配列を含む第1のドメイン、(b) 配列番号57のアミノ酸配列を含む第2のドメイン、及び(c)

50

配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列リンカー、を含む。

【0147】

実施形態では、本発明の CD48-Fc-NKG2A キメラタンパク質は、以下のアミノ酸配列を含み得る：

Q G H L V H M T V V S G S N V T L N I S E S L P E N Y K Q L T W F Y T F D Q K I
V E W D S R K S K Y F E S K F K G R V R L D P Q S G A L Y I S K V Q K E D N S T
Y I M R V L K K T G N E Q E W K I K L Q V L D P V P K P V I K I E K I E D M D D
N C Y L K L S C V I P G E S V N Y T W Y G D K R P F P K E L Q N S V L E T T L M
P H N Y S R C Y T C Q V S N S V S S K N G T V C L S P P C T L A R S S K Y G P P
C P P C P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D Q L M I S R T P E V T C V V V D
V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V
L T V L H Q D W L S G K E Y K C K V S S K G L P S S I E K T I S N A T G Q P R E
P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C
S V L H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K I E G R M D P S T L I Q R H N N S S
L N T R T Q K A R H C G H C P E E W I T Y S N S C Y Y I G K E R R T W E E S L L
A C T S K N S S L L S I D N E E E M K F L S I I S P S S W I G V F R N S S H H P
W V T M N G L A F K H E I K D S D N A E L N C A V L Q V N R L K S A Q C G S S I
I Y H C K H K L (配列番号 83)。

10

20

【0148】

実施形態では、キメラタンパク質は、CD48-Fc-NKG2A キメラタンパク質のバリエーションを含む。例として、バリエーションは、配列番号 83 と少なくとも約 60%、または少なくとも約 61%、または少なくとも約 62%、または少なくとも約 63%、または少なくとも約 64%、または少なくとも約 65%、または少なくとも約 66%、または少なくとも約 67%、または少なくとも約 68%、または少なくとも約 69%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 71%、または少なくとも約 72%、または少なくとも約 73%、または少なくとも約 74%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 76%、または少なくとも約 77%、または少なくとも約 78%、または少なくとも約 79%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 81%、または少なくとも約 82%、または少なくとも約 83%、または少なくとも約 84%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 86%、または少なくとも約 87%、または少なくとも約 88%、または少なくとも約 89%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 91%、または少なくとも約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有し得る。

30

【0149】

任意の本明細書に開示される態様及び実施形態では、キメラタンパク質は、本明細書に開示されるタンパク質配列のうちのいずれかと比較して 1 つ以上のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含み得る。実施形態では、1 つ以上のアミノ酸変異は独立して、置換、挿入、欠失、及び短縮から選択され得る。

40

【0150】

実施形態では、アミノ酸変異は、アミノ酸置換であり、保存的及び／または非保存的置換を含み得る。「保存的置換」は、例えば、関与するアミノ酸残基の極性、電荷、サイズ、溶解度、疎水性、親水性、及び／または両親媒性性質の類似性に基づいて行われ得る。20 個の天然に存在するアミノ酸は、以下の 6 つの標準的なアミノ酸グループに分類できる。(1) 疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；Asn、Gln；(3) 酸性：Asp、Glu；(4) 塩基性：His、Lys、Arg；(5) 鎖配向に影響を与える残基：Gly、Pro；及び(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。本明細書で使用される場合、「保存的置換」は、上記の

50

6つの標準的なアミノ酸グループの同じグループ内に列挙される別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。例えば、GluによるAspの交換は、そのように修飾されたポリペプチド内に1つの負電荷を保持する。さらに、グリシン及びプロリンは、 α -ヘリックスを破壊するそれらの能力に基づいて互いに置換され得る。本明細書で使用される場合、「非保存的置換」は、上記の6つの標準的なアミノ酸グループ(1)～(6)の異なるグループに列挙される別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。

【0151】

実施形態では、置換はまた、非古典的なアミノ酸も含み得る(例えば、セレノシステイン、ピロリシン、N-ホルミルメチオニン β -アラニン、GABA及び δ -アミノレブリン酸、4-アミノ安息香酸(PABA)、一般的なアミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシメ、シトルリン、ホモシトルリン、シスチン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸、例えば、 β -メチルアミノ酸、C α -メチルアミノ酸、N α -メチルアミノ酸、及び一般的なアミノ酸類似体)。

10

【0152】

コドン縮重を考慮に入れることを含めて、遺伝暗号を参照することによって、キメラタンパク質のヌクレオチド配列に変異を作製することもできる。

20

【0153】

実施形態では、キメラタンパク質は、ネズミリガンド(複数可)/受容体(複数可)と結合することが可能である。

【0154】

実施形態では、キメラタンパク質は、ヒトリガンド(複数可)/受容体(複数可)と結合することが可能である。

【0155】

実施形態では、キメラタンパク質の各細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)は、約1 nM～約5 nM、例えば、約1 nM、約1.5 nM、約2 nM、約2.5 nM、約3 nM、約3.5 nM、約4 nM、約4.5 nM、または約5 nMのK_Dでその同族の受容体またはリガンドと結合する。実施形態では、キメラタンパク質は、約5 nM～約15 nM、例えば、約5 nM、約5.5 nM、約6 nM、約6.5 nM、約7 nM、約7.5 nM、約8 nM、約8.5 nM、約9 nM、約9.5 nM、約10 nM、約10.5 nM、約11 nM、約11.5 nM、約12 nM、約12.5 nM、約13 nM、約13.5 nM、約14 nM、約14.5 nM、または約15 nMのK_Dで同族の受容体またはリガンドと結合する。

30

【0156】

実施形態では、キメラタンパク質の各細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)は、約1 μ M、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約150 nM、約130 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約55 nM、約50 nM、約45 nM、約40 nM、約35 nM、約30 nM、約25 nM、約20 nM、約15 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満(例えば、表面プラズモン共鳴または生体層干渉法によって測定される)のK_Dでその同族の受容体またはリガンドと結合する。実施形態では、キメラタンパク質は、約1 nM、約900 pM、約800 pM、約700 pM、約600 pM、約500 pM、約400 pM、約300 pM、約200 pM、約100 pM、約90 pM、約80 pM、約70 pM、約60 pM、約55 pM、約50 pM、約45 pM、約40 pM、約35 pM、約30 pM、約25 pM、約20 pM、約15 pM、または約10 pM、または約1 pM未満(例えば、表面プラズモン共鳴または生体層干渉法によって測定される)のK_DでヒトCSF1と結合する。

40

50

【0157】

本明細書で使用される場合、細胞外ドメインのバリエーションは、天然の細胞外ドメインの受容体／リガンドと結合することが可能である。例えば、バリエーションは、その受容体／リガンドとの結合親和性に影響を及ぼさない細胞外ドメインの1つ以上の変異を含み得、代替的に、細胞外ドメインにおける1つ以上の変異は、受容体／リガンドに対する結合親和性を改善し得るか、または細胞外ドメインにおける1つ以上の変異は、受容体／リガンドに対する結合親和性を低下させ得るが、結合を完全に排除しない。実施形態では、1つ以上の変異は、細胞外ドメインがその受容体／リガンドと相互作用する結合ポケットの外側に位置する。実施形態では、1つ以上の変異は、変異が結合を完全に排除しない限り、細胞外ドメインがその受容体／リガンドと相互作用する結合ポケットの内側に位置する。受容体－リガンド結合に関する当業者の知識及び当技術分野の知識に基づいて、どの変異が結合を可能にし、どれが結合を排除するかを理解するであろう。

10

【0158】

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

【0159】

本発明のキメラタンパク質は、2つを超える細胞外ドメインを含み得る。例えば、キメラタンパク質は、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10つ、またはそれ以上の細胞外ドメインを含み得る。本明細書に開示されるように、第2の細胞外ドメインは、リンカーを介して第3の細胞外ドメインから分離され得る。代替的に、第2の細胞外ドメインは、第3の細胞外ドメインと直接的に連結され得る（例えば、ペプチド結合を介して）。実施形態では、本明細書に開示されるように、キメラタンパク質は、直接的に連結される細胞外ドメイン及びリンカーを介して間接的に連結される細胞外ドメインを含む。

20

【0160】

リンカー

実施形態では、キメラタンパク質は、リンカーを含む。

【0161】

実施形態では、リンカーは、ジスルフィド結合を形成することが可能である少なくとも1つのシステイン残基を含む。少なくとも1つのシステイン残基は、キメラタンパク質の1対（またはそれ以上）の間にジスルフィド結合を形成することが可能である。理論に拘束されることを望まないが、かかるジスルフィド結合形成は、キメラタンパク質の有用な多量体状態を維持する原因となる。これは、キメラタンパク質の効率的な生産を可能とし、それは、インビトロ及びインビボで所望される活性を可能とする。

30

【0162】

本発明のキメラタンパク質では、リンカーは、柔軟なアミノ酸配列、IgGヒンジ領域、及び抗体配列から選択されるポリペプチドである。

【0163】

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

40

【0164】

実施形態では、リンカーは、ポリペプチドを含む。実施形態では、ポリペプチドは、約500アミノ酸長、約450アミノ酸長、約400アミノ酸長、約350アミノ酸長、約300アミノ酸長、約250アミノ酸長、約200アミノ酸長、約150アミノ酸長、また

50

は約100アミノ酸長未満である。例えば、リンカーは、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、または約2アミノ酸長未満であり得る。

【0165】

実施形態では、リンカーは、柔軟性である。

【0166】

実施形態では、リンカーは、剛性である。

【0167】

実施形態では、リンカーは、グリシン及びセリン残基から実質的になる（例えば、約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%、または約95%、または約97%、または約98%、または約99%、または約100%のグリシン及びセリン）。

【0168】

実施形態では、リンカーは、抗体のヒンジ領域（例えば、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4、ならびにIgA1、及びIgA2）を含むIgG、IgA、IgD、及びIgE）を含む。IgG、IgA、IgD、及びIgEクラス抗体に見られるヒンジ領域は、柔軟なスペーサーとして機能し、Fab部分が空間内を自由に移動することを可能とする。定常領域とは対照的に、ヒンジドメインは、構造的に多様であり、免疫グロブリンクラス及びサブクラス間で配列及び長さの両方が異なる。例えば、ヒンジ領域の長さ及び柔軟性は、IgGサブクラス間で異なる。IgG1のヒンジ領域はアミノ酸216～231を包括し、自由に柔軟であるため、Fab断片はその対称軸を中心に回転し、2つの重鎖間ジスルフィド架橋の第1の中心にある球内を移動できる。IgG2は、IgG1よりも短いヒンジを有し、12個のアミノ酸残基及び4個のジスルフィド架橋を有する。IgG2のヒンジ領域は、グリシン残基を欠いており、比較的短く、余分な重鎖間ジスルフィド架橋によって安定化された剛性のポリプロリン二重らせんを含む。これらの特性は、IgG2分子の柔軟性を制限する。IgG3は、62個のアミノ酸（21個のプロリン及び11個のシステインを含む）を含み、柔軟性がないポリプロリン二重らせんを形成する、その固有の拡張ヒンジ領域（IgG1ヒンジの約4倍の長さ）が他のサブクラスと異なる。IgG3では、Fab断片は、Fc断片から比較的離れているため、分子の柔軟性が高まる。IgG3における細長いヒンジは、他のサブクラスと比較してその高分子量の原因でもある。IgG4のヒンジ領域は、IgG1よりも短く、その柔軟性は、IgG1及びIgG2の間である。ヒンジ領域の柔軟性は、IgG3>IgG1>IgG4>IgG2の順に減少すると報告されている。実施形態では、リンカーは、ヒトIgG4に由来し、二量体形成（S228Pを含む）またはFcRn結合を増強するための1つ以上の変異を含み得る。

【0169】

結晶学的研究によると、免疫グロブリンヒンジ領域は、機能的に、上部ヒンジ領域、コア領域、及び下部ヒンジ領域の3つの領域にさらに細分することができる。Shin et al., 1992 Immunological Reviews 130:87を参照されたい。上部ヒンジ領域には、CH1のカルボキシル末端から、動きを制限するヒンジにおける第1の残基、通常は2つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合を形成する第1のシステイン残基までのアミノ酸が含まれる。上部ヒンジ領域の長さは、抗体のセグメントの柔軟性と相関する。コアヒンジ領域には、重鎖間ジスルフィド架橋が含まれ、下部ヒンジ領域には、CH2ドメインのアミノ末端と結合し、CH2の残基が含まれる。Id。野生型ヒトIgG1のコアヒンジ領域は、配列CPPC（配列番号24）を含み、これは、ジスルフィド結合形成によって二量体化されると、回転軸として作用すると考えられる環状オクタペプチドをもたらし、したがって柔軟性が与えられる。実施形態では、本発明のリンカーは、任意の抗体の上部ヒンジ領域、コア領域、及び下部ヒンジ領域（例えば、サブク

10

20

30

40

50

ラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4、ならびにI g A 1、及びI g A 2）を含むI g G、I g A、I g D、及びI g E）のうちの1つ、2つ、または3つを含む。ヒンジ領域はまた、1つ以上のグリコシル化部位を含み得、これは、炭水化物付着のためのいくつかの構造的に異なる種類の部位を含む。例えば、I g A 1は、ヒンジ領域の17個のアミノ酸セグメント内に5つのグリコシル化部位を含み、分泌型免疫グロブリンにとって有利な特性と考えられる、腸のプロテアーゼに対するヒンジ領域ポリペプチドの抵抗性を付与する。実施形態では、本発明のリンカーは、1つ以上のグリコシル化部位を含む。

【0170】

実施形態では、リンカーは、抗体のFcドメイン（例えば、サブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4、ならびにI g A 1、及びI g A 2）を含むI g G、I g A、I g D、及びI g E）を含む。

10

【0171】

本発明のキメラタンパク質では、リンカーは、I g G 4に由来するヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。実施形態では、リンカーは、ヒトI g G 4に由来するヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。実施形態では、リンカーは、配列番号1～配列番号3のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%同一である、例えば、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、リンカーは、1つ以上の結合リンカーを含み、かかる結合リンカーは独立して、配列番号4～配列番号50（またはそれらのバリエーション）から選択される。実施形態では、リンカーは、2つ以上の結合リンカーを含み、各結合リンカーは独立して、配列番号4～配列番号50（またはそれらのバリエーション）から選択され、一方の結合リンカーは、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインに対してN末端であり、他方の結合リンカーは、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインに対してC末端である。

20

【0172】

実施形態では、リンカーは、ヒトI g G 1抗体に由来するヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。実施形態では、Fcドメインは、新生児Fc受容体（FcRn）に対して増加した親和性及び増強した結合を示す。実施形態では、Fcドメインは、親和性を増加させ、FcRnとの結合を増強する1つ以上の変異を含む。理論に拘束されることを望まないが、FcRnとの増加した親和性及び増強した結合は、本発明のキメラタンパク質のインビボでの半減期を増加させると考えられる。

30

【0173】

実施形態では、リンカーにおけるFcドメインは、アミノ酸残基250、252、254、256、308、309、311、416、428、433、もしくは434（参照により本明細書に明示的に組み込まれる、Kabata, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)の場合と同様に、Kabataの番号付けに従って）、またはそれらの同等物での1つ以上のアミノ酸置換を含む。実施形態では、アミノ酸残基250でのアミノ酸置換は、グルタミンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基252でのアミノ酸置換は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、またはスレオニンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基254でのアミノ酸置換は、スレオニンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基256でのアミノ酸置換は、セリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはスレオニンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基308でのアミノ酸置換は、スレオニンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基309でのアミノ酸置換は、プロリンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基311でのアミノ酸置換は、セリンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基385でのアミノ酸置換は、アルギニン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、ヒスチジン、リジン、アラニン、またはグリシンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基386で

40

50

のアミノ酸置換は、スレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リジン、アルギニン、イソロイシン、またはメチオニンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基 387 でのアミノ酸置換は、アルギニン、プロリン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、またはアラニンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基 389 でのアミノ酸置換は、プロリン、セリン、またはアスパラギンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基 416 でのアミノ酸置換は、セリンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基 428 でのアミノ酸置換は、ロイシンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基 433 でのアミノ酸置換は、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリン、またはグルタミンによる置換である。実施形態では、アミノ酸残基 434 でのアミノ酸置換は、ヒスチジン、フェニルアラニン、またはチロシンによる置換である。

10

【0174】

実施形態では、Fcドメインリンカー（例えば、IgG定常領域を含む）は、アミノ酸残基 252、254、256、433、434、または436（参照により本明細書に明示的に組み込まれる、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) の場合と同様に、Kabat の番号付けに従って）での1つ以上の変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、トリプルM252Y/S254T/T256E変異またはYTE変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、トリプルH433K/N434F/Y436H変異またはKFH変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、YTE及びKFH変異の組み合わせを含む。

20

【0175】

実施形態では、リンカーは、アミノ酸残基 250、253、307、310、380、428、433、434、及び435（参照により本明細書に明示的に組み込まれる、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) の場合と同様に、Kabat の番号付けに従って）での1つ以上の変異を含むIgG定常領域を含む。例示的な変異には、T250Q、M428L、T307A、E380A、I253A、H310A、M428L、H433K、N434A、N434F、N434S、及びH435Aが含まれる。実施形態では、IgG定常領域は、M428L/N434S変異またはLS変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、T250Q/M428L変異またはQL変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、N434A変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、T307A/E380A/N434A変異またはAAA変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、I253A/H310A/H435A変異またはIHH変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、H433K/N434F変異を含む。実施形態では、IgG定常領域は、M252Y/S254T/T256E及びH433K/N434F変異の組み合わせを含む。

30

40

【0176】

IgG定常領域における追加の例示的な変異は、例えば、Robbie, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2013), 57(12):6147-6153、Dall'Acqua et al., JBC (2006), 281(33):23514-24、Dall'Acqua et al., Journal of Immunology (2002), 169:5171-80、Ko et al. Nature (2014) 514:642-645、Greys et al. Journal of Immunology. (2015), 194(11):5497-508、及び米国特許第7,083,784号に記載されており、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0177】

例示的なFc安定化変異体は、S228Pである。例示的なFc半減期延長変異体は、T250Q、M428L、V308T、L309P、及びQ311Sであり、本発明のリンカーは、これらの変異体の1つ、2つ、3つ、4つ、または5つを含み得る。

【0178】

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

【0179】

実施形態では、リンカーにおけるFcドメインは、配列番号1（以下の表1を参照されたい）、またはそれと少なくとも90%、または93%、または95%、または97%、または98%、または99%同一性のアミノ酸配列を有する。実施形態では、変異は、安定性及び／または半減期を増加させるために、配列番号1に対して作製される。例えば、実施形態では、リンカーにおけるFcドメインは、配列番号2（以下の表1を参照されたい）、またはそれと少なくとも90%、または93%、または95%、または97%、または98%、または99%同一性のアミノ酸配列を含む。例えば、実施形態では、リンカーにおけるFcドメインは、配列番号3（以下の表1を参照されたい）、またはそれと少なくとも90%、または93%、または95%、または97%、または98%、または99%同一性のアミノ酸配列を含む。

【0180】

さらに、1つ以上の結合リンカーは、リンカーにおけるFcドメイン（例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、またはそれと少なくとも90%、または93%、または95%、または97%、または98%、または99%同一性であるもののうちの1つ）及び細胞外ドメインを接続するために使用され得る。例えば、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、またはそのバリエーションのうちのいずれか1つが、本明細書に開示される細胞外ドメイン、及び本明細書に開示されるリンカーにおけるFcドメインを接続し得る。任意で、配列番号4～配列番号50、またはそれらのバリエーションのうちのいずれか1つは、本明細書に開示される細胞外ドメインと本明細書に開示されるFcドメインとの間に位置する。

【0181】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、以下の表1に開示される結合リンカーのバリエーションを含み得る。例えば、リンカーは、配列番号4～配列番号50のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少

なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%の配列同一性を有し得る。

【0182】

実施形態では、第 1 及び第 2 の結合リンカーは異なってもよく、またはそれらは同じであってもよい。

【0183】

理論に拘束されることを望まないが、キメラタンパク質において Fcドメインの少なくとも一部を含むリンカーを含めることは、不溶性であり、非機能性のタンパク質コンカテマー及び／または凝集体の形成を回避する助けとなる。これは、キメラタンパク質間にジスルフィド結合を形成することが可能である Fcドメイン内にシステインが存在するためである。

10

【0184】

実施形態では、キメラタンパク質は、本明細書に開示されるように、1つ以上の結合リンカーを含み得、本明細書に開示されるように、Fcドメインリンカーを欠く。

【0185】

実施形態では、第 1 及び／または第 2 の結合リンカーは独立して、配列番号 4～配列番号 50 のアミノ酸配列から選択され、以下の表 1 に提供される。

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 : 例示的なリンカー (Fc ドメインリンカー及び結合リンカー)

配列 番号	配列
1	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWL SGKEYKCKVSSKGLP SSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDS DG SFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK
2	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVV VDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTTPHSDWL SGKEYKCKVSSKGLP SSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDS DG SFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVL HEALHNHYTQKSLSLSLGK
3	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVV VDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWL SGKEYKCKVSSKGLP SSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDS DG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVL HEALHNHYTQKSLSLSLGK
4	SKYGPPCPSCP
5	SKYGPPCPPCP
6	SKYGPP
7	IEGRMD
8	GGGVPRDCG
9	IEGRMDGGGGAGGGG
10	GGGSGGGG
11	GGGSGGGGSGGG
12	EGKSSGSGSESKST

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

1 3	G G S G
1 4	G G S G G G S G G G S G
1 5	E A A A K E A A A K E A A A K
1 6	E A A A R E A A A R E A A A R E A A R
1 7	G G G G S G G G G S G G G G S A S
1 8	G G G G A G G G G
1 9	G S または G G S または L E
2 0	G S G S G S
2 1	G S G S G S G S G S
2 2	G G G G S A S
2 3	A P A P A P A P A P A P A P A P A P
2 4	C P P C
2 5	G G G G S
2 6	G G G G S G G G G S
2 7	G G G G S G G G G S G G G G S
2 8	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S
2 9	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S
3 0	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S
3 1	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S
3 2	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S
3 3	G G S G G S G G G G S G G G G S
3 4	G G G G G G G G
3 5	G G G G G G
3 6	E A A A K
3 7	E A A A K E A A A K
3 8	E A A A K E A A A K E A A A K
3 9	A E A A A K E A A A K A
4 0	A E A A A K E A A A K E A A A K A
4 1	A E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K A
4 2	A E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K A
4 3	A E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K A L E A E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K A
4 4	P A P A P
4 5	K E S G S V S S E Q L A Q F R S L D
4 6	G S A G S A A G S G E F
4 7	G G G S E
4 8	G S E S G
4 9	G S E G S
5 0	G E G G S G E G S S G E G S S S E G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G S

10

20

30

40

【0186】

実施形態では、結合リンカーは、グリシン及びセリン残基を実質的に含む（例えば、約 30 %、または約 40 %、または約 50 %、または約 60 %、または約 70 %、または約 80 %、または約 90 %、または約 95 %、または約 97 %、または約 98 %、または約 99 %、または約 100 % のグリシン及びセリン）。例えば、実施形態では、結合リンカーは、 $(Gly_4Ser)_n$ であり、ここで、 n は、約 1 ～ 約 8、例えば、1、2、3、4、5、6、7、または 8（それぞれ、配列番号 25 ～ 配列番号 32）である。実施形態では、結合リンカー配列は、G G S G G S G G G G S G G G G S（配列番号 33）である。追加の例示的な結合リンカーには、これらに限定されないが、配列 L E、（E A A A K）

50

n ($n = 1 \sim 3$) (配列番号 36 ~ 配列番号 38)、 $A(EAAAK)_n A$ ($n = 2 \sim 5$) (配列番号 39 ~ 配列番号 42)、 $A(EAAAK)_4 ALEA(EAAAK)_4 A$ (配列番号 43)、 $PAPAP$ (配列番号 44)、 $KESGGSVSSSEQLAQFRSLD$ (配列番号 45)、 $GSAGSAAAGSGEF$ (配列番号 46)、及び X が、例えば、 Ala 、 Lys 、または Glu などの任意のアミノ酸を示す、 $(XP)_n$ を有するリンカーが含まれる。実施形態では、結合リンカーは、 GGG である。実施形態では、結合リンカーは、配列 $(Gly)_n$ を有し、ここで、 n は、 $1 \sim 100$ の任意の数、例えば、 $(Gly)_8$ (配列番号 34) 及び $(Gly)_6$ (配列番号 35) である。

【0187】

実施形態では、結合リンカーは、 $GGGSE$ (配列番号 47)、 $GSESG$ (配列番号 48)、 $GSEGS$ (配列番号 49)、 $GEGGSGEGSSSGEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGS$ (配列番号 50)、ならびに 4 アミノ酸間隔ごとにランダムに配置される G 、 S 、及び E の結合リンカーのうちの 1 つ以上である。

【0188】

実施形態では、キメラタンパク質は、 $CD80$ の細胞外ドメイン (ECD)、 Fc ドメインに先行する 1 つの結合リンカー、 Fc ドメインに続く第 2 の結合リンカー、及び $NKG2A$ の ECD を含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：

$CD80$ の ECD - 結合リンカー 1 - Fc ドメイン - 結合リンカー 2 - $NKG2A$ の ECD 。

本キメラタンパク質の一例は、配列番号 61 の配列を含む。

【0189】

実施形態では、キメラタンパク質は、 $CD86$ の細胞外ドメイン (ECD)、 Fc ドメインに先行する 1 つの結合リンカー、 Fc ドメインに続く第 2 の結合リンカー、及び $NKG2A$ の ECD を含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：

$CD86$ の ECD - 結合リンカー 1 - Fc ドメイン - 結合リンカー 2 - $NKG2A$ の ECD 。

本キメラタンパク質の一例は、配列番号 65 の配列を含む。

【0190】

実施形態では、キメラタンパク質は、 $CD58$ の細胞外ドメイン (ECD)、 Fc ドメインに先行する 1 つの結合リンカー、 Fc ドメインに続く第 2 の結合リンカー、及び $NKG2A$ の ECD を含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：

$CD58$ の ECD - 結合リンカー 1 - Fc ドメイン - 結合リンカー 2 - $NKG2A$ の ECD 。

本キメラタンパク質の一例は、配列番号 68 の配列を含む。

【0191】

実施形態では、キメラタンパク質は、 $PD-1$ の細胞外ドメイン (ECD)、 Fc ドメインに先行する 1 つの結合リンカー、 Fc ドメインに続く第 2 の結合リンカー、及び $NKG2A$ の ECD を含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：

$PD-1$ の ECD - 結合リンカー 1 - Fc ドメイン - 結合リンカー 2 - $NKG2A$ の ECD 。

本キメラタンパク質の一例は、配列番号 71 の配列を含む。

【0192】

実施形態では、キメラタンパク質は、 $SLAMF6$ の細胞外ドメイン (ECD)、 Fc ドメインに先行する 1 つの結合リンカー、 Fc ドメインに続く第 2 の結合リンカー、及び $NKG2A$ の ECD を含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：

$SLAMF6$ の ECD - 結合リンカー 1 - Fc ドメイン - 結合リンカー 2 - $NKG2A$ の ECD 。

本キメラタンパク質の一例は、配列番号 75 の配列を含む。

【0193】

実施形態では、キメラタンパク質は、 $SIRP\alpha$ の細胞外ドメイン (ECD)、 Fc ドメ

10

20

30

40

50

インに先行する1つの結合リンカー、Fcドメインに続く第2の結合リンカー、及びNK G2AのECDを含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：
SIRPαのECD－結合リンカー1－Fcドメイン－結合リンカー2－NK G2AのECD。

本キメラタンパク質の一例は、配列番号86の配列を含む。

【0194】

実施形態では、キメラタンパク質は、TGFB R2の細胞外ドメイン（ECD）、Fcドメインに先行する1つの結合リンカー、Fcドメインに続く第2の結合リンカー、及びNK G2AのECDを含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：

TGFB R2のECD－結合リンカー1－Fcドメイン－結合リンカー2－NK G2AのECD。

10

本キメラタンパク質の一例は、配列番号79の配列を含む。

【0195】

実施形態では、キメラタンパク質は、膜アンカー細胞外タンパク質CD48の一部、Fcドメインに先行する1つの結合リンカー、Fcドメインに続く第2の結合リンカー、及びNK G2AのECDを含み、キメラタンパク質は、以下の構造を含み得る：

CD48の一部－結合リンカー1－Fcドメイン－結合リンカー2－NK G2AのECD。

本キメラタンパク質の一例は、配列番号83の配列を含む。

【0196】

第1の結合リンカー、Fcドメインリンカー、及び第2の結合リンカーの組み合わせは、本明細書において「モジュラーリンカー」と称される。実施形態では、キメラタンパク質は、表2に示されるようなモジュラーリンカーを含む。

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2：例示的なモジュラーリンカー

結合リンカー ー1	F c	結合リンカー ー2	モジュラーリンカー＝結合 リンカー1＋F c＋結合リ ンカー2
SKYGP PCPSC P (配列番号 4)	APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLSGKEYK CKVSSKGLPS SIEKTISNAT GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSPDIAVE WESNGQPENN YKTTTPPVLD DGSFFFLYSRL TVDKSSWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (配列 番号1)	IEGRM D (配列番号 7)	SKYGPPCPSCPA PEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLS GKEYKCKVSSKG LPSSI EKTISNA TGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLD SDGSFFFLYSRLT VDKSSWQEGNVF SCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK IEGRMD (配列番号5 1)
SKYGP PCPSC P (配列番号 4)	APEFLGGPSV FLFPPKPKDQ LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTTTPH SDWLSGKEYK CKVSSKGLPS SIEKTISNAT GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSPDIAVE WESNGQPENN YKTTTPPVLD DGSFFFLYSRL TVDKSSWQEG NVFSCSVLHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (配列 番号2)	IEGRM D (配列番号 7)	SKYGPPCPSCPA PEFLGGPSVFLF PPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVV SVLTTTPHSDWLS GKEYKCKVSSKG LPSSI EKTISNA TGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLD SDGSFFFLYSRLT VDKSSWQEGNVF SCSVLHEALHNH YTQKSLSLSLGK IEGRMD (配列番号5 2)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

SKYGP PCPSC P (配列番号 4)	APEFLGGPSV FLFPPKPKDQ LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLSGKEYK CKVSSKGLPS SIEKTISNAT GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVLHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (配列番号 3)	IEGRMD (配列番号 7)	SKYGPPPCPSCPA PEFLGGPSVFLF PPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLS GKEYKCKVSSKG LPSSIEKTISNA TGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVL SDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVF SCSVLHEALHNH YTQKSLSLSLGK IEGRMD (配列番号 53)
SKYGP PCPPC P (配列番号 5)	APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLSGKEYK CKVSSKGLPS SIEKTISNAT GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSSWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (配列番号 1)	IEGRMD (配列番号 7)	SKYGPPCPCPCPA PEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLS GKEYKCKVSSKG LPSSIEKTISNA TGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVL SDGSFFLYSRLT VDKSSWQEGNVF SCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK IEGRMD (配列番号 54)

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

SKYGP PCPPC P (配列番 号 5)	APEFLGGPSV FLFPPKPKDQ LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTTPH SDWLSGKEYK CKVSSKGLPS SIEKTISNAT GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSSWQEG NVFSCSVLHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (配列 番号 2)	IEGRM D (配列番号 7)	SKYGPPCPCPCA PEFLGGPSVFLF PPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVV SVLTTPHSDWLS GKEYKCKVSSKG LPSSIEKTISNA TGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVL SDGSFFLYSRLT VDKSSWQEGNVF SCSVLHEALHNH YTQKSLSLSLGK IEGRMD (配列番 5 5)
SKYGP PCPPC P (配列番 号 5)	APEFLGGPSV FLFPPKPKDQ LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLSGKEYK CKVSSKGLPS SIEKTISNAT GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVLHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (配列 番号 3)	IEGRM D (配列番号 7)	SKYGPPCPCPCA PEFLGGPSVFLF PPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLS GKEYKCKVSSKG LPSSIEKTISNA TGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVL SDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVF SCSVLHEALHNH YTQKSLSLSLGK IEGRMD (配列番号 5 6)

10

20

30

40

【0197】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、上記の表 2 に開示されるモジュラーリンカーのバリエーションを含み得る。例えば、リンカーは、配列番号 51～配列番号 56 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも約 60%、または少なくとも約 61%、または少なくとも約 62%、または少なくとも約 63%、または少なくとも約 64%、または少なくとも約 65%、または少なくとも約 66%、または少なくとも約 67%、または少なくとも約 68%、または少なくとも約 69%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 71%、または少なくとも約 72%、または少なくとも約 73%、または少なくとも約 74%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 76%、または少なくとも

50

約 77%、または少なくとも約 78%、または少なくとも約 79%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 81%、または少なくとも約 82%、または少なくとも約 83%、または少なくとも約 84%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 86%、または少なくとも約 87%、または少なくとも約 88%、または少なくとも約 89%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 91%、または少なくとも約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有し得る。

【0198】

実施形態では、リンカーは、高い柔軟性であることを含むがこれに限定されない柔軟性であり得る。実施形態では、リンカーは、剛性アルファヘリックスを含むがこれに限定されない剛性であり得る。例示的な結合リンカーの特徴を以下の表 3 に示す。

10

【表 3】

表 3：例示的な結合リンカーの特徴

結合リンカー配列	特徴
SKYGPPCPPCP (配列番号 5)	I g G 4 ヒンジ領域
I EGRMD (配列番号 7)	リンカー
GGGVPRDCG (配列番号 8)	柔軟性
GGGSGGGS (配列番号 10)	柔軟性
GGGSGGGGSGGG (配列番号 11)	柔軟性
EGKSSGSGSESKST (配列番号 12)	柔軟性 + 可溶性
GGSG (配列番号 13)	柔軟性
GGSGGGSGGGSG (配列番号 14)	柔軟性
EAAAKEAAAKEAAAK (配列番号 15)	剛性アルファヘリックス
EAAAREAAAREAAAREAAAR (配列番号 16)	剛性アルファヘリックス
GGGGSGGGGSGGGGSGSAS (配列番号 17)	柔軟性
GGGGAGGGG (配列番号 18)	柔軟性
GS (配列番号 19)	高い柔軟性
GSGSGS (配列番号 20)	高い柔軟性
GSGSGSGSGS (配列番号 21)	高い柔軟性
GGGGSAS (配列番号 22)	柔軟性
APAPAPAPAPAPAPAPAP (配列番号 23)	剛性

20

30

【0199】

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

40

【0200】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、1つの結合リンカーのみを含む。

【0201】

実施形態では、キメラタンパク質は、結合リンカーを欠く。

【0202】

実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール (PEG) などの合成リンカーである。

50

【0203】

実施形態では、キメラタンパク質は、そのリガンド／受容体と立体的に結合することが可能である第1のドメイン、及び／またはそのリガンド／受容体と立体的に結合することが可能である第2のドメインを有する。したがって、細胞外ドメインのリガンド／受容体結合ドメインがそのリガンド／受容体の結合を立体的に妨げられないように、キメラタンパク質及び／または細胞外ドメイン（またはその一部）と残りのキメラタンパク質との間の物理的距離に十分な全体的な柔軟性がある。この柔軟性及び／または物理的距離（「緩み」と称される）は通常、細胞外ドメイン（複数可）に存在し、通常はリンカーに存在し、及び／または通常はキメラタンパク質に（全体として）存在し得る。代替的にまたは追加的に、アミノ酸配列（例えば）は、立体障害を回避するために必要な緩みを提供するために、1つ以上の細胞外ドメイン及び／またはリンカーに追加され得る。緩みを提供する任意のアミノ酸配列が追加され得る。実施形態では、追加されるアミノ酸配列は、配列（Gly）_nを含み、ここで、nは、1～100の任意の数である。追加可能なアミノ酸配列の追加の例には、表1及び表3に記載される結合リンカーが含まれる。実施形態では、ポリエチレングリコール（PEG）リンカーは、立体障害を回避するために必要な緩みを提供するために、細胞外ドメインとリンカーとの間に追加され得る。かかるPEGリンカーは、当技術分野において周知である。

10

【0204】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD80の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）、リンカー、及びNKG2Aの細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIgG1またはIgG4を含むIgG1またはIgG4からのヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD80の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含むリンカー、及びNKG2Aの細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「CD80-Fc-NKG2A」と称される。

20

【0205】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD86の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）、リンカー、及びNKG2Aの細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIgG1またはIgG4を含むIgG1またはIgG4からのヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD86の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含むリンカー、及びNKG2Aの細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「CD86-Fc-NKG2A」と称される。

30

【0206】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD58の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）、リンカー、及びNKG2Aの細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIgG1またはIgG4を含むIgG1またはIgG4からのヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、CD58の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）、ヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含むリンカー、及びNKG2Aの細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「CD58-Fc-NKG2A」と称される。

40

【0207】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、PD-1の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）、リンカー、及びNKG2Aの細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIgG1またはIgG4を含むIgG1またはIgG4からのヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、PD-1の細胞外ドメイン（またはそのバリエーション）を含む。

50

ト)、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「PD-1-Fc-NK G2 A」と称される。

【0208】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、SLAMF6の細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)、リンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIg G1またはIg G4を含むIg G1またはIg G4からのヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、SLAMF6の細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「SLAMF6-Fc-NK G2 A」と称される。

10

【0209】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、SIRPαの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)、リンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIg G1またはIg G4を含むIg G1またはIg G4からのヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、SIRPαの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「SIRPα-Fc-NK G2 A」と称される。

20

【0210】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、TGFB R2の細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)、リンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIg G1またはIg G4を含むIg G1またはIg G4からのヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、TGFB R2の細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「TGFB R2-Fc-NK G2 A」と称される。

30

【0211】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、膜アンカー細胞外タンパク質CD48の一部(またはそのバリエーション)、リンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。実施形態では、リンカーは、例えば、ヒトIg G1またはIg G4を含むIg G1またはIg G4からのヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含む。したがって、実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、膜アンカー細胞外タンパク質CD48の一部(またはそのバリエーション)、ヒンジ-CH₂-CH₃ Fcドメインを含むリンカー、及びNK G2 Aの細胞外ドメイン(またはそのバリエーション)を含む。かかるキメラタンパク質は、本明細書において「CD48-Fc-NK G2 A」と称される。

【0212】

本開示のキメラタンパク質の非限定的な例を以下の表4に示す。

40

【表 4 - 1】

I 型膜貫通タンパク質または膜アンカー細胞外タンパク質の細胞外ドメイン (ECD) (a)	II 型膜貫通タンパク質のECD (c)	以下の一般的な構造: N末端 - (a) - (b) - (c) - C末端 (式中、(b) が、(a) 及び (c) に隣接するリンカーである) のキメラタンパク質
ヒトCD80 ECD: VIHVTKEVK EVATLSCGH NVSVEELAQ TRIYWQKEK KMVLTMMMSG DMNIWPEYK NRTIFDITN NLSIVILAL RPSDEGTYE CVVLKYEKD AFKREHLAE VTLSVKADF PTPSISDFE IPTSNIRRI ICSTSGGFP EPHLSWLEN GEELNAINT TVSQDPETE LYAVSSKLD FNMTTNHSF MCLIKYGHL RVNQTFNWN TTKQEHFPD N (配列番号59)	ヒトNKG2A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPEEW ITYSNS CYBIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番号57)	ヒトCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質: VIHVTKEVKEVATLSCGHNV VEELAQTIRIYWQKEKKMVLTM MSGDMNIWPEYKNRTIFDITN NLSIVILALRPSDEGTYECVV LKYEKDAFKREHLAEVTL SVK ADFPTPSISDFE IPTSNIRRI ICSTSGGFP EPHLSWLENGEE LNAINTTVSQDPETELYAVSS KLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHL RVNQTFNWNNTTKQEHFPD NSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDQLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLMSGKEYKCKVSSK GLPSSIEKTI SNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVLHEA LHNHYTQKSLSLSLGKIEGRM DPSTLIQRHNNSSSLNTRTQKA RHCGHCPPEEWITYSNSCYBIG KERRTWEESLLACTSKNSSL LSIDNEEEMKF LSIISPSSWIG VFRNSSHHPWVTMNGLAFKHE IKDSDNAELNCAVLQVNRLKS AQCGSSI IYHCKHKL (配列番号61)

10

20

30

40

50

【表 4-2】

マウスCD80 E CD: VDEQLSKSV KDKVLLPCR YNSPHEDES EDRIYWQKH DKVVL SVIA GKLK VWPEY KNRTLYDNT TYSLI ILGL VLSDRGTY S CVVQKKERG TYEVKHLAL VKLSIKADF STPNITESG NPSADTKRI TCFASGGFP KPRFSWLEN GRELP GINT TISQDPESE LYTISSQLD FNTTRNHTI KCLIKYGDA HVSEDFTWE KPPEDPPDS KN (配列番号60)	マウスNKG 2A ECD : TPYTEA KAQINS SMTRTH RDINYT LSSAQP CPHC PK EWSYS HNCYFI GMERKS WNDSL V SCISK N CSLLYI DSEEEQ DFLQSL SLISWT GILRKG RGQPWV WKEDSI FKPKIA EILHDE CNCAMM SASGLT ADNCTT LHPYLC KCKFPI (配列番号5 8)	マウスCD80-Fc-NKG2A VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNS PHEDESEDRIYWQKHDKVVL S VIAGKLK VWPEYKNRTLYDNT TYSLI ILGLVLSDRGTYSCVV QKKERGTYEVKHLALVKLSIK ADFSTPNITESGNPSADTKRI TCFASGGFPKPRFSWLENGRE LPGINTTISQDPESELYTISS QLDFNTTRNHTIKCLIKYGDA HVSEDFTWEKPPEDPPDSKNV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTITLTPKVTCVV VDISKDDPEVQFSWFVDDVEV HTAQTQPREEQFNSTFRSVSE LPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQ VYTI PPPKEQMAKDKVSLTCM ITDFFPEDITVEWQWNGQPAE NYKNTQPIMDTDGSYFVYSKL NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEG LHNHHTEKSLSHSPGIIEGRM DTPYTEAKAQINS SMTRTHRD INYTLSSAQPCPHCPKEWISY SHNCYFIGMERKSWNDSLVS C ISKNC SLLYIDSEEEQDFLQS LSLISWTGILRKGRGQPWVWK EDSIFKPKIAEILHDECNCAM MSASGLTADNCTT LHPYLCCKC KFP I (配列番号62)
---	---	---

10

20

30

40

50

【表 4-3】

ヒトCD86 EC D: APLKIQAYF NETADLPCQ FANSQNQSL SELVVFWD QENLVLNEV YLGKEKFDS VHSKYMGR SFDSDSWTL RLHNLQIKD KGLYQCIIH HKKPTGMIR IHQMNSELS VLANSQPE IVPISNITE NVYINLTCS SIHGYPEPK KMSVLLRTK NSTIEYDGV MQKSQDNVT ELYDVSL SVSFPDVT NMTIFCILE TDKTRLLSS PFSIELEDP QPPPDHIP (配 列番号63)	ヒトNKG2 A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPEEW ITYSNS CYYIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番 号57)	ヒトCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパ ク質: APLKIQAYFNETADLPCQFAN SQNQSLSELVVFWDQENLVL NEVYLGKEKFDSVHSKYMGR SFDSDSWTLRLHNLQIKDKGL YQCIIHHKKPTGMIRIHQMNS ELSVLANFSQPEIVPISNITE NVYINLTCS SIHGYPEPKKMS VLLRTKNSTIEYDGVVMQKSQD NVTETYDVSLSVSFPDVT NMTIFCILETDKTRLLSSPFS IELEDPQPPPDHIPSKYGP PCPAPEFLGGPSVFLFPK KDQLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLSGKEYKCKVSSKGLPSS IEKTISNATGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVLHEALHNHY TQKSLSLSLGKIEGRMDPSTL IQRHNNSSLNTRTQKARHCGH CPEEWITYSNSCYIIGKERRT WEESLLACTSKNSSLLSIDNE EEMKFLSIISPSSWIGVFRNS SHHPWVTMNGLAFAKHEIKDS DNAELNCAVLQVNRLKSAQCGS SIIYHCKHKL (配列番号65)
--	---	--

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

マウスCD86 E CD: VSVETQAYF NGTAYLPCP FTKAQNI SL SELVVFWD QQKLVL YE YLGTEKLDS VNAKYLGRT SFDRNNWTL RLHNVQIKD MGSYDCF IQ KKPPTGSII LQQTLTELS VIANFSEPE IKLAQNV TG NSGINLTCT SKQGHPKPK KMYFLITNS TNEYGDNMQ ISQDNVTEL FSISNSLSL SFPDGVWHM TVVCVLETE SMKISSKPL NFTQEFSP QTYWK (配列番 号64)	マウスNKG 2A ECD : TPYTEA KAQINS SMTRTH RDINYT LSSAQP CPHCPK EWSYS HNCYFI GMERKS WND SLV SCISK N CSLLYI DSEEEQ DFLQSL SLISWT GILRKG RGQPWV WKEDSI FKPKIA EILHDE CNCAMM SASGLT ADNCTT LHPYLC KCKFPI (配列番号5 8)	マウスCD86-Fc-NKG2Aキメラタン パク質: VSVETQAYFNGTAYLPCPFTK AQNISLSELVVFWDQQKLVL YEHYLGTEKLDSVNAKYLGRT SFDRNNWTLRLHNVQIKDMGS YDCF IQKKPPTGSII LQQTLT ELSVIANFSEPEIKLAQNV TG NSGINLTCTSKQGHPKPKKMY FLITNSTNEYGDNMQISQDNV TELF S ISNSLSLSFPDGVWHM TVVCVLETE SMKISSKPLNFT QEFSPSQTYWKVPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPE VQFSWFVDDVEVHTAQTPRE EQFNSTFRSVSELPIMHQDWL NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKT ISKTKGRPKAPQVYTI PPPKE QMAKDKVSLTCMITDFFPEDI TVEWQWNGQPAENYKNTQPIM DTDGSYFVYSKLVNQSWEA GNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSPGII EGRMDTPYTEAKA QINSSMTRTHRDINYTLSSAQ PCPHCPKEWISYSHNCYFIGM ERKSWND SLVSCISKNC SLLY IDSEEEQDFLQSLSLISWTGI LRKGRGQPWVWKEDSIFKPKI AEILHDECNCAMMSASGLTAD NCTTLHPYLCKCKFPI (配列番号 66)
---	--	---

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

ヒトCD58 EC D: FSQQIYGVV YGNVTFHVP SNVPLKEVL WKKQKDKVA ELENSEFRA FSSFKNRVY LDTVSGSLT IYNLTSSDE DEYEMESPN ITDTMKFFL YVLES LPSP TLTCALTNG SIEVQCMIP EHYN SHRGL IMYSWDCPM EQCKRNSTS IYFKMENDL PQKI QCTLS NPLFNTTSS IILTTCIPS SGHSRHR (配 列番号67)	ヒトNKG2 A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPEEW ITYSNS CY YIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番 号57)	ヒトCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパ ク質: FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNV PLKEVLWKKQKDKVAELENSE FRAFSSFKNRVYLDTVSGSLT IYNLTSSDEDEYEMESPNITD TMKFFLYVLES LPSPPTLTAL TNGSIEVQCMIP EHYNSHRGL IMYSWDCPM EQCKRNSTS IYF KMENDLPQKI QCTLSNPLFNT TSSIILTTCIPSSGHSRHR YGPCCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDQLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLSGKEYKCKVSSK GLPSSIEKTI SNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVLHEA LHNHYTQKSLSLSLGKIEGRM DPSTLIQRHNNSSLNTRTQKA RHCGHCP EEWITYSNSCY YIG KERRTWEESLLACTSKNSSLL SIDNEEEMKF LSIISPSSWIG VFRNSSSHHPWVTMNGLAFKHE IKDSDNAELNCAVLQVNRLKS AQCGSSI IYHCKHKL (配列番号6 8)
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

ヒトPD-1 EC D: LDSPDRPWN PPTFSPALL VVTEGDNAT FTCSFSNTS ESFVLNWYR MSPSNQTDK LAAFPEDRS QPGQDCRFR VTQLPNGRD FHMSVVRAR RNDSGTYLC GAISLAPKA QIKESLRAE LRVTERRAE VPTAHPSPS PRPAGQFQ (配列番号69)	ヒトNKG2 A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPPEEW ITYSNS CYIIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番号57)	ヒトPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質: LDSPDRPWNPPTFSPALLVVT EGDNATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSPSNQTDKLAAFPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHM SVVRARRNDSTYLCGAISLA PKAQIKESLRAELRVTERRAE VPTAHPSPSPRPAGQFQSKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDQLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLSGKEYKCKVSSKGL PSSIEKTI SNATGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVLHEALH NHYTQKSLSLSLGKIEGRMDP STLIQRHNNSSLNTRTQKARH CGHCPPEEWITYSNSCYIIGKE RRTWEESLLACTSKNSSLLSI DNEEEMKFLSIISPSSWIGVF RNSSHHPWVTMNGLAFKHEIK DSDNAELNCAVLQVNRLKSAQ CGSSI IYHCKHKL (配列番号71)
---	--	--

10

20

30

40

50

【表 4-7】

マウスPD-1 E CD: SGWLLLEVPN GPWRSLTFY PAWLTVSEG ANATFTCSL SNWSEDLML NWNRLSPSN QTEKQAAFC NGLSQPVQD ARFQIIQLP NRHDFHMNI LDTRRND SG IYLCGAISL HPKAKIEES PGAELVVTE RILETSTRY PSPSPKPEG RFQGM (配列番 号70)	マウスNKG 2A ECD : TPYTEA KAQINS SMTRTH RDINYT LSSAQF CPHCPK EWSYS HNCYFI GMERKS WNDSL VSCISK NCSLLY IDSEEE QDFLQ SLSLI SWTG ILRK GRG QPW WKED SIFK PKIA EILH DEC NCAM MSAS GLT ADN CTTL HPY LCK CKFI (配列番号5 8)	マウスPD-1-Fc-NKG2Aキメラタン パク質: SEDLMLNWNRLSPSNQTEKQA AFCNGLSQPVQDARFQIIQLP NRHDFHMNI LDTRRND SG IYL CGAISLHPKAKIEESPGAELV VTERILETSTRYPSPSPKPEG RFQGMVPRDCGCKPCICTVPE VSSVFIFFPKPKDVLITLTP KVTCVVVDISKDDPEVQFSWF VDDVEVHTAQTQPREEQFNST FRSVSELPIMHQDWLNGKEFK CRVNSAAFPAPIEKTISKTKG RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDK VSLTCMITDFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMDTDGSY FVYSKLNQKSNWEAGNTFTC SVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG II EGRMDTPYTEAKAQINSSM TRTHRDINYTLSSAQPCPHCP KEWISYSHNCYFIGMERKSWN DSLVS CISKNC SLLYID SEEE QDFLQ SLSLI SWTG ILRK GRG QPW WKED SIFK PKIA EILH DEC NCAM MSAS GLT ADN CTTL HPY LCK CKFI (配列番号72)
--	---	---

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

ヒトSLAMF6 ECD: QSSLTPLMV NGILGESVT LPLEFPAGE KVNFI TWLF NETSLAFIV PHETKSPEI HVTNPKQ GK RLNFTQSYS LQLSNLKM DTGSYRAQI STKTSAKLS SYTLRI LRQ LRNIQVTNH SQLFQNMTC ELHLTCSVE DADDNVSFR WEALGNTLS SQPNLTVSW DPRISSEQD YTCIAENAV SNLSFSVSA QKLCEDVKI QYTDTKM (配 列番号73)	ヒトNKG2 A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPEEW ITYSNS CY YIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番 号57)	ヒトSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタ ンパク質: QSSLTPLMVNGILGESVTLP LEFPAGEKVNFI TWLFNETSLA FIVPHETKSPEIHVTNPKQ GK RLNFTQSYS LQLSNLKMEDTG SYRAQISTKTSAKLS SYTLRI LRQLRNIQVTNHSQLFQNMTC ELHLTCSVEDADDNVSFRWEA LGNTLSSQPNLTVSWDPRISS EQDYTCIAENAVSNLSFSVSA QKLCEDVKIQYTDTKMSKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDQLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLSGKEYKCKVSSKGLP SSIEKTI SNATGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVLHEALHN HYTQKSLSLSLGKIEGRMDPS TLIQRHNNSSLNTRTQKARHC GHCPEEWITYSNSCY YIGKER RTWEESLLACTSKNSSLLSID NEEEMKFLSIISPSSWIGVFR NSSHHPWVTMNGLAFKHEIKD SDNAELNCAVLQVNRLKSAQC GSSI IYHCKHKL (配列番号75)
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 4-9】

マウスSLAMF6 ECD: EVSQSSSDP QLMNGVLGE SAVLPLKLP AGKIANII WNYEWEASQ VTALVINLS NPESPQIMN TDVKKRLNI TQSYSLQIS NLTMADTGS YTAQITTKD SEVITFKYI LRVFERLGN LETTNYTLL LENGTCQIH LACVLKNQS QTVSVEWQA TGNISLGGP NVTIFWDPR NSGDQTYVC RAKNAVSNL SVSVSTQSL CKGVLTNPP WN (配列番号74)	マウスNKG 2A ECD : TPYTEA KAQINS SMTRTH RDINYT LSSAQP CPHCPK EWISYS HNCYFI GMERKS WNDSL VSCISK NCSLLY IDSEEEQ DFLQSL SLISWT GILRKG RGQPWV WKEDSI FKPKIA EILHDE CNCAMM SASGLT ADNCTT LHPYLC KCKFPI (配列番号58)	マウスSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラ タンパク質: VSQSSSDPQLMNGVLGESAVL PLKLPAGKIANIIWNYEWEA SQVTALVINLSNPESPQIMNT DVKKRLNITQSYSLQISNLTM ADTGSYTAQITTKDSEVITFK YILRVFERLGNLETTNYTLLL ENGTCQIHLACVLKNQSQT VSVSVEWQATGNISLGGPNVTIFWD PRNSGDQTYVCRAKNAVSNLS VSVSTQSLCKGVLTNPPWNP RDCGCKPCICTVPEVSSVFI PPKPKDVLTTITLTPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVH TAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FPAPIEKTISKTKGRPKAPQV YTIPPPKEQMAKDKVSLTCMI TDFFPEDITVEWQWNGQPAEN YKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGL HNHHTEKSLSHSPGIIIEGRMD TPYTEAKAQINSSMTRTHRDI NYTLSSAQPCPHCPKEWISYS HNCYFIGMERKSWNDSL VSCISKNC SLLYIDSEEEQDFLQSL SLISWTGILRKG RGQPWVWKE DSIFKPKIAEILHDECNCAMM SASGLTADNCTTLHPYLC KCKFPI (配列番号76)
--	---	--

10

20

30

40

50

【表 4-10】

ヒトTGFB2 ECD: TIPPHVQKS VNNDMIVTD NNGAVKFPQ LCKFCDVRF STCDNQKSC MSNCSITS CEKPQEV AVWRKNDEN ITLETVCHD PKLPYHDFI LEDAASPKC IMKEKKKPG ETFFMCSCS SDECNDNII FSEEYNTSN PDL LLVIFQ (配列番号77)	ヒトNKG2 A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPEEW ITYSNS CYYIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番 号57)	ヒトTGFB2-Fc-NKG2Aキメラタ ンパク質: TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQ KSCMSNCSITSICEKPQEV AVWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAAASPKCIMKEKK KPGETFFMCSCSSDECNDNII FSEEYNTSNPDLLLVIFQSKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDQLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWL SGKEYKCKVSSKG LPSSIEKTISNATGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVLHEAL HNHYTQKSLSLSLGKIEGRMD PSTLIQRHNNSSLNTRTQKAR HCGHCPEEWITYSNSCYIGK ERRTWEESLLACTSKNSSLLS IDNEEEMKFLSIISPSSWIGV FRNSSHHPWVTMNGLAFKHEI KDSDNAELNCAVLQVNRLKSA QCGSSI IYHCKHKL (配列番号79)
---	---	--

10

20

30

40

50

【表 4-11】

マウスTGFBβ2 ECD: IPPHVPKSD VEMEAQKDA SIHLSCNRT IHPLKHFNS DVMASDNGG AVKLPQLCK FCDVRLSTC DNQKSCMSN CSITAICEK PHEVCVAVW RKNDKNITL ETVCHDPKL TYHGFTLED AASPKCVMK EKKRAGETF FMCACNMEE CNDYIIIFSE EYTTSSPD (配 列番号78)	マウスNKG 2A ECD : TPYTEA KAQINS SMTRTH RDINYT LSSAQP CPHCPK EWISYS HNCYFI GMERKS WNDSL VSCISK NCSLLYI DSEEEQ DFLQSL SLISWT GILRKG RGQPWV WKEDSI FKPKIA EILHDE CNCAMM SASGLT ADNCTT LHPYLC KCKFPI (配列番号5 8)	マウスTGFBβ2-Fc-NKG2Aキメラ タンパク質: IPPHVPKSDVEMEAQKDASIH LSCNRTIHPLKHFNSDVMASD NGGAVKLPQLCKFCDVRLSTC DNQKSCMSNCSITAICEKPHE VCVAVWRKNDKNITLETVCHD PKLTYHGFTLEDAASPKCVMK EKKRAGETF FMCACNMEECND YIIIFSEEYTTSSPDVPRDCGC KPCICTVPEVSSSVFIFPPKPK DVLTTITLTPKVTCVVVDISKD DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQ PREEQFNSTFRSVSELPIMHQ DWLNGKEFKCRVNSAAFPAPI EKTISKTKGRPKAPQVYTIPP PKEQMAKDKVSLTCMITDFFP EDITVEWQWNGQPAENYKNTQ PIMDTDGSYFVYSKLVNQKSN WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGIIIEGRMDTPYTE AKAQINSSMTRTHRDINYTSL SAQPCPHCPKEWISYSHNCYF IGMERKSWNDSLVS CISKNC SLLYIDSEEEQDFLQSLSLISW TGILRKG RGQPWVWKEDSI FKPKIA EILHDECNCAMMSASGL TADNCTTLHPYLC KCKFPI (配 列番号80)
--	---	---

10

20

30

40

50

【表 4-12】

ヒトCD48 EC D: QGHLVHMTV VSGSNVTLN ISESLPENY KQLTWFYTF DQKIVEWDS RKSKYFESK FKGRVRLDP QSGALYISK VQKEDNSTY IMRVLKKTG NEQEWKIKL QVLDPVPKP VIKIEKIED MDDNCYLKL SCVIPGESV NYTWYGDKR PFPKELQNS VLETTLMPH NYSRCYTCQ VSNSVSSKN GTVCLSPPC TLAR (配列番号 81)	ヒトNKG2 A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPEEW ITYSNS CYYIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番号 57)	ヒトCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質: QGHLVHMTVVSGSNVTLNISE SLPENYKQLTWFYTFDQKIVE WDSRKSKYFESKFKGRVRLDP QSGALYISKVQKEDNSTYIMR VLKKTGNEQEWKIKLQVLDPV PKPVIKIEKIEDMDDNCYLKL SCVIPGESVNYTWYGDKRPF KELQNSVLETTLMPHNYSRCY TCQVSNSVSSKNGTVCLSPPC TLARSSKYGPCCPPCPAPEFL GGPSVFLFPKPKDQLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLSGKEY KCKVSSKGLPSSIEKTI SNAT GQPREPQVYTLPPS QEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVLHEALHNHYTQKSLSLSL GKIEGRMDPSTLIQRHNNSSL NTRTQKARHCGHCPEEWITYS NSCYYIGKERRTWEESLLACT SKNSSLLSIDNEEEMKFSLSI SPSSWIGVFRNSSSHHPWVTMN GLAFKHEIKDSDNAELNCAVL QVNRLKSAQCGSSI IYHCKHK L (配列番号83)
---	---	---

10

20

30

40

50

【表 4-13】

マウスCD48 E CD: FQGHSPDI NATTGSNVT LKIHKDPLG PYKRITWLH TKNQKILEY NYNSTKTI ESEFKGRVY LEENNGALH ISNVRKEDK GTYYMRVLR ETENELKIT LEVFDPPVK PSIEINKTE ASTDSCHLR LSCEVKDQH VDYTWYESS GPFPPKSPG YVLDLIVTP QNKSTFYTC QVSNPVSSK NDTVYFTLP CDLARS (配列 番号82)	マウスNKG 2A ECD : TPYTEA KAQINS SMTRTH RDINYT LSSAQP CPHC PK EWSYS HNCYFI GMERKS WND SLV SCISK N CSLLYI DSEEEQ DFLQSL SLISWT GILRKG RGQPWV WKEDSI FKPKIA EILHDE CNCAMM SASGLT ADNCTT LHPYLC KCKFPI (配列番号5 8)	マウスCD48-Fc-NKG2Aキメラタン パク質: FQGHSPDINATTGSNVT LKI HKDPLGPYKRITWLHTKNQKI LEYNYNSTKTI FESEFKGRVY LEENNGALHISNVRKEDKGTY YMRVLRETENELKIT LEVFDPP VPKPSIEINKTEASTDSCHLR LSCEVKDQHVDTWYESSGPF PKKSPGYVLDLIVTPQNKSTF YTCQVSNPVSSKNDTVYFTLP CDLARSVPRDCGCKPCICTVP EVSSVFIFPPKPKDVLTTITLT PKVTCVVVDISKDDPEVQFSW FVDDVEVHTAQTQPREEQFNS TFRSVSELPIMHQDWLNGKEF KCRVNSAAFPAPIEKTISKTK GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKD KVS LTCMITDFFPEDITVEWQ WNGQPAENYKNTQPI MDTDGS YFVYSKLN VQKSNWEAGNTFT CSVLHEGLHNHHTEKSLSHSP GII EGRMDTPYTEAKAQINSS MTRTHRDINYTLSSAQP CPHC PKEWISYSHNCYFI GMERKSW NDSLVSCISKNC SLLYIDSEE EQDFLQSLSLISWTGILRKGR GQPWVWKEDSIFKPKIAEILH DECNCAMMSASGLTADNCTTL HPYLCKCKFPI (配列番号84)
--	---	---

10

20

30

40

50

【表 4-14】

ヒトSIRP α E CD: EEELQVIQPD DKSVLVAAAG ETATLRCTA TSLIPVGPI QWFRGAGPG RELIYNQKE GHFPRVTTV SDLTKRNNM DFSIRIGNI TPADAGTTY CVKFRKGS DDVEFKSGA GTELSVRAK PSAPVVSGP AARATPQHT VSFTCESHG FSPRDITLK WFKNGNELS DFQTNVDPV GESVSYSIH STAKVVLTR EDVHSQVIC EVAHVTLQG DPLRG TANL SETIRVPPT LEVTTQQPVR AENQVNVTC QVRKFYFQR LQLTWLENG NVSRTETAS TVTENKDGT YNWMSWLLV NVS AHRDDV KLTCQVEHD GQPAVSKSH DLKVS AHPK EQGSNTAAE NTGSNERNI Y (配列番号85)	ヒトNKG2 A ECD: PSTLIQ RHNNSS LNTRTQ KARHCG HCPEEW ITYSNS CYIIGK ERRTWE ESLLAC TSKNSS LLSIDN EEEMKF LSIISP SSWIGV FRNSSH HPWVTM NGLAFK HEIKDS DNAELN CAVLQV NRLKSA QCGSSI IYHCKH KL (配列番号57)	ヒトSIRP α -Fc-NKG2Aキメラタン パク質: EEELQVIQPDKSVLVAAAGETA TLRCTATSLIPVGPIQWFRGA GPGRELIYNQKEGHFPRVTTV SDLTKRNNMDFSIRIGNITPA DAGTTYCVKFRKGS PDDVEFK SGAGTELSVRAKPSAPVVSGP AARATPQHTVSFTCESHGFSP RDITLKWFKNGNELSDFQTNV DPVGESVSYSIHSTAKVVLTR EDVHSQVIC E VAHVTLQG DPL RG TANL SETIRVPPTLEVTTQQ PVRAENQVNVTCQVRKFYFQR LQLTWLENGNVSR TETASTVT ENKDGTYNWMSWLLVNVSAHR DDVKLTCQVEHDGQPAVSKSH DLKVS AHPKEQGSNTAAENTG SNERNIYSKYGP PCPPCPAPE FLGGPSVFLFPKPKDQLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLSGK EYKCKVSSSKGLPSSIEKTI SN ATGQPREPQVYTLPPS QEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVLHEALHNHYTQKSLSL SLGKIEGRMDPSTLIQRHNS SLNTRTQKARHCGHCPEEWIT YSNSCYIIGKERRTWEESLLA CTSKNSSLLSIDNEEEMKFLS IISPSSWIGVFRNSSSHHPWVT MNGLA FKHEIKDSDNAELNCA VLQVNRLKSAQCGSSI IYHCK HKL (配列番号86)
---	---	---

10

20

30

40

【0213】

本発明の一態様は、がんまたはウイルス感染の治療における薬剤としての本明細書に開示されるキメラタンパク質の使用である。

【0214】

本発明の別の態様は、薬剤の製造における、本明細書に開示されるキメラタンパク質の使用である。

【0215】

本発明のさらに別の態様は、本明細書に開示されるキメラタンパク質をコードする核酸を

50

含む発現ベクターである。

【0216】

一態様では、本発明は、本明細書に開示されるキメラタンパク質をコードする核酸を含む、発現ベクターを含む、宿主細胞を提供する。

【0217】

疾患、治療法、及び作用機序

本明細書に開示されるキメラタンパク質は、がんの治療及び／またはウイルス感染の治療に使用され得る。

【0218】

本発明の態様は、がんを治療するか、またはウイルス感染を治療する方法を提供する。本方法は、その治療を必要とする対象に、本明細書に開示されるキメラタンパク質、例えば、治療有効量のキメラタンパク質を含む、有効量の薬学的組成物を投与するステップを含む。

10

【0219】

免疫応答を強化するため、例えば、患者の抗腫瘍免疫応答を増強するために免疫刺激シグナル伝達を増強することが多くの場合に所望される。

【0220】

実施形態では、本発明は、がん及び／または腫瘍に関する、例えば、がん及び／または腫瘍の治療または予防に関する。本明細書の他の箇所に開示されるように、がんの治療は、実施形態では、免疫刺激シグナルを増加または活性化することに有利になるように、本発明のキメラタンパク質を用いて免疫系を調節することを伴う。実施形態では、方法は、未治療の対象、または膜貫通タンパク質、膜結合細胞外タンパク質、及び／またはそれらのそれぞれのリガンドもしくは受容体に指向する抗体により治療された対象と比較して、制御性T細胞（Treg）の量または活性を減少させる。実施形態では、方法は、未治療の対象、または膜貫通タンパク質、膜結合細胞外タンパク質、及び／またはそれらのそれぞれのリガンドもしくは受容体に指向する抗体により治療された対象と比較して、対象の流入領域リンパ節におけるエフェクターT細胞のプライミングを増加させる。実施形態では、方法は、未治療の対象、または膜貫通タンパク質、膜結合細胞外タンパク質、及び／またはそれらのそれぞれのリガンドもしくは受容体に指向する抗体により治療された対象と比較して、免疫抑制細胞の全体的な低減、及びより炎症性の腫瘍環境への移行をもたらす。

20

30

【0221】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫応答の振幅を調節すること、例えば、エフェクター出力のレベルを調節することが可能であるか、またはそれを含む方法で使用する事ができる。実施形態では、例えば、がんの治療に使用される場合、本発明のキメラタンパク質は、免疫阻害と比較して免疫刺激の程度を改変し、サイトカイン産生、増殖、または標的を殺傷する潜在性のレベルの増加を刺激することを含むが、これらに限定されないT細胞応答の振幅を増加させる。実施形態では、患者のT細胞は、キメラタンパク質によって、活性化及び／または刺激され、活性化T細胞がサイトカインを分離及び／または分泌することを可能とする。

40

【0222】

がんまたは腫瘍は、細胞の非制御な成長及び／または細胞生存の異常な増加及び／または身体の器官及びシステムの正常な機能を妨げるアポトーシスの阻害を指す。良性及び悪性がん、ポリープ、過形成、ならびに休止状態の腫瘍または微小転移巣が含まれる。また、免疫系によって妨げられない異常な増殖を有する細胞（例えば、ウイルス感染細胞）も含まれる。がんは、原発性癌または転移性癌であり得る。原発性癌は、臨床的に検出可能となる発生部位での領域のがん細胞であり得、原発性腫瘍であり得る。対照的に、転移性癌は、ある器官または部分から別の隣接していない器官または部分への疾患の拡散であり得る。転移性癌は、局所領域の周囲の正常組織に浸透して浸潤する能力を獲得し、局所転移であり得る新しい腫瘍を形成するがん細胞によって引き起こされ得る。がんはまた、リン

50

パ管及び／または血管の壁を貫通する能力を獲得するがん細胞によって引き起こされ得、その後、がん細胞は血流を通して循環し（それによって循環腫瘍細胞となる）、体内の他の部位及び組織に循環することが可能である。がんは、リンパ系または血行性拡散などのプロセスが原因となり得る。がんはまた、別の部位で静止し、管または壁を通して再浸透し、増殖し続け、別の臨床的に検出可能な腫瘍を最終的に形成する腫瘍細胞によって引き起こされ得る。がんは、この新しい腫瘍であり得、転移性（または続発性）腫瘍であり得る。

【0223】

がんは、転移した腫瘍細胞によって引き起こされ得、これは続発性または転移性腫瘍であり得る。腫瘍の細胞は、起源の腫瘍のものの様であり得る。例として、乳癌または結腸癌が肝臓に転移した場合、二次腫瘍は肝臓に存在するが、異常な肝臓細胞ではなく、異常な乳癌または結腸細胞で構成される。したがって、肝臓における腫瘍は、肝臓癌ではなく、転移性乳癌または転移性結腸癌であり得る。

10

【0224】

がんは、任意の組織が起源であり得る。がんは、黒色腫、結腸、乳房、または前立腺が起源であり得、したがって、元々はそれぞれ皮膚、結腸、乳房、または前立腺であった細胞で構成され得る。がんはまた、白血病またはリンパ腫であり得る、血液学的悪性腫瘍であり得る。がんは、肝臓、肺、膀胱、腸などの組織に浸潤し得る。

【0225】

本発明の代表的ながん及び／または腫瘍としては、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、AIDS関連リンパ腫、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、消化器系癌、頭頸部癌、腹膜癌、呼吸器系癌、泌尿器系癌、癌種、子宮頸部癌、絨毛癌、慢性リンパ芽球性白血病（CLL）、慢性骨髄芽球性白血病、結腸及び直腸癌、結合組織癌、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連する）、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽細胞腫、有毛細胞白血病、肝癌、ヘパトーム、上皮内新生物、腎臓もしくは腎臓癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌）、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫（NHL）を含むリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫（低グレード／濾胞NHL、高グレード免疫芽細胞NHL、高グレードリンパ芽球性NHL、高グレード小型非切れ込み核細胞性NHL、中間グレードびまん性NHL、中間グレード／濾胞性NHL、巨大病変NHL、及び小リンパ球性（SL）NHL）、マントル細胞リンパ腫、メーグス症候群、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌（唇、舌、口、及び咽頭）、卵巣癌、脾臓癌、移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに母斑症に関連する異常な血管増殖、前立腺癌、直腸癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宮もしくは子宮内膜癌、外陰癌、ならびにワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症からなる群から選択されるがんが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0226】

実施形態では、キメラタンパク質は、治療抵抗性癌を有する対象を治療するために使用される。実施形態では、キメラタンパク質は、1つ以上の免疫調節剤に対して抵抗性である対象を治療するために使用される。例えば、実施形態では、キメラタンパク質を使用して、約12週間の治療後、治療に応答しない、または進展しない対象を治療する。例えば、実施形態では、対象は、PD-1及び／またはPD-L1及び／またはPD-L2剤に抵抗性であり得、例えば、ニボルマブ（ONO-4538／BMS-936558、MDX1106、OPDIVO、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA、MERCCK）、ピディリズマブ（CT-011、CURE TECH）、MK-3475（MERCCK）、BMS 936559（BRISTOL MYERS SQUIBB）、イブルチニブ（PHARMACYCLICS／ABBVIE）、アテゾリズマブ（TECENTRIQ、GENENTECH）、及び／またはMPDL3280A（ROCHE）－抵抗性患者が含まれる。例えば、実施形態では、対象は、抗CTLA-4剤に抵抗性であり、例えば、イピリムマブ（YERVOY）－抵抗性患者

40

50

(例えば、黒色腫患者)である。したがって、実施形態では、本発明は、1つ以上の免疫調節剤の単剤療法を含む、様々な療法に非応答性である患者を救済するがん治療の方法を提供する。

【0227】

実施形態では、本発明は、腫瘍微小環境内の細胞または組織を標的とするキメラタンパク質を提供する。実施形態では、腫瘍微小環境内の細胞または組織は、キメラタンパク質の1つ以上の標的または結合パートナーを発現する。腫瘍微小環境は、腫瘍が存在する細胞、分泌タンパク質、生理学的小分子、及び血管を含む細胞環境を指す。実施形態では、腫瘍微小環境内の細胞または組織は、腫瘍血管系、腫瘍浸潤リンパ球、線維芽細胞、細網細胞、内皮前駆細胞(EPIC)、がん関連線維芽細胞、周皮細胞、他の間質細胞、細胞外マトリックス(ECM)の成分、樹状細胞、抗原提示細胞、T細胞、制御性T細胞、マクロファージ、好中球、及び腫瘍の近位に位置する他の免疫細胞のうちの1つ以上である。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、がん細胞を標的とする。実施形態では、がん細胞は、キメラタンパク質の1つ以上の標的または結合パートナーを発現する。

10

【0228】

実施形態では、本発明の方法は、追加の薬剤に抵抗性である患者における、キメラタンパク質による治療を提供し、本明細書の他の場所に開示されているかかる「追加の薬剤」は、本明細書に開示される様々な化学療法剤を含むがこれらに限定されない。

【0229】

制御性T細胞の活性化は、共刺激及び共抑制性シグナルによって決定的に影響を受ける。共刺激分子の2つの主要なファミリーには、B7及び腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーが含まれる。これらの分子は、それぞれCD28またはTNF受容体ファミリーに属するT細胞上の受容体と結合する。多くの明確に定義された共阻害剤及びその受容体は、B7及びCD28ファミリーに属する。

20

【0230】

実施形態では、免疫刺激シグナルは、免疫応答を増強するシグナルを指す。例えば、腫瘍学の脈絡では、かかるシグナルは、抗腫瘍免疫を強化し得る。例えば、これらに限定されないが、免疫刺激シグナルは、白血球の増殖、サイトカイン産生、殺傷活性、または食作用活性を直接的に刺激することによって特定され得る。詳細な例としては、受容体アゴニスト抗体またはかかる受容体(OX40L、LIGHT、4-1BBL、TL1Aのそれぞれ)のリガンドをコードするキメラタンパク質のいずれかを使用する、OX40、LTbR、4-1BB、またはTNFRSF25などのTNFスーパーファミリー受容体の直接的な刺激が挙げられる。これらの受容体のうちのいずれか1つからの刺激は、個々のT細胞サブセットの増殖及びサイトカイン産生を直接的に刺激し得る。別の例には、かかる免疫抑制細胞の活性を阻害する受容体を介した免疫阻害細胞の直接的な刺激が含まれる。これには、例えば、GITRアゴニスト抗体またはキメラタンパク質を含むGITRLによるCD4+FoxP3+制御性T細胞の刺激が含まれ、これらの制御性T細胞は、従来のCD4+またはCD8+T細胞の増殖を抑制する能力を減少させる。別の例では、これには、CD40アゴニスト抗体またはCD40Lを含むキメラタンパク質を使用する抗原提示細胞の表面上でのCD40の刺激が含まれ、B7またはTNFスーパーファミリーにおけるものを含む適切な天然共刺激分子との関連で抗原を提示するそれらの細胞の増強された能力を含む抗原提示細胞の活性化を引き起こす。別の例では、これには、キメラタンパク質を含むLIGHTを使用するリンパ球または間質細胞の表面上でのLTBRの刺激が含まれ、リンパ系細胞の活性化及び／または炎症誘発性サイトカインもしくはケモカインの産生を引き起こし、任意に腫瘍内で免疫応答をさらに刺激する。

30

40

【0231】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、免疫調節を増強、回復、促進、及び／または刺激することが可能であるか、またはそれらを含む方法での使用を見出す。実施形態では、本明細書に記載の本キメラタンパク質は、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、抗腫瘍マ

50

クロファージ（例えば、M1マクロファージ）、B細胞、及び樹状細胞を含むがこれらに限定されない腫瘍細胞に対する1つ以上の免疫細胞の活性または活性化を回復、促進、及び／または刺激する。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、非限定的な例として、生存促進シグナル、オートクリンもしくはパラクリン成長シグナル、p38 MAPK-、ERK-、STAT-、JAK-、AKT-、もしくはPI3Kを媒介したシグナル、抗アポトーシスシグナル、及び／または炎症誘発性サイトカイン産生もしくはT細胞遊走もしくはT細胞腫瘍浸潤のうちの1つ以上を促進する及び／または必要とするシグナルを含む、1つ以上のT細胞固有シグナルを活性化及び／または刺激することを含む、T細胞の活性及び／または活性化を増強、回復、促進、及び／または刺激する。

【0232】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、腫瘍または腫瘍微小環境へのT細胞（これらに限定されないが、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラーT（NK）細胞を含む）、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK）細胞、樹状細胞、単球、及びマクロファージ（例えば、M1及びM2のうちの1つ以上）のうちの1つ以上の増加を引き起こすことが可能であるか、またはそれらを含む方法での使用を見出す。実施形態では、キメラタンパク質は、CD8+T細胞、特に腫瘍微小環境に浸潤しているそれらのT細胞による腫瘍抗原の認識を増強する。実施形態では、キメラタンパク質は、CD19発現を誘導する、及び／またはCD19陽性細胞（例えば、CD19陽性B細胞）の数を増加させる。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、IL-15R α 発現を誘導する、及び／またはIL-15R α 陽性細胞（例えば、IL-15R α 陽性樹状細胞）の数を増加させる。

【0233】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、特に腫瘍及び／または腫瘍微小環境（TME）内で、免疫抑制細胞（例えば、骨髄由来抑制細胞（MDSC）、制御性T細胞（Treg）、腫瘍関連好中球（TAN）、M2マクロファージ、及び腫瘍関連マクロファージ（TAM））の低減を阻害及び／または引き起こすことが可能であるか、またはその方法での使用を見出す。実施形態では、本療法は、腫瘍部位及び／またはTMEにおけるM1対M2マクロファージの比率を改変し、M1マクロファージを支持することができる。

【0234】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、IFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-17F、及びIL-22のうちの1つ以上を含むがこれらに限定されない様々なサイトカインの血清レベルを増加させることが可能である。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、治療対象の血清中のIL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-22、TNF α 、またはIFN γ を増強することが可能である。実施形態では、本発明のキメラタンパク質を投与することは、TNF α 分泌を増強することが可能である。特定の実施形態では、本発明のキメラタンパク質を投与することは、白血球によるスーパー抗原を媒介したTNF α 分泌を増強することが可能である。かかるサイトカイン応答の検出は、示されるキメラタンパク質のための最適な投与レジメンを決定するための方法を提供し得る。

【0235】

本発明のキメラタンパク質では、キメラタンパク質は、CD4+及び／またはCD8+T細胞の亜集団の低減を増加または防止することが可能である。

【0236】

本発明のキメラタンパク質では、キメラタンパク質は、T細胞による腫瘍殺傷活性を増強することが可能である。

【0237】

実施形態では、本発明の異種キメラタンパク質は、抗腫瘍CD8+及び／またはCD4+T細胞の細胞死を阻害、遮断、及び／または減少させる、あるいは前腫瘍T細胞の細胞死

10

20

30

40

50

を刺激、誘導、及び／または増加させる。T細胞枯渇は、増殖及びエフェクター機能の進行性の喪失を特徴とするT細胞機能不全の状態であり、クローン欠失に至る。したがって、前腫瘍T細胞は、多くの慢性感染症、炎症性疾患、及びがんの間に生じるT細胞機能不全の状態を指す。この機能不全は、機能的エフェクターまたはメモリーT細胞とは異なる不十分な増殖、及び／またはエフェクター機能、阻害性受容体の持続的発現、及び転写状態によって定義される。消耗は、感染及び腫瘍の最適な制御を妨げる。例示的な前腫瘍T細胞には、これらに限定されないが、Treg、1つ以上のチェックポイント阻害性受容体を発現するCD4+及び／またはCD8+T細胞、Th2細胞、ならびにTh17細胞が含まれる。チェックポイント阻害性受容体は、非制御な免疫応答を防止または阻害する免疫細胞に発現する受容体を指す。対照的に、抗腫瘍CD8+及び／またはCD4+T細胞は、腫瘍に対する免疫応答を開始できるT細胞を指す。

10

【0238】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、エフェクターT細胞と制御性T細胞との比率を増加させることが可能であり、それを含む方法で使用する事ができる。例示的なエフェクターT細胞には、ICOS+エフェクターT細胞、細胞傷害性T細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3+、CD8+、CD45RO+）、CD4+エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3+、CD4+、CCR7+、CD62L高、IL-7R/CD127+）、CD8+エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3+、CD8+、CCR7+、CD62L高、IL-7R/CD127+）、エフェクターメモリーT細胞（例えば、CD62L低、CD44+、TCR、CD3+、IL-7R/CD127+、IL-15R+、CCR7低）、セントラルメモリーT細胞（例えば、CCR7+、CD62L+、CD27+、またはCCR7高、CD44+、CD62L高、TCR、CD3+、IL-7R/CD127+、IL-15R+）、CD62L+エフェクターT細胞、初期エフェクターメモリーT細胞（CD27+CD62L-）及び後期エフェクターメモリーT細胞（CD27-CD62L-）（それぞれTemE及びTemL）を含むCD8+エフェクターメモリーT細胞（TEM）、CD127（+）CD25（低/-）エフェクターT細胞、CD127（-）CD25（-）エフェクターT細胞、CD8+幹細胞メモリーエフェクター細胞（TSCM）（例えば、CD44（低）CD62L（高）CD122（高）sca（+））、TH1エフェクターT細胞（例えば、CXCR3+、CXCR6+、及びCCR5+、または $\alpha\beta$ TCR、CD3+、CD4+、IL-12R+、IFN γ R+、CXCR3+）、TH2エフェクターT細胞（例えば、CCR3+、CCR4+、及びCCR8+、または $\alpha\beta$ TCR、CD3+、CD4+、IL-4R+、IL-3R+、CCR4+、IL-17RB+、CRTH2+）、TH9エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3+、CD4+）、TH17エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3+、CD4+、IL-23R+、CCR6+、IL-1R+）、CD4+CD45RO+CCR7+エフェクターT細胞、CD4+CD45RO+CCR7（-）エフェクターT細胞、ならびにIL-2、IL-4、及び／またはIFN- γ を分泌するエフェクターT細胞が含まれる。例示的な制御性T細胞には、ICOS+制御性T細胞、CD4+CD25+FOXP3+制御性T細胞、CD4+CD25+制御性T細胞、CD4+CD25-制御性T細胞、CD4+CD25高制御性T細胞、TIM-3+PD-1+制御性T細胞、リンパ球活性化遺伝子-3（LAG-3）+制御性T細胞、CTLA-4/CD152+制御性T細胞、ニューロピリン-1（Nrp-1）+制御性T細胞、CCR4+CCR8+制御性T細胞、CD62L（L-セレクトリン）+制御性T細胞、CD45RB低制御性T細胞、CD127低制御性T細胞、LRRC32/GARP+制御性T細胞、CD39+制御性T細胞、GITR+制御性T細胞、LAP+制御性T細胞、1B11+制御性T細胞、BTLA+制御性T細胞、1型制御性T細胞（Tr1細胞）、Tヘルパー3型（Th3）細胞、ナチュラルキラーT細胞表現型（NK-Treg）の制御性細胞、CD8+制御性T細胞、CD8+CD28-制御性T細胞、及び／またはIL-10、IL-35、TGF- β 、TNF- α 、ガレクチン-1、IFN- γ 、及び／またはMCP1を分泌する制御性T細胞が含まれる。

20

30

40

50

【0239】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、エフェクターT細胞（例えば、CD4+CD25-T細胞）の増加を引き起こす。

【0240】

実施形態では、キメラタンパク質は、制御性T細胞（例えば、CD4+CD25+T細胞）の低減を引き起こす。

【0241】

実施形態では、キメラタンパク質は、再発を防止するか、もしくは動物を再発から保護すること、及び／または転移を防止するか、もしくは転移の可能性を減少させることができる記憶応答を生成する。したがって、キメラタンパク質により治療した動物は、キメラタンパク質による初期の治療後に再負荷した場合、後に腫瘍細胞を攻撃する、及び／または腫瘍発生を防ぐことが可能である。したがって、本発明のキメラタンパク質は、活性な腫瘍破壊、及びさらに腫瘍抗原の免疫認識の両方を刺激し、これらは、再発を防ぐことが可能である記憶応答をプログラミングするのに不可欠である。

10

【0242】

実施形態では、キメラタンパク質は、抗原提示細胞の活性化を引き起こすことが可能である。実施形態では、キメラタンパク質は、抗原提示細胞が抗原を提示する能力を増強することが可能である。

【0243】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、エフェクターT細胞を約12時間、約24時間、約48時間、約72時間、または約96時間、または約1週間、または約2週間より長く一過性に刺激することが可能であり、それを含む方法で使用するができる。実施形態では、エフェクターT細胞の一過性の刺激は、実質的に、患者の血流、または例えば、骨髄、リンパ節、脾臓、胸腺、粘膜関連リンパ組織（MALT）、非リンパ組織、もしくは腫瘍微小環境などのリンパ組織を含む特定の組織／位置で生じる。

20

【0244】

本発明のキメラタンパク質では、本発明のキメラタンパク質は予想外に、細胞外ドメイン成分の、それらのそれぞれの結合パートナーとの結合を遅いオフ速度（ K_d または K_{off} ）で提供する。実施形態では、これは、受容体とリガンド、及びその逆の予想外に長い相互作用を提供する。かかる効果は、より長い正のシグナル効果、例えば、免疫刺激シグナルの増加または活性化を可能にする。例えば、本発明のキメラタンパク質は、例えば、長いオフ速度結合を介して、免疫細胞増殖を提供するのに十分なシグナル伝達を可能とし、抗腫瘍攻撃を可能とし、刺激シグナル、例えばサイトカインの放出を提供するのに十分なシグナル伝達を可能とする。

30

【0245】

本発明のキメラタンパク質では、キメラタンパク質は、細胞間で安定性シナプスを形成することが可能である。キメラタンパク質によって促進される細胞の安定性シナプス（例えば、負のシグナルを保有する細胞間）は、腫瘍細胞を攻撃するようにT細胞を配置する、及び／または本発明のキメラタンパク質によって遮蔽されたものを越える負のシグナルを含む負のシグナルを腫瘍細胞が送達するのを立体的に防ぐなど、腫瘍の縮小に有利な空間的配向を提供する。実施形態では、これは、キメラタンパク質の血清 $t_{1/2}$ と比較して、より長い標的上の（例えば、腫瘍内）半減期（ $t_{1/2}$ ）を提供する。かかる特性は、キメラタンパク質の全身的な分布に関連する標的外毒性を減少させるという複合的な利点を有する可能性がある。

40

【0246】

実施形態では、キメラタンパク質は、持続的な免疫調節効果を提供することが可能である。

【0247】

本発明のキメラタンパク質は、2つの免疫療法剤の部位特異的相互作用を改善できるため、相乗的な治療効果（例えば、抗腫瘍効果）を提供する。実施形態では、本発明のキメラ

50

タンパク質は、オフサイト及び／または全身的な毒性を減少させる可能性を提供する。

【0248】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、増強された安全性プロファイルを示す。一実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、減少した毒性プロファイルを示す。例えば、本発明のキメラタンパク質の投与は、下痢、炎症（例えば、腸の）、体重低下などの副作用の減少をもたらす得、これらは、本発明のキメラタンパク質の細胞外ドメインによって標的化されるリガンド（複数可）／受容体（複数可）に指向する抗体の投与後に生じる。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、有効性を犠牲にすることなく、本発明のキメラタンパク質の細胞外ドメインによって標的化されるリガンド（複数可）／受容体（複数可）に指向する抗体と比較して、改善した安全性を提供する。

10

【0249】

実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、現在の免疫療法、例えば、本発明のキメラタンパク質の細胞外ドメインによって標的化されるリガンド（複数可）／受容体（複数可）に指向する抗体と比較して、減少した副作用、例えば、GI合併症を提供する。例示的なGI合併症には、腹痛、食欲不振、自己免疫効果、便秘、痙攣、脱水症、下痢、食事の問題、倦怠感、鼓腸、腹部または腹水における流体、胃腸（GI）腸内毒素症、GI粘膜炎症、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群（IBS-D及びIBS-C）、悪心、疼痛、便もしくは尿の変化、潰瘍性大腸炎、嘔吐、流体保持による体重増加、及び／または脱力感が含まれる。

【0250】

いくつかの態様では、本発明のキメラ薬剤は、1つ以上の感染症を治療するために使用される。実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、ウイルス感染症（例えば、HIV及びHCVを含む）を治療する方法で使用される。実施形態では、感染症は、免疫抑制を誘導する。例えば、HIV感染は、多くの場合、感染した対象において免疫抑制をもたらす。したがって、本明細書の他の場所に開示されるように、かかる感染症の治療は、実施形態では、免疫阻害を遮断または妨げるよりも免疫刺激に有利になるように、本発明のキメラタンパク質を用いて免疫系を調節することを伴う。

20

【0251】

実施形態では、本発明は、限定されないが、急性または慢性のウイルス感染、例えば、呼吸器、乳頭腫ウイルス感染、単純ヘルペスウイルス（HSV）感染、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、及び肝炎ウイルス感染などの内臓のウイルス感染を含む、ウイルス感染を治療する方法を提供する。実施形態では、ウイルス感染は、フラビウイルス科のメンバーによって引き起こされる。実施形態では、フラビウイルス科のメンバーは、黄熱病ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、及びC型肝炎ウイルスから選択される。実施形態では、ウイルス感染症は、ピコルナウイルス科のメンバー、例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルスによって引き起こされる。実施形態では、ウイルス感染は、オルトミキソウイルス科、例えば、インフルエンザウイルスによって引き起こされる。実施形態では、ウイルス感染は、レトロウイルス科、例えば、レンチウイルスによって引き起こされる。実施形態では、ウイルス感染は、パラミクソウイルス科、例えば、呼吸器合胞体ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ルブラウイルス（例えば、ムンプスウイルス）、麻疹ウイルス、及びヒトメタニューモウイルスによって引き起こされる。実施形態では、ウイルス感染は、ブニヤウイルス科のメンバー、例えば、ハンタウイルスによって引き起こされる。実施形態では、ウイルス感染は、レオウイルス科、例えば、ロタウイルスによって引き起こされる。

30

40

【0252】

併用療法及び複合

実施形態では、本発明は、対象に追加の薬剤を投与することをさらに含む、キメラタンパク質及び方法を提供する。実施形態では、本発明は、共投与及び／または共製剤に関する。本明細書に開示される組成物のいずれも、共製剤化及び／または共投与することができ

50

る。

【0253】

実施形態では、本明細書に開示される任意のキメラタンパク質は、別の薬剤と共投与された場合に相乗的に作用し、かかる薬剤が単剤療法として使用される場合に、一般的に利用される用量よりも低い用量で投与される。実施形態では、本明細書で参照される任意の薬剤は、本明細書に開示されるキメラタンパク質のうちのいずれかと組み合わせて使用され得る。

【0254】

本発明の一態様は、治療を必要とする対象においてがんまたはウイルス感染を治療するための方法であって、治療有効量の本明細書に開示されるキメラタンパク質を含む、第1の薬学的組成物を対象に提供することと、CTL A-4と結合することが可能である抗体、またはPD-1もしくはPD-1リガンドと結合することが可能であり、PD-1とそのリガンドのうちの1つ以上との相互作用を阻害することが可能である抗体を含む、第2の薬学的組成物を対象に提供することと、を含む方法を提供する。

10

【0255】

本発明の別の態様は、対象においてがんまたはウイルス感染を治療するための方法であって、本明細書に開示されるキメラタンパク質を含む薬学的組成物を対象に提供することを含む、方法を提供する。この態様では、対象は、CTL A-4と結合することが可能である抗体、またはPD-1もしくはPD-1リガンドと結合することが可能であり、PD-1とそのリガンドのうちの1つ以上との相互作用を阻害することが可能である抗体による治療を受けたことがあるか、または受けている。

20

【0256】

本発明のさらに別の態様は、対象においてがんを治療するための方法であって、CTL A-4と結合することが可能である抗体、あるいはPD-1もしくはPD-1リガンドと結合することが可能であり、PD-1とそのリガンドの1つ以上との相互作用を阻害することが可能である抗体を含む薬学的組成物を対象に提供することを含む、方法を提供する。この態様では、対象は、本明細書に開示されるキメラタンパク質による治療を受けたことがあるか、または受けている。

【0257】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、第1の薬学的組成物及び第2の薬学的組成物は、同時に提供される。

30

【0258】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、第1の薬学的組成物は、第2の薬学的組成物が提供された後に提供される。

【0259】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、第1の薬学的組成物は、第2の薬学的組成物が提供される前に提供される。

【0260】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、第1の薬学的組成物の用量が、第2の薬学的組成物による治療を受けたことがないか、または受けていない対象に提供される第1の薬学的組成物の用量よりも少ない。

40

【0261】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、提供される第2の薬学的組成物の用量が、第1の薬学的組成物による治療を受けたことがないか、または受けていない対象に提供される第2の薬学的組成物の用量よりも少ない。

【0262】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、対象に提供される薬学的組成物の用量は、PD-1もしくはPD-1リガンドと結合することが可能である抗体による治療を受けたことがないか、または受けていない、あるいはCTL A-4と結合することが可能である抗体による治療を受けたことがないか、または受けていない対象に提供される薬学的

50

組成物の用量よりも少ない。

【0263】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、対象は、第1の薬学的組成物による治療のみを受けたことがあるか、またはそれのみを受けている対象と比較した場合、増加した生存の見込み、体重増加、腫瘍サイズもしくはがん有病率の減少、及び／またはウイルス負荷／ウイルス感染細胞の減少を有する。

【0264】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、対象は、第2の薬学的組成物による治療のみを受けたことがあるか、またはそれのみを受けている対象と比較した場合、増加した生存の見込み、体重増加、腫瘍サイズもしくはがん有病率の減少、及び／またはウイルス負荷／ウイルス感染細胞の減少を有する。

10

【0265】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、対象は、PD-1と結合するか、もしくはPD-1リガンドと結合することが可能である抗体、またはCTLA-4と結合することが可能である抗体による治療を受けたことがないか、または受けていない対象と比較した場合、増加した生存の見込み、体重増加、腫瘍サイズもしくはがん有病率の減少、及び／またはウイルス負荷／ウイルス感染細胞の減少を有する。

【0266】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、対象は、PD-1と結合するか、またはPD-1リガンドと結合することが可能である抗体、またはCTLA-4と結合することが可能である抗体を含む治療に対して、不十分な応答性であるか、または抵抗性であるがんまたはウイルス感染を有する。

20

【0267】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、リンカーは、柔軟なアミノ酸配列、IgGヒンジ領域、及び抗体配列から選択されるポリペプチドである。任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、リンカーは、ジスルフィド結合を形成することが可能である少なくとも1つのシステイン残基を含み、及び／またはヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインを含む。任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、リンカー及び／または領域リンカーは、IgG4、例えば、ヒトIgG4に由来するヒンジーCH₂-CH₃ Fcドメインを含む。任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、リンカーは、配列番号1、配列番号2、または配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0268】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、異種キメラタンパク質は、本明細書に開示されるような「CD80-Fc-NKG2A」、「CD86-Fc-NKG2A」、「CD58-Fc-NKG2A」、「PD-1-Fc-NKG2A」、「SLAMF6-Fc-NKG2A」、「SIRPα-Fc-NKG2A」、「TGFB β -Fc-NKG2A」、または「CD48-Fc-NKG2A」である。

【0269】

本明細書に開示される任意の態様の実施形態では、PD-1またはPD-1リガンドと結合することが可能である抗体は、ニボルマブ（ONO 4538、BMS 936558、MDX1106、OPDIVO（Bristol Myers Squibb））、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA／MK 3475、Merck）、ピディリズマブ（CT 011、Cure Tech）、RMP1-14、AGEN2034（Agenus）、及びセミプリマブ（REGN-2810）からなる群から選択される。かかる抗体は、PD-1とそのリガンドのうちの1つ以上との相互作用を阻害することが可能である。

40

【0270】

本明細書に開示される任意の態様の実施形態では、CTLA-4と結合することが可能である抗体は、YERVOY（イピリムマブ）、9D9、トレメリマブ（旧チシリマブ

50

、CP-675, 206; MedImmune)、AGEN1884、及びRG2077からなる群から選択される。

【0271】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、対象は、PD-1と結合するか、またはPD-1リガンドと結合することが可能である抗体、またはCTLA-4と結合することが可能である抗体を含む治療に対して、不十分な応答性であるか、または抵抗性であるがんまたはウイルス感染を有する。

【0272】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、がんまたはウイルス感染は、PD-1と結合するか、もしくはPD-1リガンドと結合することが可能である抗体、またはCTLA-4と結合することが可能である抗体による治療に対して、かかる治療の約12週間後に不十分な応答性であるか、または非応答性である。

【0273】

実施形態では、がんへの適用を含むがこれらに限定されず、本発明の追加の薬剤は、PD-1及びPD-L1もしくはPD-L2、及び／またはPD-1とPD-L1もしくはPD-L2との結合を遮断、減少、及び／または阻害する薬剤（非限定的な例として、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA、Merck）、ピディリズマブ（CT-011、CURE TECH）、MK-3475（MERCK）、BMS 936559（BRISTOL MYERS SQUIBB）、アテゾリズマブ（TECENTRIQ、GENENTECH）、MPDL3280A（ROCHE）のうちの1つ以上）、CD137（4-1BB）及び／またはCD137（4-1BB）と4-1BBリガンドのうちの1つ以上との結合を増加及び／または刺激する薬剤（非限定的な例として、ウレルマブ（BMS-663513及び抗4-1BB抗体））、及びCTLA-4の活性及び／またはCTLA-4とAP2M1、CD80、CD86、SHP-2、及びPPP2R5Aの1つ以上との結合、及び／またはOX40とOX40Lとの結合を遮断、減少、及び／または阻害する薬剤（非限定的な例として、GBR830（GLENMARK）、MEDI6469（MEDIMMUNE））から選択される1つ以上の免疫調節剤である。

【0274】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を媒介することが可能である。実施形態では、抗体は、セツキシマブ（Eli Lilly and Co）、ダラツムマブ（Genmab）、ガチポツズマブ（Glycotope）、マルゲツキシマブ（Raven biotechnologies）、モガムリズマブ（Kyowa Kirin International PLC）、MEDI-551またはイネビリズマブ（MedImmune）、MOR208またはタファシタマブ（MorphoSys AG）、オカラツズマブ（Creative BioLabs）、GAZYVA（登録商標）またはオビヌツズマブ（Roche）、RO5083945またはGA201（Creative BioLabs）、リツキシマブ（Genentech）、トラスツズマブ（Roche）、TrasGEX（Glycotope）、トムゾツキシマブ（Glycotope）、及びユブリツキシマブ（TG Therapeutics）からなる群から選択される。

【0275】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、抗体は、腫瘍抗原に結合することが可能である。実施形態では、抗体は、セツキシマブ（Eli Lilly and Co）、ダラツムマブ（Genmab）、ガチポツズマブ（Glycotope）、マルゲツキシマブ（Raven biotechnologies）、モガムリズマブ（Kyowa Kirin International PLC）、MEDI-551またはイネビリズマブ（MedImmune）、MOR208またはタファシタマブ（MorphoSys AG）、オカラツズマブ（Creative BioLabs）、GAZYVA（登

録商標) またはオビヌツズマブ (Roche)、RO5083945 またはGA201 (Creative BioLabs)、リツキシマブ (Genentech)、トラスツズマブ (Roche)、TrasGEX (Glycotope)、トムゾツキシマブ (Glycotope)、及びユブリツキシマブ (TG Therapeutics) からなる群から選択される。

【0276】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、対象が、腫瘍抗原と結合することが可能である抗体、及び／または抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を媒介することが可能である抗体を含む治療に対して、不十分な応答性であるか、または抵抗性であるがんもしくはウイルス感染を有する。

10

【0277】

任意の本明細書に開示される態様の実施形態では、がんまたはウイルス感染は、腫瘍抗原に結合することが可能である抗体による治療に対して不十分な応答性であるか、または非応答性であり、及び／または抗体が、かかる治療の約12週間後に、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を媒介することが可能である。

【0278】

実施形態では、本明細書に開示されるキメラタンパク質 (及び／または追加の薬剤) は、修飾された誘導体、すなわち、共有結合が組成物の活性を妨げないように、組成物への任意の種類の分子の共有結合によって修飾した誘導体を含む。例えば、限定されないが、誘導体には、とりわけ、グリコシル化、脂質化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などによって修飾されている組成物が含まれる。特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、トゥリカマイシンの代謝合成などを含むがこれらに限定されない既知の技術によって、多数の化学修飾のうちのいずれかを実行することができる。さらに、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含有することができる。さらに他の実施形態では、本明細書に開示されるキメラタンパク質 (及び／または追加の薬剤) は、例示的な実施形態において、毒素、化学療法剤、放射性同位元素、及びアポトーシスまたは細胞死を引き起こす薬剤を含む、細胞傷害性薬剤をさらに含む。かかる薬剤は、本明細書に開示される組成物に複合化され得る。

20

【0279】

したがって、本明細書に開示されるキメラタンパク質 (及び／または追加の薬剤) は、翻訳後に修飾して、化学リンカーなどのエフェクター部分、例えば、蛍光色素、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質、及び化学発光部分などの検出可能な部分、または例えば、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、細胞毒素、細胞傷害性薬剤、及び放射性物質などの機能的部分を追加することができる。

30

【0280】

薬学的組成物

本発明の態様は、治療有効量の本明細書に開示されるキメラタンパク質を含む薬学的組成物を含む。

【0281】

本明細書に開示されるキメラタンパク質 (及び／または追加の薬剤) は、十分に塩基性の官能基を保有することができ、それは、無機、有機、またはカルボキシル基と反応することができ、無機または有機塩基と反応して、薬学的に許容される塩を形成することができる。薬学的に許容される酸付加塩は、当該技術分野で周知であるように、薬学的に許容される酸から形成される。かかる塩には、例えば、Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977) 及びThe Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002 に列挙されている薬学的に許容される塩が含まれ、これらは、参照によりその全体が本明細

40

50

書に組み込まれる。

【0282】

実施形態では、本明細書に開示される組成物は、薬学的に許容される塩の形態である。

【0283】

さらに、本明細書に開示される任意のキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）は、組成物、例えば、薬学的に許容される担体またはビヒクルを含む薬学的組成物の成分として対象に投与することができる。かかる薬学的組成物は、適切な投与のための形態を提供するために、任意で、好適な量の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。薬学的賦形剤は、水、及び例えばピーナツ油、ダイズ油、鉱物油、ゴマ油といった石油、動物、植物、もしくは合成起源のものを含む油などの液体であり得る。薬学的賦形剤は、例えば、食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンのり、タルク、ケラチン、コロイダルシリカ、尿素、及び類似物であり得る。加えて、助剤、安定剤、増粘剤、滑沢剤、及び着色剤を使用することができる。一実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、対象に投与される場合に無菌である。水は、本明細書に開示される任意の薬剤が静脈内投与される場合に有用な賦形剤である。食塩水溶液ならびにデキストロース及びグリセロールの水溶液はまた、特に注入溶液のために液体賦形剤として用いられ得る。好適な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなども含まれる。本明細書に開示される任意の薬剤は、必要に応じて、少量の湿潤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。

10

20

【0284】

実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、薬学的組成物は、生理食塩水緩衝液（TBS、PBSなどを含むがこれらに限定されない）に再懸濁される。

【0285】

実施形態では、キメラタンパク質は、半減期を延長するか、さもなければ薬力学的及び薬物動態学的特性を改善するために、別の薬剤と複合化及び／または融合することができる。実施形態では、キメラタンパク質は、PEG、XTEN（例えば、rPEGとして）、ポリシアル酸（POLYXEN）、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミンまたはHAS）、エラスチン様タンパク質（ELP）、PAS、HAP、GLK、CTP、トランスフェリンなどのうちの1つ以上と融合または複合化され得る。実施形態では、個々のキメラタンパク質の各々は、BioDrugs（2015）29：215－239に記載される薬剤のうちの1つ以上と融合されており、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0286】

本発明は、薬学的組成物の様々な製剤において開示されるキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）を含む。本明細書に開示されるいずれのキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）も、溶液、懸濁液、乳剤、液滴、錠剤、丸薬、ペレット、カプセル、液体を含むカプセル、粉末、徐放性製剤、坐剤、乳濁液、エアロゾル、スプレー、懸濁液、または使用に好適な他の任意の形態をとることができる。タンパク質配列をコードするDNAまたはRNA構築物も使用することができる。実施形態では、組成物は、カプセルの形態である（例えば、米国特許第5,698,155号を参照されたい）。好適な薬学的添加剤の他の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences 1447－1676（Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed. 1995）（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

40

【0287】

必要に応じて、キメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）を含む薬学的組成物は、可溶化剤を含むこともできる。また、薬剤は、当技術分野で既知である好適なビヒクルまたは送達デバイスを用いて送達することができる。本明細書に概説される併用療法は、単一の送達ビヒクルまたは送達デバイスで共送達することができる。投与用の組成物は、任意

50

で、注入の部位における疼痛を緩和するために、例えば、リグノカインなどの局所麻酔薬を含むことができる。

【0288】

本発明のキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）を含む薬学的組成物は、単位剤形で好都合に提示することができ、薬学の分野で周知である方法のいずれかによって調製することができる。かかる方法は一般に、治療剤を1つ以上の副成分を構成する担体と会合させるステップを含む。典型的には、薬学的組成物は、治療剤を液体担体、細かく分割した固体担体、またはその両方と会合させることによって均一かつ密接に調製され、次に必要に応じて、生成物を所望の製剤の剤形に成形する（例えば、湿式または乾式造粒、粉末ブレンドなど、その後、当技術分野で既知である従来の方法を使用して錠剤化する）。

10

【0289】

実施形態では、本明細書に開示される任意のキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）は、本明細書に開示される投与様式に適合した薬学的組成物として、慣例の手順に従って製剤化される。

【0290】

投与、用量、及び治療レジメン

例として、投与は血流中に本明細書に開示されるキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）の放出をもたらすか（経腸または非経口投与を介して）、または代替的にキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）は、活性疾患の部位に直接的に投与される。

【0291】

非経口投与に好適な剤形としては、例えば、溶液、懸濁液、分散液、乳濁液などが挙げられる。それらはまた、使用直前に無菌の注入可能な培地に溶解または懸濁することができる、無菌の固体組成物（例えば、凍結乾燥組成物）の形態で製造され得る。それらは、例えば、当技術分野で既知である懸濁剤または分散剤を含み得る。

20

【0292】

本明細書に開示される任意のキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）の投与量、ならびに投薬スケジュールは、治療される疾患、対象の総体的な健康状態、及び投与する医師の裁量を含むがこれらに限定されない様々なパラメータに依存し得る。

【0293】

本明細書に開示される任意のキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）の投与量は、状態の重症度、状態を治療していたかまたは予防していたかどうか、治療する対象の年齢、体重、健康状態など、いくつかの要因に依存し得る。さらに、特定の対象に関する薬理ゲノミクス（治療上の薬物動態、薬力学、または有効性プロファイルに対する遺伝子型の影響）情報は、使用される投与量に影響し得る。さらに、正確な個々の投与量は、投与される薬剤の特定の組み合わせ、投与の期間、投与の経路、製剤の性質、排泄率、治療される特定の疾患、障害の重症度、及び障害の解剖学的位置を含む、様々な要因に応じて若干調整することができる。投与量のいくつかの変動が予想され得る。

30

【0294】

別の実施形態では、送達は、小胞、特にリポソームであり得る（Langer, 1990, Science 249:1527-1533, Treat et al., Liposomes in Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)を参照されたい。

40

【0295】

本明細書に開示されるキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）は、制御放出または持続放出手段によって、または当業者に周知である送達デバイスによって投与することができる。例には、これらに限定されないが、米国特許第3,845,770号、同第3,916,899号、同第3,536,809号、同第3,598,123号、同第4,008,719号、同第5,674,533号、同第5,059,595号、同第5,591,767号、同第5,120,548号、同第5,073,543号、同第5,639

50

、476号、同第5,354,556号、及び同第5,733,556号に記載されているものが含まれ、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。かかる剤形は、様々な割合で所望の放出プロファイルを提供するために、例えば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム、多層コーティング、微小粒子、リポソーム、ミクロスフェア、またはこれらの組み合わせを使用して、1つ以上の活性成分を制御放出または持続放出を提供するために有用であり得る。活性成分の制御または持続放出は、pHの変化、温度の変化、適切な波長の光による刺激、酵素の濃度もしくは利用能、水の濃度もしくは利用能、または他の生理学的条件もしくは化合物を含むがこれらに限定されない様々な条件によって刺激することができる。

10

【0296】

別の実施形態では、高分子材料を使用することができる (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)、Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)、Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたく、さらにLevy et al., 1985, Science 228:190、During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351、Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105も参照されたい)。

20

【0297】

別の実施形態では、制御放出系は、治療される標的領域の近くに配置され得、したがって全身用量のほんの一画分を必要とし得る (例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 上記のvol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい)。Langer, 1990, Science 249:1527-1533による総説で議論されている他の制御放出系を使用することができる。

【0298】

本明細書に開示される任意のキメラタンパク質 (及び／または追加の薬剤) を利用する投与レジメンは、対象の型、種、年齢、体重、性別、医学的状态、治療される状態の重症度、投与の経路、対象の腎機能または肝機能、個人の薬理ゲノミクス構成、及び利用される本発明の特定の化合物など、様々な要因に応じて選択され得る。本明細書に開示される任意のキメラタンパク質 (及び／または追加の薬剤) は、1日1回用量で投与され得るか、または総1日用量が、1日2回、3回、4回の分割用量で投与され得る。さらに、本明細書に開示される任意のキメラタンパク質 (及び／または追加の薬剤) は、投与レジメン全体を通して断続的ではなく継続的に投与され得る。

30

【0299】

細胞及び核酸

本発明の態様は、本明細書に開示されるようなキメラタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。発現ベクターは、本明細書に開示されるキメラタンパク質をコードする核酸を含む。実施形態では、発現ベクターは、DNAまたはRNAを含む。実施形態では、発現ベクターは、哺乳動物発現ベクターである。

40

【0300】

構築物は、3つの断片をコードする核酸 (I型膜貫通タンパク質の細胞外ドメインまたは膜結合細胞外タンパク質の一部、それに続くリンカー配列、それに続くII型膜貫通タンパク質、例えば、NKG2Aの細胞外ドメイン) をベクター (プラスミド、ウイルス、またはその他) にクローニングすることによって生成でき、完全な配列のアミノ末端は、I型膜貫通タンパク質を含有する分子の「左側」に対応しており、膜結合細胞外タンパク質

50

の一部及び完全な配列のカルボキシ末端は、II型膜貫通タンパク質、例えば、NKGAの細胞外ドメインを含有する分子の「右側」に対応する。実施形態では、上記に記載されるように、他の構成の1つを有するキメラタンパク質の構築物は、生成される翻訳されたキメラタンパク質が所望の構成、例えば、二重の内向きのキメラタンパク質を有するように、3つの核酸を含むであろう。したがって、実施形態では、キメラタンパク質は、そのように操作される。

【0301】

原核生物及び真核生物の両方のベクターは、キメラタンパク質の発現に使用することができる。原核生物ベクターには、E. coli配列に基づく構築物が含まれる（例えば、Makrides, Microbiol Rev 1996, 60:512-538を参照されたい）。E. coliでの発現のために使用することができる制御性領域の非限定的な例として、lac、trp、lpp、phoA、recA、tac、T3、T7、及びλPLが挙げられる。原核生物発現ベクターの非限定的な例としては、λgt11などのλgtベクターシリーズ（Huynh et al., in "DNA Cloning Techniques, Vol. I: A Practical Approach," 1984, (D. Glover, ed.), pp. 49-78, IRL Press, Oxford）、及びpETベクターシリーズ（Studier et al., Methods Enzymol 1990, 185:60-89）を挙げることができる。しかしながら、原核生物宿主-ベクター系は、哺乳類細胞の翻訳後プロセッシングの多くを実行できない。したがって、真核生物宿主-ベクター系は、特に有用であり得る。様々な制御性領域は、哺乳動物宿主細胞におけるキメラタンパク質の発現に使用することができる。例えば、SV40初期及び後期プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター、及びラウス肉腫ウイルス末端反復配列（RSV-LTR）プロモーターを使用できる。哺乳動物細胞において有用であり得る誘導性プロモーターには、限定されないが、メタロチオネインII遺伝子、マウス乳癌ウイルス糖質コルチコイド応答性末端反復配列（MMTV-LTR）、β-インターフェロン遺伝子、及びhsp70遺伝子に関連するプロモーターが含まれる（例えば、Williams et al., Cancer Res 1989, 49:2735-42、及びTaylor et al., Mol Cell Biol 1990, 10:165-75を参照されたい）。熱ショックプロモーターまたはストレスプロモーターもまた、組換え宿主細胞におけるキメラタンパク質の発現を駆動するために有利であり得る。

【0302】

実施形態では、本発明の発現ベクターは、哺乳動物細胞において機能的である、発現制御領域またはその補体に作動可能に連結された、キメラタンパク質またはその補体をコードする核酸を含む。発現制御領域は、発現ベクターを用いて形質転換されたヒト細胞において遮断及び／または刺激媒介物が生成されるように、作動可能に連結された遮断及び／または刺激媒介物をコードする核酸の発現を駆動することができる。

【0303】

発現制御領域は、プロモーター及びエンハンサーなどの制御性ポリヌクレオチド（本明細書では要素と称されることもある）であり、作動可能に連結された核酸の発現に影響を与える。本発明の発現ベクターの制御領域は、ヒト細胞において作動可能に連結されたコード化核酸を発現することができる。実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。別の実施形態では、細胞は、非腫瘍細胞である。実施形態では、発現制御領域は、作動可能に連結された核酸に制御可能な発現を付与する。シグナル（刺激と称されることもある）は、かかる発現制御領域に作動可能に連結された核酸の発現を増加または低減させることができる。シグナルに応答して発現を増加させるかかる発現制御領域は、誘導可能と称されることが多い。シグナルに応答して発現を低減させるかかる発現制御領域は、抑制可能と称されることが多い。通常、かかる要素によって付与される増加または低減の量は、存在するシグナルの量に比例し、シグナルの量が多いほど、発現の増加または低減が大きくなる。

【0304】

実施形態では、本発明は、合図に応答して一過性で高レベルの発現をもたらすことが可能である誘導性プロモーターの使用を企図する。例えば、腫瘍細胞の近くにある場合、かかる発現制御配列を含むキメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）の発現ベクターで形質転換された細胞は、形質転換された細胞を適切な合図に曝露することによって、高レベルの薬剤を一過性に生成するように誘導される。例示的な誘導性発現制御領域には、低分子化学化合物などの合図で刺激される誘導性プロモーターを含む領域が含まれる。特定の例は、例えば、米国特許第5,989,910号、同第5,935,934号、同第6,015,709号、及び同第6,004,941号に見出すことができ、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0305】

発現制御領域及び遺伝子座制御領域には、天然のプロモーター及びエンハンサー要素などの全長プロモーター配列、ならびに全長または非バリエーション機能の全部もしくは一部を保持する、部分配列またはポリヌクレオチドバリエーションが含まれる。本明細書で使用される場合、「機能的」という用語及びその文法的変形は、核酸配列、部分配列、または断片に関して使用される場合、その配列が天然核酸配列（例えば、非バリエーションまたは非修飾配列）の1つ以上の機能を有することを意味する。

【0306】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結する」とは、それらが意図した様式で機能することを可能にするように記載された構成要素の物理的並置を指す。核酸と作動可能に連結する発現制御要素の例では、制御要素が核酸の発現を調節するような関係である。典型的には、転写を調節する発現制御領域は、転写される核酸の5'末端近く（すなわち、「上流」）に並置する。発現制御領域はまた、転写される配列の3'末端（すなわち、「下流」）または転写物内（例えば、イントロン内）に位置し得る。発現制御要素は、転写される配列から離れた距離に位置し得る（例えば、核酸から100～500、500～1000、2000～5000、またはそれ以上のヌクレオチド）。発現制御要素の特定の例はプロモーターであり、これは通常、転写される配列の5'に位置する。発現制御要素の別の例は、転写される配列の5'もしくは3'、または転写される配列内に位置し得るエンハンサーである。

20

【0307】

ヒト細胞で機能する発現系は当該技術分野で周知であり、これらにはウイルス系が含まれる。一般に、ヒト細胞で機能するプロモーターは、哺乳動物RNAポリメラーゼと結合し、コード配列のmRNAへの下流（3'）転写を開始することが可能である任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端の近位に配置される転写開始領域と、典型的に、転写開始部位の25～30塩基対上流に位置するTATAボックスを有する。TATAボックスは、RNAポリメラーゼIIに正確な部位でRNA合成を開始するように指示すると考えられている。プロモーターはまた、典型的に、TATAボックスの上流の100～200塩基対内に典型的に位置する上流プロモーター要素（エンハンサー要素）も含むであろう。上流プロモーター要素は、転写が開始される比率を決定し、どちらの配向にも作用することができる。プロモーターとして特に使用されるのは、ウイルス遺伝子が多くの場合高度に発現され、広い宿主範囲を有するため、哺乳動物ウイルス遺伝子からのプロモーターである。例には、SV40初期プロモーター、マウス乳癌ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーター、CMVプロモーターなどが含まれる。

30

40

【0308】

典型的には、哺乳動物細胞によって認識される転写終結及びポリアデニル化配列は、翻訳終止コドンの3'に位置する制御性領域であり、したがって、プロモーター要素と一緒に、コード配列に隣接する。成熟mRNAの3'末端は、部位特異的な翻訳後切断及びポリアデニル化によって形成される。転写ターミネーター及びポリアデニル化シグナルの例には、SV40に由来するものが含まれる。イントロンはまた、発現構築物に含まれ得る。

50

【0309】

核酸を生細胞に導入するために使用可能な様々な技術が存在する。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の移入に好適な技術には、リボソームの使用、電気穿孔、微量注入、細胞融合、ポリマー系システム、DEAE-デキストラン、ウイルス形質導入、リン酸カルシウム沈降法などが含まれる。インビボでの遺伝子導入のために、リボソーム、キトサン及びゼラチンなどの天然ポリマー系送達ビヒクル、インビボでの形質導入にさらに好適であるウイルスベクターを含む多くの技術及び試薬も使用され得る。いくつかの状況では、腫瘍細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体またはリガンドなどの標的化剤を提供することが望ましい。リボソームが用いられる場合、エンドサイトーシスと関連付けられた細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、例えば、特定の細胞型に向性のカプシドタンパク質またはその断片、循環中の内部化を受けるタンパク質の抗体、細胞内限局化を標的とし、細胞内半減期を強化するタンパク質を標的とするため、及び／またはそれらの取り込みを促進するために使用され得る。受容体を媒介したエンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987)、及びWagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)に記載される。

10

【0310】

必要に応じて、例えば、組み込み配列などの遺伝子送達剤を利用することもできる。多数の組み込み配列が当技術分野で既知である（例えば、Nunes-Duby et al., Nucleic Acids Res. 26:391-406, 1998、Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357, 1986、Bestor, Cell, 122(3):322-325, 2005、Plasterk et al., TIG 15:326-332, 1999、Kootstra et al., Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003を参照されたい）。これらには、リコンビナーゼ及びトランスポザーゼが含まれる。例には、Cre (Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981)、ラムダ (Nash, Nature, 247, 543-545, 1974)、Flp (Broach, et al., Cell, 29:227-234, 1982)、R (Matsuzaki, et al., J. Bacteriology, 172:610-618, 1990)、cpc31 (例えば、Groth et al., J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004を参照されたい)、スリーピングビューティ、マリナーファミリーのトランスポザーゼ (Plasterk et al., 前述)、ならびにレトロウイルスまたはレンチウイルスのLTR配列及びAAVのLTR配列など、ウイルス組み込みを提供する成分を有するAAV、レトロウイルス、及びアンチウイルスなどのウイルスを組み込むための成分 (Kootstra et al., Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)が含まれる。さらに、直接的及び標的遺伝子組み込み戦略を使用して、CRISPR/CAS9、ジンクフィンガー、TALEN、及びメガヌクレアーゼ遺伝子編集技術を含むキメラ融合タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができる。

20

30

【0311】

実施形態では、キメラタンパク質（及び／または追加の薬剤）の発現のための発現ベクターは、ウイルスベクターである。遺伝子治療に有用な多くのウイルスベクターが既知である（例えば、Lundstrom, Trends Biotechnol., 21:117, 122, 2003を参照されたい）。例示的なウイルスベクターには、アンチウイルス (LV)、レトロウイルス (RV)、アデノウイルス (AV)、アデノ随伴ウイルス (AAV)、及びαウイルスから選択されるものが含まれるが、他のウイルスベクターも使用され得る。インビボでの使用について、αウイルス及びアデノウイルスなど、宿主ゲノムに組み込まれないウイルスベクターが使用に好適である。αウイルスの例示的な種類には、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎 (VEE) ウイルス、及びセムリキ森林ウイルス (SFV) が含まれる。インビトロでの使用について、レトロウイルス、AAV、

40

50

アンチウイルスなど、宿主ゲノムに組み込まれるウイルスベクターが好適である。実施形態では、本発明は、インビボで固形腫瘍を本発明のウイルスベクターと接触させることを含む、インビボでのヒト細胞を形質導入する方法を提供する。

【0312】

本発明の態様は、本明細書に開示される任意のキメラタンパク質を含む発現ベクターを含む宿主細胞を含む。

【0313】

発現ベクターは、本発明のキメラタンパク質を生成するために宿主細胞に導入され得る。細胞は、例えば、インビトロで培養され得るか、または遺伝子操作され得る。有用な哺乳動物宿主細胞には、ヒト、サル、及びげっ歯類に由来する細胞が含まれるが、これらに限定されない（例えば、Kriegler in “Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual,” 1990, New York, Freeman & Co. を参照されたい）。これらには、SV40によって形質転換されたサル腎臓細胞株（例えば、COS-7、ATCC CRL 1651）、ヒト胎児腎臓株（例えば、293、293-EBNA、または浮遊培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham et al., J Gen Virol 1977, 36:59）、仔ハムスター腎臓細胞（例えば、BHK、ATCC CCL 10）、チャイニーズハムスター卵巢細胞-DHFR（例えば、CHO、Urlaub and Chasin, Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:4216）、DG44 CHO細胞、CHO-K1細胞、マウスセルトリ細胞（Mather, Biol Reprod 1980, 23:243-251）、マウス線維芽細胞（例えば、NIH-3T3）、サル腎臓細胞（例えば、CV1 ATCC CCL 70）、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、VERO-76、ATCC CRL-1587）、ヒト子宮頸癌細胞（例えば、HELA、ATCC CCL 2）、イヌ腎臓細胞（例えば、MDCK、ATCC CCL 34）、バッファローラット肝臓細胞（例えば、BRL 3A、ATCC CRL 1442）、ヒト肺細胞（例えば、W138、ATCC CCL 75）、ヒト肝臓細胞（例えば、Hep G2、HB 8065）、及びマウス乳腺腫瘍細胞（例えば、MMT 060562、ATCC CCL 51）が含まれる。本明細書に開示されるキメラタンパク質を発現するための例示的ながん細胞型には、マウス線維芽細胞株、NIH3T3、マウスルイス肺癌細胞株、LLC、マウス肥満細胞腫細胞株、P815、マウスリンパ腫細胞株、EL4及びその卵白アルブミン形質移入体、E.G7、マウスメラノーマ細胞株、B16F10、マウス線維肉腫細胞株、MC57、ならびにヒト小細胞肺癌細胞株、SCLC番号2及びSCLC番号7が含まれる。

【0314】

宿主細胞は、健康なヒト、がん患者、及び感染性疾患を有する患者を含む正常または罹患した対象から、民間研究所の寄託、American Type Culture Collection (ATCC) などの公的な培養物収集、または商業的供給業元から得ることができる。

【0315】

インビトロ、エクスピボ、及び／またはインビボで、本発明のキメラタンパク質の生成に使用することができる細胞には、これらに限定されないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞；様々な幹または前駆細胞、特に造血幹または前駆細胞（例えば、骨髄から得られるもの）、臍帯血、末梢血、及び胎児肝臓が含まれる。細胞型の選択は、治療もしくは予防されている腫瘍または感染症の種類に依存し、当業者によって決定することができる。

【0316】

Fcを含む巨大分子（モノクローナル抗体など）の生成及び精製は、生成物間でわずかな修飾を伴い、標準化されたプロセスとなった。例えば、多くのFcを含む巨大分子は、ヒト胎児腎臓（HEK）細胞（またはそのバリエーション）もしくはチャイニーズハムスター卵

10

20

30

40

50

巢（CHO）細胞（またはそのバリエーション）によって、またはいくつかの事例では細菌または合成法によって生成される。生成後、HEKまたはCHO細胞によって分泌されるFcを含む巨大分子は、プロテインAカラムと結合することを介して精製され、それに続く様々な方法を使用して「洗練」される。一般的に言えば、精製されたFcを含む巨大分子は、液体の形態で一定期間保存され、長期間凍結されるか、またはいくつかの事例では凍結乾燥される。実施形態では、本明細書で企図されるキメラタンパク質の生成は、従来のFcを含む巨大分子と比較して、固有の特徴を有し得る。特定の例では、キメラタンパク質は、特定のクロマトグラフィ樹脂を使用するか、またはプロテインAの捕捉に依存しないクロマトグラフィ法を使用して精製することができる。実施形態では、キメラタンパク質は、オリゴマー状態または複数のオリゴマー状態で精製され得、特定の方法を使用して特定のオリゴマー状態について濃縮され得る。理論に拘束されることなく、これらの方法には、特定の塩濃度、pH、及び添加剤組成を含む特定の緩衝液による処理が含まれ得る。他の例では、かかる方法は、あるオリゴマー状態を別のものよりも有利に処理することを含み得る。本明細書で得られたキメラタンパク質は、当技術分野で指定されている方法を使用してさらに「洗練」することができる。実施形態では、キメラタンパク質は、非常に安定性であり、広範囲のpH曝露（pH 3～12の間）に耐えることが可能であり、多数の凍結／解凍ストレス（3回を超える凍結／解凍サイクル）に耐えることが可能であり、高温での長時間の培養（40℃で2週間を超える）に耐えることが可能である。実施形態では、キメラタンパク質は、かかるストレス条件下で、分解、脱アミド化などの証拠を伴わず、無傷のままであることが示されている。

10

20

【0317】

対象及び／または動物

実施形態では、対象及び／または動物は、哺乳動物、例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ウサギ、ヒツジ、またはサル、チンパンジー、もしくはヒヒなどの非ヒト霊長類である。実施形態では、対象及び／または動物は、例えば、ゼブラフィッシュなどの非哺乳動物である。実施形態では、対象及び／または動物は、蛍光標識された細胞（例えば、GFPを有する）を含み得る。実施形態では、対象及び／または動物は、蛍光細胞を含むトランスジェニック動物である。

【0318】

実施形態では、対象及び／または動物は、ヒトである。実施形態では、ヒトは、小児のヒトである。実施形態では、ヒトは、成人のヒトである。実施形態では、ヒトは、老齢期のヒトである。実施形態では、ヒトは、患者と称され得る。

30

【0319】

特定の実施形態では、ヒトは、約0ヶ月～約6ヶ月、約6～約12ヶ月、生後約6～約18ヶ月、生後約18～約36ヶ月、生後約1～約5歳、生後約5～約10歳、約10～約15歳、約15～約20歳、約20～約25歳、約25～約30歳、約30～約35歳、約35～約40歳、約40～約45歳、約45～約50歳、約50～約55歳、約55～約60歳、約60～約65歳、約65～約70歳、約70～約75歳、約75～約80歳、約80～約85歳、約85～約90歳、約90～約95歳、または約95～約100歳の範囲の年齢を有する。

40

【0320】

実施形態では、対象は、非ヒト動物であり、したがって、本発明は獣医学的使用に対する。特定の実施形態では、非ヒト動物は、家庭用ペットである。別の特定の実施形態では、非ヒト動物は、家畜である。

【0321】

キット及び医薬品

本発明の態様は、本明細書に開示される任意の薬剤の投与を単純化することができるキットを提供する。

【0322】

本発明の例示的なキットは、単位剤形で本明細書に開示される任意のキメラタンパク質及

50

び／または薬学的組成物を含む。実施形態では、単位剤形は、本明細書に開示される任意の薬剤、及び薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、またはビヒクルを含む、無菌であり得る予め充填されたシリンジなどの容器である。キットは、本明細書に開示される任意の薬剤の使用を指示するラベルまたは印刷された説明書をさらに含むことができる。キットは、開眼器、局所麻酔剤、及び投与位置に対する洗浄剤をさらに含む得る。キットは、本明細書に開示される1つ以上の追加の薬剤をさらに含む得る。実施形態では、キットは、有効量の本発明の組成物及び有効量の別の組成物、例えば、本明細書に開示されるものなどを含む容器を含む。

【0323】

本発明の態様は、医薬品、例えば、がんの治療及び／またはウイルス感染の治療のための医薬品の製造における、本明細書に開示されるようなキメラタンパク質の使用を含む。

10

【0324】

本発明の別の態様は、薬剤の製造における、本明細書に開示されるキメラタンパク質の使用である。

【0325】

本明細書に開示される任意の態様または実施形態は、本明細書に開示される任意の他の態様または実施形態と組み合わせることができる。

【0326】

本発明は、以下の実施例でさらに記載されるが、これらは、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

20

【実施例】

【0327】

本明細書の実施例は、本技術の利点及び利点を示し、本技術のキメラタンパク質の調製または使用を当業者がさらに支援するために提供される。本技術の好ましい態様をより完全に示すために、本明細書の実施例も提示される。実施例は、添付の特許請求の範囲によって定義されるように、本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。実施例は、上述の本技術の変形例、態様、または実施形態のうちのいずれかを含むか、または組み込むことができる。上述の変形例、態様または実施形態はまた、本技術の任意のまたはすべての他の変形例、態様もしくは実施形態の変形例をさらに含むか、または組み込むことができる。

30

【0328】

実施例1. 例示的なCD86及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け
ネズミCD86及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。「mCD86-Fc-NKG2A」構築物は、IgG1に由来するヒンジーCH2-CH3 Fcドメインを介してネズミNKG2AのECDに融合されたネズミCD86の細胞外ドメイン(ECD)を含む。図2Aを参照されたい。

【0329】

構築物をチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞での発現のためにコドン最適化し、CHO細胞にトランスフェクトし、個々のクローンを高発現のために選択した。次いで、高発現クローンを、無血清培地中で、攪拌バイオリアクターでの小規模製造に使用し、関連するキメラ融合タンパク質をプロテインA結合樹脂カラムで精製した。

40

【0330】

mCD86-Fc-NKG2A構築物を293個の細胞で一過性に発現し、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料(すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した)を、(i)脱グリコシル化されていない還元試料(すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した)、及び(ii)還元及び脱グリコシル化試料(すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した)と比較した。加えて、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在

50

を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗CD86抗体（図2B、左プロット）、抗Fc抗体（図2B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図2B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図2B、各プロットにおけるレーン2）、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図2B、各プロットにおけるレーン3）。図2B（各プロットにおけるレーン4）に示すように、キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約69kDaの予測分子量でモノマーとして機能した。

【0331】

実施例2. ELISAを使用したmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性のさらなる特徴付け

機能的ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）を実行して、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の異なるドメインのそれぞれの結合パートナーとの結合親和性を実証した。図3Aに示すように、2つの異なる合成から得られたmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質（バッチ1及びバッチ2）のFc部分の結合を、キメラタンパク質をプレートに結合したマウスIgG Fcγ抗体に捕捉し、HRP複合抗マウスFc抗体を介して検出することによって特徴付けた。マウス総IgGを使用して標準曲線を生成した。

【0332】

図3Bに示すように、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質（バッチ1及びバッチ2）のNKG2Aドメインの結合を、プレートに結合したHLAクラスI組織適合性抗原、α鎖E（HLA-E）に捕捉し、HRP複合抗マウスFc抗体を介して検出することによって特徴付けた。図3Bに示すデータは、mCD86-Fc-NKG2AのNKG2Aドメインが、その結合パートナーと濃度依存的に、かつ高い親和性で効果的に相互作用したことを実証する。

【0333】

図3Cに示すように、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質（バッチ1及びバッチ2）のCD86ドメインの結合を、プレートに結合したmCTLA-4に捕捉し、HRP複合抗マウスFc抗体を介して検出することによって特徴付けた。図3Cに示すデータは、バッチ1のmCD86-Fc-NKG2AのCD86ドメインが、その結合パートナーと濃度依存的に、かつ高い親和性で効果的に相互作用したが、バッチ2の相互作用の効率はそれよりも低かったことを実証する。

【0334】

実施例3. 例示的なCD80及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け
ネズミCD80及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。「mCD80-Fc-NKG2A」構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してネズミNKG2AのECDに融合されたネズミCD80の細胞外ドメイン（ECD）を含む。図4Aを参照されたい。

【0335】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0336】

mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗CD80抗体（図4B、左プロット）、抗Fc抗体（図4B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図4B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロットは、

10

20

30

40

50

非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図4B、各プロットにおけるレーン2）、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図4B、各プロットにおけるレーン3）。図4B（各プロットにおけるレーン4）に示すように、キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約67kDaの予測分子量でモノマーとして機能した。

【0337】

実施例4．ELISAを使用したmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性のさらなる特徴付け

機能的ELISAを実行して、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の異なるドメインの、それらのそれぞれの結合パートナーとの結合親和性を実証した。図5Aに示すように、2つの異なる合成から得られたmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質（バッチ1及びバッチ2）のFc部分の結合を、キメラタンパク質をプレートに結合したマウスIgG Fcγ抗体に捕捉し、HRP複合抗マウスFc抗体を介して検出することによって特徴付けた。マウス総IgGを使用して標準曲線を生成した。

【0338】

図5Bに示すように、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質（バッチ1及びバッチ2）のNKG2Aドメインの結合を、プレートに結合したHLA-Eに捕捉し、HRP複合抗マウスFc抗体を介して検出することによって特徴付けた。図5Bに示すデータは、mCD80-Fc-NKG2AのNKG2Aドメインが、その結合パートナーと濃度依存的に効果的に相互作用したことを実証する。

【0339】

CD80は、少なくともT細胞表面上の2つの異なるタンパク質のリガンドであるため、CD28（自己調節及び細胞間会合のため）及びCTLA-4（調節及び細胞解離の減衰のため）において、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD80ドメインの親和性を、CD28及びCTLA-4のそれぞれについて特徴付けた。図5C及び図5Dに示すように、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質（バッチ1及びバッチ2）のCD80ドメインの結合は、プレートに結合したmCD28（図5C）及びプレートに結合したmCTLA-4（図5D）にそれぞれ捕捉し、HRP複合抗マウスFc抗体を介して検出することによって特徴付けた。図5C及び図5Dに示すデータは、mCD80-Fc-NKG2AのCD80ドメインが、その結合パートナー（CD28及びCTLA-4）と、濃度依存的に、かつ高い親和性で効果的に相互作用し、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD28よりもCTLA-4に対してより大きな親和性を有していたことを実証する。

【0340】

実施例5．例示的なCD48及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け
ネズミCD48及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。「mCD48-Fc-NKG2A」構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してネズミNKG2AのECDに融合されたネズミCD48の細胞外ドメイン（ECD）を含む。図6Aを参照されたい。

【0341】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0342】

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗C

D 4 8 抗体（図 6 B、左プロット）、抗 F c 抗体（図 6 B、中央プロット）、または抗 N K G 2 A 抗体（図 6 B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図 6 B、各プロットにおけるレーン 2）、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図 6 B、各プロットにおけるレーン 3）。図 6 B（各プロットにおけるレーン 4）に示すように、キメラタンパク質は、還元剤（ β -メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約 66 kDa の予測分子量でモノマーとして機能した。

【0343】

実施例 6. E L I S A を使用した m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性のさらなる特徴付け

機能的 E L I S A アッセイを実行して、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の異なるドメインの、それらのそれぞれの結合パートナーとの結合親和性を実証した。図 7 A に示すように、2 つの異なる合成から得られた m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質（バッチ 1 及びバッチ 2）の F c 部分の結合は、キメラタンパク質をプレートに結合したマウス I g G F c γ 抗体に捕捉し、H R P 複合抗マウス F c 抗体を介して検出することによって特徴付けた。マウス総 I g G を使用して標準曲線を生成した。

【0344】

図 7 B に示すように、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質（バッチ 1 及びバッチ 2）の N K G 2 A ドメインの結合は、プレートに結合した H L A - E に捕捉し、抗ヤギ H R P 抗体と併せて抗 m C D 4 8 抗体を使用して検出することによって特徴付けた。図 7 B に示すデータは、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A の N K G 2 A ドメインが、その結合パートナーと濃度依存的に効果的に相互作用したことを実証する。また、図 7 B は、m C D 8 6 - F c - N K G 2 A（バッチ 1）の N K G 2 A ドメインの、H L A - E への結合を示す。

【0345】

C D 4 8 は、リガンド C D 2 に対する親和性が低く、リガンド 2 B 4（C D 2 4 4）に対する親和性が高く、ナチュラルキラー細胞（N K 細胞）及び他の白血球上で発現する I g S F の C D 2 サブファミリー S L A M のメンバーでもあることが分かっていた。C D 4 8 は少なくとも 2 つの既知のリガンドを有するため、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の C D 4 8 ドメインの親和性を、C D 2 及び 2 B 4 のそれぞれについて特徴付けた。図 7 C 及び図 7 D に示すように、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質（バッチ 1 及びバッチ 2）の C D 4 8 ドメインの結合を、プレートに結合した m C D 2（図 7 C）及びプレートに結合した m 2 B 4（図 7 D）にそれぞれ捕捉し、H R P 複合抗マウス F c 抗体を介して検出することによって特徴付けた。図 7 C 及び図 7 D に示すデータは、予想どおり、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A の C D 4 8 ドメインが、その結合パートナー（C D 2 及び 2 B 4）と、濃度依存的に効果的に相互作用し、m C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が C D 2 よりも 2 B 4 に対してより大きな親和性を有していたことを実証する。バッチ間の結合能の変動が観察された。

【0346】

実施例 7. 例示的な P D - 1 及び N K G 2 A 系キメラタンパク質の構築及び特徴付け
ネズミ P D - 1 及び N K G 2 A 系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。「h P D - 1 - F c - h N K G 2 A」構築物は、I g G 1 に由来するヒンジ - C H 2 - C H 3 F c ドメインを介してヒト N K G 2 A の E C D に融合されたヒトプログラム細胞死タンパク質 1（P D - 1）の細胞外ドメイン（E C D）を含んでいた。図 8 A を参照されたい。

【0347】

構築物を発現させ、実施例 1 に記載されるように精製した。

【0348】

h P D - 1 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、S D S の存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なし

10

20

30

40

50

に煮沸した)を、(i)脱グリコシル化されていない還元試料(すなわち、 β -メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した)、及び(ii)還元及び脱グリコシル化試料(すなわち、 β -メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した)と比較した。加えて、hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗PD-1抗体(図8B、左プロット)、抗Fc抗体(図8B、中央プロット)、または抗NKG2A抗体(図8B、右プロット)を使用してプローブした。ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し(図8B、各プロットにおけるレーン2)、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された(図8B、各プロットにおけるレーン3)。図8B(各プロットにおけるレーン4)に示すように、キメラタンパク質は、還元剤(β -メルカプトエタノール)及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約58kDaの予測分子量でモノマーとして機能した。

10

【0349】

実施例8：ELISAを使用したhPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性のさらなる特徴付け

機能的ELISAを実行して、hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質の異なるドメインの、それらのそれぞれの結合パートナーとの結合親和性を実証した。図9Aに示すように、hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質のFc部分の結合は、キメラタンパク質をプレートに結合したマウスIgG Fc γ 抗体に捕捉し、HRP複合抗マウスFc抗体を介して検出することによって特徴付した。マウス総IgGを使用して標準曲線を生成した。

20

【0350】

図9Bに示すように、hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質のNKG2ADメインの結合を、プレートに結合したPD-L1に捕捉し、抗6X His-HRP抗体と併せて抗ヒトHLA-E抗体を使用して検出することによって特徴付けた。図9Bに示すデータは、hPD-1-Fc-hNKG2AのPD-1ドメインが、その結合パートナーと濃度依存的に効果的に相互作用したことを示す。

【0351】

図9C及び図9Dに示すように、hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質のhNKG2ADメインの結合を、それぞれ、プレートに結合したHLA-Eに捕捉することによって特徴付けた。図9Cにおいて、hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質を、HRP複合抗マウスFc抗体と併せて抗ヒトPD-1抗体を使用して検出した。図9Dにおいて、hPD-1-Fc-hNKG2Aキメラタンパク質を、HRP複合抗マウスFc抗体を介して直接検出した。図9C及び図9Dに示すデータは、hPD-1-Fc-hNKG2AのhNKG2ADメインが、その結合パートナーと相互作用したことを示す。図9Cには、抗PD-1抗体を使用したmCD86-Fc-NKG2A(バッチ1)結合の検出の不在も示されており、mCD86-Fc-NKG2AはPD-1含有ドメインを欠いているため、この結果が予想された。

30

【0352】

実施例9：非変性PAGEを使用した例示的なキメラタンパク質の特徴付け

実施例1～8に開示されるキメラタンパク質を、SDSを欠くネイティブPAGEで実行した場合、還元剤が存在しない場合、キメラタンパク質は二量体として存在するように見える。図10A及び図10Bを参照されたい。理論に拘束されることを望まないが、ジスルフィド結合を形成することが可能であるシステイン残基を含むFcベースのリンカーを含むキメラタンパク質は、キメラタンパク質の二量体化を促進する原因であると思われる。さらに、実施例1～8の例示的なキメラタンパク質はいずれも、三量体化するTNFRSFリガンドを含まないため、キメラタンパク質はいずれも、六量体としては存在しないように見えた。

40

【0353】

50

実施例 10：免疫チェックポイント分子及び例示的なキメラタンパク質に指向する抗体の特定の組み合わせの機能的なインビボでの抗腫瘍活性
腫瘍体積を標的にして減少させるための本発明の免疫チェックポイント分子に指向する抗体及びキメラタンパク質の特定の組み合わせのインビボでの能力を決定した。

【0354】

マウスにMC38（結腸直腸癌）腫瘍細胞を接種した。接種の6日後、マウスの開始腫瘍体積の間に有意差は無く、すなわち、体積は約60mm³であった。次いで、図11A～図11Eに示すスケジュールに従って（すなわち、6日目、11日目、14日目、及び17日目に）、処理を開始した。特定の組み合わせ：抗CTLA-4抗体（9D9）、抗PD-1抗体（RMP1-14）、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び抗CTLA-4抗体、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び抗CTLA-4抗体、またはビヒクルが含まれた。抗体を、100µg腹腔内注射（IP）注射として示された時点で投与し、キメラタンパク質を、6日目、11日目、14日目、及び17日目に、150µgのIP注射として与えた。腫瘍サイズを、接種後20日目まで1日おきにアッセイした。

10

【0355】

図11A～図11Eに示されるように、キメラタンパク質は、比較的低用量で、MC38細胞において抗腫瘍有効性を有していた。データはさらに、抗CTLA-4抗体との組み合わせ有効性の可能性を示唆している。図11Aに示すデータは、図11B～図11Eに示すデータを集約したものである。

20

【0356】

同様のセットの実験では、MC38腫瘍細胞を接種したマウス、及びキメラタンパク質と抗PD-1抗体との組み合わせをアッセイする。

【0357】

さらに、マウスにCT26（結腸癌）腫瘍細胞を接種し、抗CTLA-4抗体または抗PD-1抗体の有無にかかわらずキメラタンパク質による処理による抗がん効果をアッセイする。

【0358】

実施例 11：例示的なヒトCD86及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

30

ヒトCD86及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してヒトNKG2Aの細胞外ドメイン（ECD）に融合されたヒトCD86の細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図12Aを参照されたい。

【0359】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0360】

hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗CD86抗体（図12B、左プロット）、抗Fc抗体（図12B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図12B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図12B）。図12Bに示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーン

40

50

における優性二量体バンドの存在を示し（図 1 2 B、各プロットにおけるレーン N R）、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図 1 2 B、各プロットにおけるレーン R）。キメラタンパク質は、還元剤（ β -メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約 6 7 k D a の予測分子量でモノマーとして機能した（図 1 2 B、各プロットにおけるレーン D G）。これらの結果は、h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

【 0 3 6 1 】

実施例 1 2：例示的なヒト C D 4 8 及び N K G 2 A 系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

ヒト C D 4 8 及び N K G 2 A 系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質構築物は、I g G 1 に由来するヒンジャー C H 2 - C H 3 F c ドメインを介してヒト N K G 2 A の細胞外ドメイン（E C D）に融合されたヒト C D 4 8 の細胞外ドメイン（E C D）を含んでいた。図 1 3 A を参照されたい。

【 0 3 6 2 】

構築物を発現させ、実施例 1 に記載されるように精製した。

【 0 3 6 3 】

h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、S D S の存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、 β -メルカプトエタノールのみで処理し、S D S の存在下で煮沸した）、及び（i i）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、 β -メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、S D S の存在下で煮沸した）と比較した。加えて、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを 3 回に分けて実行し、抗 C D 4 8 抗体（図 1 3 B、左プロット）、抗 F c 抗体（図 1 3 B、中央プロット）、または抗 N K G 2 A 抗体（図 1 3 B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の 2 つの E C D ドメイン及び F c リンカーの存在を、2 つの E C D ドメイン及び F c リンカーに特異的な抗体で確認した（図 1 3 B）。図 1 3 B に示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図 1 3 B、各プロットにおけるレーン N R）、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図 1 3 B、各プロットにおけるレーン R）。キメラタンパク質は、還元剤（ β -メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約 6 7 k D a の予測分子量でモノマーとして機能した（図 1 3 B、各プロットにおけるレーン D G）。これらの結果は、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

【 0 3 6 4 】

実施例 1 3：例示的なヒト C D 5 8 及び N K G 2 A 系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

ヒト C D 5 8 及び N K G 2 A 系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質構築物は、I g G 1 に由来するヒンジャー C H 2 - C H 3 F c ドメインを介してヒト N K G 2 A の細胞外ドメイン（E C D）に融合されたヒト C D 5 8 の細胞外ドメイン（E C D）を含んでいた。図 1 4 A を参照されたい。

【 0 3 6 5 】

構築物を発現させ、実施例 1 に記載されるように精製した。

【 0 3 6 6 】

h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、S D S の存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、 β -メルカプトエタノールのみで処理し、S D S の存在下で煮沸した）、及び（i i）還元及び脱グリ

コシル化試料（すなわち、 β -メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗CD58抗体（図14B、左プロット）、抗Fc抗体（図14B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図14B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図14B）。図14Bに示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図14B、各プロットにおけるレーンNR）、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図14B、各プロットにおけるレーンR）。キメラタンパク質は、還元剤（ β -メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約67kDaの予測分子量でモノマーとして機能した（図14B、各プロットにおけるレーンDG）。これらの結果は、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

10

【0367】

実施例14：例示的なヒトCD80及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

ヒトCD80及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してヒトNKG2Aの細胞外ドメイン（ECD）に融合されたヒトCD80の細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図15Aを参照されたい。

20

【0368】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0369】

hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、 β -メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、 β -メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗CD80抗体（図15B、左プロット）、抗Fc抗体（図15B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図15B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図15B）。図15Bに示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図15B、各プロットにおけるレーンNR）、これは還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図15B、各プロットにおけるレーンR）。キメラタンパク質は、還元剤（ β -メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約67kDaの予測分子量でモノマーとして機能した（図15B、各プロットにおけるレーンDG）。これらの結果は、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

30

40

【0370】

実施例15：例示的なヒトSLAMF6及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

ヒトSLAMF6及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。hSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してヒトNKG2Aの細胞外ドメイン（ECD）に

50

融合されたヒトSLAMF6の細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図16Aを参照されたい。

【0371】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0372】

hSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、hSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗SLAMF6抗体（図16B、左プロット）、抗Fc抗体（図16B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図16B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、hSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図16B）。図16Bに示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図16B、各プロットにおけるレーンNR）、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図16B、各プロットにおけるレーンR）。キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約67kDaの予測分子量でモノマーとして機能した（図16B、各プロットにおけるレーンDG）。これらの結果は、hSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

【0373】

実施例16：例示的なマウスCD80及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

マウスCD80及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してマウスNKG2Aの細胞外ドメイン（ECD）に融合されたマウスCD80の細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図17Aを参照されたい。

【0374】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0375】

mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗CD80抗体（図17B、左プロット）、抗Fc抗体（図17B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図17B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図17B）。図17Bに示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図17B、各プロットにおけるレーンNR）、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図17B、各プロットにおけるレーンR）。キメラタンパク質は、還元剤（β-メル

カプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約 67 kDa の予測分子量でモノマーとして機能した（図 17 B、各プロットにおけるレーン D G）。これらの結果は、mCD80-Fc-NKG2A キメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

【0376】

実施例 17：例示的なマウス CD86 及び NKG2A 系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

マウス CD86 及び NKG2A 系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。mCD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質構築物は、IgG1 に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fc ドメインを介してマウス NKG2A の細胞外ドメイン（ECD）に融合されたマウス CD86 の細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図 18 A を参照されたい。

10

【0377】

構築物を発現させ、実施例 1 に記載されるように精製した。

【0378】

mCD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDS の存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDS の存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDS の存在下で煮沸した）と比較した。加えて、mCD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを 3 回に分けて実行し、抗 CD86 抗体（図 18 B、左プロット）、抗 Fc 抗体（図 18 B、中央プロット）、または抗 NKG2A 抗体（図 18 B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、mCD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質の 2 つの ECD ドメイン及び Fc リンカーの存在を、2 つの ECD ドメイン及び Fc リンカーに特異的な抗体で確認した（図 18 B）。図 18 B に示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図 18 B、各プロットにおけるレーン NR）、これは還元剤 β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図 18 B、各プロットにおけるレーン R）。キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約 67 kDa の予測分子量でモノマーとして機能した（図 18 B、各プロットにおけるレーン D G）。これらの結果は、mCD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

20

30

【0379】

実施例 18：例示的なマウス PD-1 及び NKG2A 系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

マウス PD-1 及び NKG2A 系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。mPD-1-Fc-NKG2A キメラタンパク質構築物は、IgG1 に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fc ドメインを介してマウス NKG2A の細胞外ドメイン（ECD）に融合されたマウス PD-1 の細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図 19 A を参照されたい。

40

【0380】

構築物を発現させ、実施例 1 に記載されるように精製した。

【0381】

mPD-1-Fc-NKG2A キメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDS の存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDS の存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理

50

し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗PD-1抗体（図19B、左プロット）、抗Fc抗体（図19B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図19B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図19B）。図19Bに示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図19B、各プロットにおけるレーンNR）、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図19B、各プロットにおけるレーンR）。キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約67kDaの予測分子量でモノマーとして機能した（図19B、各プロットにおけるレーンDG）。これらの結果は、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

10

【0382】

実施例19：例示的なSIRPα及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け
マウスSIRPα及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してマウスNKG2Aの細胞外ドメイン（ECD）に融合されたSIRPαの細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図20Aを参照されたい。

20

【0383】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0384】

SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗SIRPα抗体（図20B、左プロット）、抗Fc抗体（図20B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図20B、右プロット）を使用してプローブした。ウエスタンブロット分析を実行して、SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図20B）。図20Bに示すように、ウエスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図20B、各プロットにおけるレーンNR）、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図20B、各プロットにおけるレーンR）。キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約67kDaの予測分子量でモノマーとして機能した（図20B、各プロットにおけるレーンDG）。これらの結果は、SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

30

40

【0385】

実施例20：例示的なTGFB R2及びNKG2A系キメラタンパク質の構築及び特徴付け

マウスTGFB R2及びNKG2A系キメラタンパク質をコードする構築物を生成した。TGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質構築物は、IgG1に由来するヒンジ-CH2-CH3 Fcドメインを介してマウスNKG2Aの細胞外ドメイン（ECD）に融合されたマウスTGFB R2の細胞外ドメイン（ECD）を含んでいた。図21Aを

50

参照されたい。

【0386】

構築物を発現させ、実施例1に記載されるように精製した。

【0387】

mTGFBR2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の天然構造を理解するために、未処理の変性試料（すなわち、SDSの存在下で、還元剤または脱グリコシル化剤による処理なしに煮沸した）を、（i）脱グリコシル化されていない還元試料（すなわち、β-メルカプトエタノールのみで処理し、SDSの存在下で煮沸した）、及び（ii）還元及び脱グリコシル化試料（すなわち、β-メルカプトエタノール及び脱グリコシル化剤の両方で処理し、SDSの存在下で煮沸した）と比較した。加えて、TGFBR2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各ドメインの存在を確認するために、ゲルを3回に分けて実行し、抗TGFBR2抗体（図21B、左プロット）、抗Fc抗体（図21B、中央プロット）、または抗NKG2A抗体（図21B、右プロット）を使用してプローブした。ウェスタンブロット分析を実行して、TGFBR2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の2つのECDドメイン及びFcリンカーの存在を、2つのECDドメイン及びFcリンカーに特異的な抗体で確認した（図21B）。図21Bに示すように、ウェスタンブロットは、非還元レーンにおける優性二量体バンドの存在を示し（図21B、各プロットにおけるレーンNR）、これは還元剤β-メルカプトエタノールの存在下でグリコシル化単量体バンドに還元された（図21B、各プロットにおけるレーンR）。キメラタンパク質は、還元剤（β-メルカプトエタノール）及び脱グリコシル化剤の両方の存在下で、約67kDaの予測分子量でモノマーとして機能した（図21B、各プロットにおけるレーンDG）。これらの結果は、TGFBR2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の二量体を形成する天然状態及び傾向を示す。

10

20

【0388】

実施例21：ELISAを使用した例示的なNKG2A系キメラタンパク質中のマウスFcの検出

天然キメラタンパク質由来のFcリンカーに、抗マウスFc抗体がアクセスすることができるかを理解するために、ELISAベースのアッセイを実行した。これらのアッセイのために、抗mFc IgG抗体をプレート上にコーティングし、増加量のmPD-1-Fc-NKG2A及びmSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加し、プレートに結合した抗mFc IgG抗体による捕捉を行った。抗mFc IgG抗体に結合したmPD-1-Fc-NKG2A及びmSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の結合を、抗mFc HRPを使用して検出した。IgG抗体マウスFcを使用して標準曲線を生成した。mFc IgGを陽性対照として使用した。図22に示すように、mSLAMF6-Fc-NKG2A及びmPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のFcドメインは、用量依存的に、プレートに結合した抗mFc IgG抗体に結合した。これらの結果は、マウスFcドメインの存在及び抗mFc IgG抗体に対するそのアクセス可能性を実証する。

30

【0389】

実施例22：ELISAを使用した例示的なNKG2A系キメラタンパク質中のヒトFcの検出

天然キメラタンパク質由来のFcリンカーに、抗ヒト抗体がアクセスすることができるかを理解するために、ELISAベースのアッセイを実行した。これらのアッセイのために、抗ヒトIgG抗体をプレート上にコーティングし、増加量のhCD86-Fc-NKG2A及びhTGFBR2-Fc-NKG2A、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質ならびにヒトIgG抗体をプレートに添加し、プレートに結合した抗ヒト抗体による捕捉を行った。ヒトIgG抗体を陽性対照として使用し、標準曲線を生成した。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、非ヒトFcドメインを含有するものとして、陰性対照として含まれていた。抗ヒトIgG抗体に結合したタンパク質は、抗ヒトFcガンマHRPを使用して検出した。図23に示すように、hCD86-Fc-NK

40

50

G2A及びhTGFBR2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、プレートに結合した抗ヒトIgG抗体に結合した。対照的に、mCD80-Fc-NKG2aキメラタンパク質は、プレートに結合した抗ヒトIgG抗体と結合しなかった。これらの結果は、ヒトFcドメインの存在及び抗ヒトIgG抗体に対するそのアクセス可能性を実証する。

【0390】

別のセットの実験では、抗ヒトIgG抗体をプレート上にコーティングし、増加量のhCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、ならびにヒトIgG抗体をプレートに添加し、プレートに結合した抗mFc IgG抗体による捕捉を行った。ヒトIgG抗体を陽性対照として使用し、標準曲線を生成した。抗ヒトIgG抗体への結合は、抗ヒトFcガンマHRPを使用して検出した。図24に示すように、hCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各々は、用量依存的に、プレートに結合した抗ヒトIgG抗体に結合した。これらの結果は、ヒトFcドメインの存在及び抗ヒトIgG抗体に対するそのアクセス可能性を実証する。

【0391】

実施例23：本開示のキメラタンパク質のNKG2A部分が天然リガンドHLA-Eに結合する能力

CD94/NKGグループ2メンバーA(NKG2A)ヘテロ二量体は、他のHLAクラスI分子に由来するペプチドを提示する非古典的な最小多型HLAクラスI分子(HLA-E)に結合する。本明細書に開示されるキメラタンパク質のNKG2A部分がHLA-Eと結合できるかどうかを理解するために、ELISAベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換えHLA-Eタンパク質をプレート上にコーティングし、増加量のhCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加し、プレートに結合した組換えHLA-Eタンパク質による捕捉を行った。組換えHLA-Eタンパク質に結合したキメラタンパク質を、抗ヒトFcガンマHRPを使用して検出した。図25に示すように、hCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各々は、用量依存的に、プレートに結合した組換えHLA-Eタンパク質に結合した。これらの結果は、本明細書に開示されるhCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が、HLA-Eタンパク質と特異的に結合することを実証する。

【0392】

同様の実験を実行して、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、プレートに結合したHLA-Eタンパク質への結合を決定した。図26に示すように、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質はまた、用量依存的に、プレートに結合した組換えHLA-Eタンパク質に結合した。これらの結果は、本明細書に開示されるhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がHLA-Eタンパク質と特異的に結合することを実証する。

【0393】

相補的な実験では、増加量のhCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質または陰性対照タンパク質をプレート上にコーティングした。組換えHLA-E-Hisタンパク質をプレートに添加し、プレートに結合したキメラタンパク質または陰性対照タンパク質による捕捉を行った。捕捉したHLA-E-Hisタンパク質を、抗6X-His-HRP抗体を使用して検出した。図27に示すように、hCD48-Fc-NKG2A、hCD58-Fc-NKG2A、及びhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、HLA-Eへの用量依存的結合が観察された。

【0394】

同様に、増加量のhTGFBR2-Fc-NKG2A及びhSLAMF6-Fc-NKG

2 A キメラタンパク質または陰性対照タンパク質を、プレート上にコーティングした。組換え H L A - E - H i s タンパク質をプレートに添加し、プレートに結合したキメラタンパク質または陰性対照タンパク質による捕捉を行った。捕捉した H L A - E - H i s タンパク質を、抗 6 X - H i s - H R P 抗体を使用して検出した。図 2 8 に示すように、h T G F B R 2 - F c - N K G 2 A 及び h S L A M F 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、H L A - E への用量依存的結合が観察された。

【0395】

これらの結果は、本明細書に開示されるキメラタンパク質の N K G 2 A 部分が、それらの天然リガンドと特異的に結合することを実証する。

【0396】

実施例 2 4 : N K G 2 A 系キメラタンパク質の I 型膜貫通タンパク質部分がそれらの天然リガンドと結合する能力

C D 4 8 は、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (S L A M) ファミリーのメンバーである 2 B 4 (C D 2 4 4) と結合する。h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の C D 4 8 部分が H L A - E と結合できるかどうかを理解するために、E L I S A ベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換え 2 B 4 - H i s タンパク質をプレート上にコーティングした。陰性対照プレート上にコーティングされたヒト C D 2 8 - H i s タンパク質。増加量の h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質をプレートに添加し、プレートに結合した組換え 2 B 4 - H i s タンパク質による捕捉を行った。組換え 2 B 4 - H i s タンパク質に結合したキメラ h C D 4 8 - F c - N K G 2 A タンパク質を、抗ヒト F c ガンマ H R P を使用して検出した。図 2 9 に示すように、h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質は、用量依存的に、プレートに結合した組換え 2 B 4 - H i s タンパク質に結合したが、ヒト C D 2 8 - H i s タンパク質には結合しなかった。これらの結果は、本明細書に開示される h C D 4 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が、2 B 4 タンパク質と特異的に結合することを実証する。

【0397】

T G F β 1 は、T G F B R 2 のリガンドである。T G F B R 2 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の T G F B R 2 部分が T G F β 1 と結合できるかどうかを理解するために、E L I S A ベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換え T G F β 1 タンパク質をプレート上にコーティングし、増加量の T G F B R 2 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質をプレートに添加して、プレートに結合した組換え T G F β 1 タンパク質による捕捉を行った。組換え T G F β 1 タンパク質に結合したキメラタンパク質を、抗 m F c H R P を用いて検出した。図 3 0 に示すように、T G F B R 2 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の各々は、用量依存的に、プレートに結合した組換え T G F β 1 タンパク質に結合した。これらの結果は、T G F B R 2 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が T G F β 1 タンパク質と特異的に結合することを実証している。

【0398】

C D 2 は、T 細胞における膜貫通タンパク質であり、ヒトでは A P C 上で、げっ歯類では C D 4 8 上でそのリガンド C D 5 8 に結合する。h C D 4 8 - F c - N K G 2 A 及び h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の C D 4 8 及び C D 5 8 部分が C D 2 と結合できるかどうかを理解するために、E L I S A ベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換えヒト C D 2 タンパク質 (r h C D 2 - H i s) をプレート上にコーティングし、増加量の h C D 4 8 - F c - N K G 2 A 、h C D 5 8 - F c - N K G 2 A 、及び m C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質、ならびに組換え h C D 5 8 - F c タンパク質をプレートに添加して、プレートに結合した組換え C D 2 タンパク質による捕捉を行った。h C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質は陰性対照として機能し、組換え h C D 5 8 - F c タンパク質は陽性対照として機能した。組換え C D 2 タンパク質に結合した h C D 4 8 - F c - N K G 2 A 及び h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質、ならびに組換え h C D 5 8 - F c タンパク質を、抗ヒト F c H R P を使用して検出した。組換え C D 2 タンパク質に結合した m C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質を

、抗マウスFc HRPを使用して検出した。図31に示すように、hCD48-Fc-NKG2A及びhCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、プレートに結合した組換えCD2タンパク質に結合した。さらに、hCD58-Fc-NKG2A及びhCD58-Fcは、プレートに結合した組換えCD2タンパク質に結合する類似の動態を示した。一方、mCD80-Fc-NKG2Aタンパク質は、CD2と結合しなかった。これらの結果は、本明細書に開示されるhCD48-Fc-NKG2A及びhCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD2タンパク質と特異的に結合することを実証する。

【0399】

CD48は、2B4のリガンドである。hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD48部分が2B4と結合できるかどうかを理解するために、ELISAベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換えヒト2B4タンパク質(rh2B4-His)をプレート上にコーティングし、増加量のhCD48-Fc-NKG2A及びmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、ならびに組換えヒトCD48-Fc(rhCD48-Fc)タンパク質をプレートに添加し、プレートに結合した組換え2B4タンパク質による捕捉を行った。組換え2B4タンパク質に結合したhCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び組換えヒトCD48-Fc(rhCD48-Fc)タンパク質を、抗ヒトFc HRPを使用して検出した。陰性対照として使用し、組換え2B4タンパク質に結合したmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、抗マウスFc HRPを使用して検出した。図32に示すように、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、rhCD48-Fcタンパク質と同等の動態で、プレートに結合した組換え2B4タンパク質に結合した。これらの結果は、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が2B4タンパク質と特異的に結合することを実証する。

【0400】

CD28は、APC、T細胞、及びNK細胞などの細胞上でCD80及びCD86リガンドによって刺激される。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD80部分がマウスCD28と結合できるかどうかを理解するために、ELISAベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換えマウスCD28(rmCD29)タンパク質をプレート上にコーティングし、増加量のmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加し、プレートに結合した組換えCD28タンパク質による捕捉を行った。組換えCD28タンパク質に結合したキメラタンパク質を、抗マウスFc HRPを使用して検出した。図33に示すように、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、プレートに結合した組換えCD28タンパク質に結合した。これらの結果は、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD28と特異的に結合することを実証する。

【0401】

hCD80-Fc-NKG2A及びhCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のCD80及びCD86部分がCD28と結合できるかどうかを理解するために、ELISAベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換えCD28タンパク質をプレート上にコーティングし、増加量のhCD80-Fc-NKG2A、hCD86-Fc-NKG2A、及びmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、ならびに組換えヒトCD86-Fc(rhCD86-Fc)タンパク質をプレートに添加し、プレートに結合した組換えCD28タンパク質による捕捉を行った。mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、及び組換えヒトCDrhCD86-Fcタンパク質は、それぞれ、陰性対照及び陽性対照として用いた。組換えCD28タンパク質に結合したキメラタンパク質は、抗ヒトFc HRPを使用して検出した。図34に示すように、hCD80-Fc-NKG2A及びhCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、rhCD86-Fcタンパク質と同等の動態で、プレートに結合した組換えCD28タンパク質に結合した。対照的に、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、CD28に結合しなかった。これらの結果は、hCD80-Fc-NKG2A及びhCD86-Fc-NK

G2Aキメラタンパク質がCD28と特異的に結合することを実証する。

【0402】

プログラム死ーリガンド1 (PD-L1) は、PD-1リガンドである。PD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のPD-1部分がPD-L1と結合できるかどうかを理解するために、ELISAベースのアッセイを実行した。簡潔に述べると、組換えPD-L1タンパク質 (mPD-L1-His) をプレート上にコーティングし、増加量のPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、プレートに結合した組換えPD-L1タンパク質による捕捉を行った。組換えPD-L1タンパク質に結合したキメラタンパク質を、抗His-6X HRPを使用して検出した。図35に示すように、PD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の各々は、用量依存的に、プレートに結合した組換えPD-L1タンパク質に結合した。これらの結果は、本明細書に開示されるPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がPD-L1タンパク質と特異的に結合することを実証する。

10

【0403】

まとめて、これらの結果は、本明細書に開示されるキメラタンパク質のN末端またはその近くに位置するI型膜貫通タンパク質部分が、その天然リガンドに効率的かつ特異的に結合することを実証する。

【0404】

実施例25：I型膜貫通タンパク質及び本明細書に開示されるキメラタンパク質のNKG2A部分がそれらのリガンドに同時に結合する能力

20

これらの実験の目的は、キメラタンパク質のN末端またはその付近に位置するI型膜貫通タンパク質部分と、キメラタンパク質のC末端またはその付近に位置するNKG2A部分とが、それらの意図される標的と同時に結合することができるかどうかを理解することであった。これらの質問に答えるために、ELISAベースのアッセイを実行した。

【0405】

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がQa1及び抗CD48の両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、抗マウスQa1抗体をプレート上にコーティングした。組換えQa1タンパク質 (Qa1-His) を添加して、プレートに結合した抗マウスQa1抗体による捕捉を行った。増加量のmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、Qa1-Hisタンパク質による捕捉を行った。さらに、ヤギ抗mCD48抗体をプレートに添加して、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。抗mCD48抗体の結合は、抗ヤギ抗体を使用して検出した。図36に示すように、ELISAアッセイは、用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成には、mCD48-Fc-NKG2Aの、Qa1及び抗CD48抗体の両方への同時結合が必要であるため、これらの結果は、mCD48-Fc-NKG2Aが、用量依存的に、Qa1及び抗CD48の両方に同時に結合することを実証する。

30

【0406】

mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がQa1及び抗CD86の両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、組換えHLA-E (HLA-E-His) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、HLA-E-Hisタンパク質による捕捉を行った。さらに、ラット抗mCD86抗体をプレートに添加して、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。抗mCD86抗体の結合は、抗ラット抗体を使用して検出した。図37に示すように、ELISAアッセイは、用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成には、mCD86-Fc-NKG2Aの、HLA-E及び抗CD86抗体の両方への同時結合が必要であるため、これらの結果は、mCD86-Fc-NKG2Aが、用量依存的に、HLA-E及び抗CD86の両方に同時に結合することを実証する。

40

50

【0407】

mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がHLA-E及び抗CD86の両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、組換えHLA-E (HLA-E-His) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、HLA-E-Hisタンパク質による捕捉を行った。さらに、ラット抗mCD86抗体をプレートに添加して、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。抗mCD86抗体の結合は、抗ラット抗体を使用して検出した。図37に示すように、ELISAアッセイは、用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成には、mCD86-Fc-NKG2Aの、HLA-E及び抗CD86抗体の両方への同時結合が必要であるため、これらの結果は、mCD86-Fc-NKG2Aが、用量依存的に、HLA-E及び抗CD86の両方に同時に結合することを実証する。

10

【0408】

mSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が抗NKG2a及びCD47の両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、抗NKG2a抗体をプレート上にコーティングした。増加量のmSIRPα-Fc-NKG2A及びmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、抗NKG2a抗体による捕捉を行った。さらに、組換えmCD47 (mCD47-His) タンパク質をプレートに添加して、mSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。抗His HRP抗体を使用して、mCD47-Hisタンパク質の結合を検出した。図38に示すように、ELISAアッセイは、mSIRPα-Fc-NKG2Aによる用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照であったmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成は、mSIRPα-Fc-NKG2Aの抗NKG2A抗体及びmCD47-Hisタンパク質の両方への同時結合を必要とするため、これらの結果は、mSIRPα-Fc-NKG2Aが、用量依存的に抗NKG2a抗体及びmCD47の両方に同時に結合することを実証する。

20

【0409】

hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhPD-L1及びHLA-Eの両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、組換えhPD-L1 (hPD-L1-Fc) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のhPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、hPD-L1-Fcタンパク質による捕捉を行った。さらに、組換えHLA-E (HLA-E-His) タンパク質をプレートに添加して、hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。HLA-E-Hisタンパク質の結合は、抗His 6X HRP抗体を使用して検出した。図39に示すように、ELISAアッセイは、hPD-1-Fc-NKG2Aによる用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成は、hPD-1-Fc-NKG2Aの、hPD-L1タンパク質及びHLA-Eタンパク質の両方への同時結合を必要とするため、これらの結果は、hPD-1-Fc-NKG2Aが、用量依存的に、hPD-L1タンパク質及びHLA-Eの両方に同時に結合することを実証する。

30

40

【0410】

hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhCD28及びHLA-Eの両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、組換えhCD28 (rhCD28-Fc) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、組換えヒトCD28-Fc (rhCD28-Fc) タンパク質による捕捉を行った。さらに、組換えHLA-E (HLA-E-His) タンパク質をプレートに添加して、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。HLA-E-Hisタン

50

パク質の結合は、抗H i s 6 X H R P抗体を使用して検出した。図40に示すように、E L I S Aアッセイは、h C D 8 0 - F c - N K G 2 Aによる用量依存的結合を示した。シグナル生成は、h C D 8 0 - F c - N K G 2 Aの、r h C D 2 8タンパク質及びH L A - Eタンパク質の両方への同時結合を必要とするので、これらの結果は、h C D 8 0 - F c - N K G 2 Aが、h C D 2 8タンパク質及びH L A - Eの両方に、用量依存的に同時に結合することを実証する。

【0411】

h C D 8 6 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質がh C D 2 8及びH L A - Eの両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のE L I S A実験を行った。簡潔に述べると、組換えh C D 2 8 (r h C D 2 8 - F c) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のh C D 8 6 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質をプレートに添加して、r h C D 2 8 - F cタンパク質による捕捉を行った。さらに、組換えH L A - E (H L A - E - H i s) タンパク質をプレートに添加して、h C D 8 6 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質による捕捉を行った。H L A - E - H i sタンパク質の結合は、抗H i s 6 X H R P抗体を使用して検出した。図41に示すように、E L I S Aアッセイは、h C D 8 6 - F c - N K G 2 Aによる用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成は、h C D 8 6 - F c - N K G 2 Aの、r h C D 2 8タンパク質及びH L A - Eタンパク質の両方への同時結合を必要とするので、これらの結果は、h C D 8 6 - F c - N K G 2 Aが、h C D 2 8タンパク質及びH L A - Eの両方に、用量依存的に同時に結合することを実証する。

【0412】

h S L A M F 6 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質がh S L A M F 6及びH L A - Eの両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のE L I S A実験を行った。簡潔に述べると、組換えh S L A M F 6 (r h S L A M F 6 - F c) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のh S L A M F 6 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質をプレートに添加して、組換えヒトS L A M F 6 - F c (r h S L A M F 6 - F c) タンパク質による捕捉を行った。さらに、組換えH L A - E (H L A - E - H i s) タンパク質をプレートに添加して、h S L A M F 6 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質による捕捉を行った。H L A - E - H i sタンパク質の結合は、抗H i s 6 X H R P抗体を使用して検出した。図42に示すように、E L I S Aアッセイは、h S L A M F 6 - F c - N K G 2 Aによる用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成は、h S L A M F 6 - F c - N K G 2 Aの、r h S L A M F 6タンパク質及びH L A - Eタンパク質の両方への同時結合を必要とするので、これらの結果は、h S L A M F 6 - F c - N K G 2 Aが、h S L A M F 6タンパク質及びH L A - Eの両方に、用量依存的に同時に結合することを実証する。

【0413】

P D - 1 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質がP D - L 1及びH L A - Eの両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のE L I S A実験を行った。簡潔に述べると、組換えP D - L 1 (r P D - L 1 - F c) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のP D - 1 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質をプレートに添加して、r P D - L 1 - F cタンパク質による捕捉を行った。さらに、組換えH L A - E (H L A - E - H i s) タンパク質をプレートに添加して、P D - 1 - F c - N K G 2 Aキメラタンパク質による捕捉を行った。H L A - E - H i sタンパク質の結合は、抗H i s 6 X H R P抗体を使用して検出した。図43に示すように、E L I S Aアッセイは、P D - 1 - F c - N K G 2 Aによる用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成は、P D - 1 - F c - N K G 2 Aの、r P D - L 1タンパク質及びH L A - Eタンパク質の両方への同時結合を必要とするため、これらの結果は、P D - 1 - F c - N K G 2 Aが、用量依存的に、P D - L 1タンパク質及びH L A - Eの両方に同時に結合することを実証する。

【0414】

hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が2B4及びHLA-Eの両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、組換え2B4 (rh2B4-Fc) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のhCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、組換えヒト2B4-Fc (rh2B4-Fc) タンパク質による捕捉を行った。さらに、組換えHLA-E (HLA-E-His) タンパク質をプレートに添加して、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。HLA-E-Hisタンパク質の結合は、抗His 6X HRP抗体を使用して検出した。図44に示すように、ELISAアッセイは、hCD48-Fc-NKG2Aによる用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成は、hCD48-Fc-NKG2Aの、rh2B4タンパク質及びHLA-Eタンパク質の両方への同時結合を必要とするので、これらの結果は、hCD48-Fc-NKG2Aが、2B4タンパク質及びHLA-Eの両方に、用量依存的に同時に結合することを実証する。

10

【0415】

hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD2及びHLA-Eの両方に同時に結合できるかどうかを理解するために、以下のELISA実験を行った。簡潔に述べると、組換えCD2 (rhCD2-Fc) タンパク質をプレート上にコーティングした。増加量のhCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質をプレートに添加して、組換えヒトCD2-Fc (rhCD2-Fc) タンパク質による捕捉を行った。さらに、組換えHLA-E (HLA-E-His) タンパク質をプレートに添加して、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による捕捉を行った。HLA-E-Hisタンパク質の結合は、抗His 6X HRP抗体を使用して検出した。図44に示すように、ELISAアッセイは、hCD58-Fc-NKG2Aによる用量依存的結合を示した。対照的に、陰性対照は、そのような結合を示さなかった。シグナル生成は、hCD58-Fc-NKG2Aの、rhCD2タンパク質及びHLA-Eタンパク質の両方への同時結合を必要とするので、これらの結果は、hCD58-Fc-NKG2Aが、CD2タンパク質及びHLA-Eの両方に、用量依存的に同時に結合することを実証する。

20

【0416】

まとめて、これらの結果は、キメラタンパク質のN末端またはその付近に位置するI型膜貫通タンパク質部分、及び本発明のキメラタンパク質のC末端またはその付近に位置するNKG2A部分が、それらの意図される標的と同時に結合することを実証する。

30

【0417】

実施例26：ヒトCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、h2B4を発現する細胞への特異的結合

キメラタンパク質のN末端またはその近くに位置するI型膜貫通タンパク質部分が、それらの意図される標的を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、以下の一連の実験（実施例26～33）を実行した。

【0418】

hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のhCD48部分がh2B4を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、h2B4 (CD48の結合パートナー) を発現するCHO-K1細胞のクローンを生成した。陽性クローン (CHO-K1/h2B4細胞と呼ばれる) を抗2B4抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図45に示すように、抗アイソタイプ対照ではなく2B4抗体によるCHO-K1/h2B4細胞の染色により、CHO-K1/h2B4細胞の生成を確認した。

40

【0419】

hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCHO-K1/h2B4細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。図46A及び図46Bに示すように、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、WT CHO-K1細胞 (図46A) と比較して、CHO-K1/h2B4細胞 (

50

図 4 6 B) への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、CHO-K1/h2B4細胞によって発現されるh2B4に対するhCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された(図 4 7)。これらの結果は、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がh2B4を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

【0420】

実施例 27: mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、m2B4を発現する細胞への特異的結合

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のmCD48部分がm2B4を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、m2B4(CD48の結合パートナー)を発現するCHO-K1細胞のクローンを生成した。陽性クローン(CHO-K1/m2B4細胞と呼ばれる)を抗m2B4抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図 4 8 に示すように、アイソタイプ対照ではなく抗m2B4抗体によるCHO-K1/m2B4細胞の染色により、染色していない細胞対照と比較した場合、CHO-K1/m2B4細胞の生成を確認した。

10

【0421】

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCHO-K1/m2B4細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。図 4 9 A 及び図 4 9 B に示すように、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、WT CHO-K1細胞(図 4 9 A)と比較して、CHO-K1/m2B4細胞(図 4 9 B)への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、CHO-K1/m2B4細胞によって発現されるm2B4に対するmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された(図 5 0)。これらの結果は、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がm2B4を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

20

【0422】

実施例 28: ヒトPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、hPD-L1を発現する細胞への特異的結合

hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のhPD-1部分がhPD-L1を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、hPD-L1(PD-1の結合パートナー)を発現するCHO-K1細胞のクローンを生成した。陽性クローン(CHO-K1/hPD-L1細胞と呼ばれる)を抗PD-L1抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図 5 1 に示すように、アイソタイプ対照ではなく抗PD-L1抗体によるCHO-K1/hPD-L1細胞の染色により、CHO-K1/hPD-L1細胞の生成が確認された。

30

【0423】

hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCHO-K1/hPD-L1細胞に特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを実行した。図 5 2 A 及び図 5 2 B に示すように、hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、WT CHO-K1細胞(図 5 2 A)と比較して、CHO-K1/hPD-L1細胞(図 5 2 B)への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、CHO-K1/hPD-L1細胞によって発現されるhPD-L1へのhPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的な結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された(図 5 3)。これらの結果は、hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhPD-L1を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

40

【0424】

実施例 29: マウスPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、mPD-L1を発現する細胞への特異的結合

mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のmPD-1部分がmPD-L1を発現

50

する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、mPD-L1 (PD-1の結合パートナー)を発現するCHO-K1細胞のクローンを生成した。陽性クローン(CHO-K1/mPD-L1細胞と呼ばれる)を抗PD-L1抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図54に示すように、アイソタイプ対照ではなく抗PD-L1抗体によるCHO-K1/mPD-L1細胞の染色により、CHO-K1/mPD-L1細胞の生成を確認した。

【0425】

mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCHO-K1/mPD-L1細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。図55A及び図55Bに示すように、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、WT CHO-K1細胞(図55A)と比較して、CHO-K1/mPD-L1細胞(図55B)への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、CHO-K1/mPD-L1細胞によって発現されるmPD-L1へのmPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的な結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された(図56)。これらの結果は、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmPD-L1を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

【0426】

実施例30：マウスCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、mQa1を発現する細胞への特異的結合

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のmCD48部分がmQa1を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、mQa1(マウスNKG2Aの結合パートナー)を発現するCHO-K1細胞のクローンを生成した。陽性クローン(CHO-K1/mQa1細胞と呼ばれる)を抗Qa1抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図57に示すように、アイソタイプ対照ではなく抗Qa1抗体によるCHO-K1/mQa1細胞の染色により、染色していない対照と比較して、CHO-K1/mQa1細胞の生成を確認した。

【0427】

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCHO-K1/mQa1細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。図58A及び図58Bに示すように、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、WT CHO-K1細胞(図58A)と比較して、CHO-K1/mQa1細胞(図58B)への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、CHO-K1/mQa1細胞によって発現されるmQa1に対するmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された(図59)。これらの結果は、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmQa1を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

【0428】

実施例31：ヒトCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、hCD2を発現する細胞への特異的結合

hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のhCD58部分がhCD2を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、hCD2を発現するCHO-K1細胞のクローンを生成した。陽性クローン(CHO-K1/hCD2細胞と呼ばれる)を抗CD2抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図60に示すように、アイソタイプ対照ではなく抗CD2抗体によるCHO-K1/hCD2細胞の染色により、染色していない対照と比較して、CHO-K1/hCD2細胞の生成を確認した。

【0429】

hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCHO-K1/hCD2細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行っ

10

20

30

40

50

た。図 6 1 A 及び図 6 1 B に示すように、h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質は、W T C H O - K 1 細胞（図 6 1 A）と比較して、C H O - K 1 / h C D 2 細胞（図 6 1 B）への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、C H O - K 1 / h C D 2 細胞によって発現される h C D 2 に対する h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の用量依存的結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された（図 6 2）。これらの結果は、h C D 5 8 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が h C D 2 を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

【 0 4 3 0 】

実施例 3 2 : ヒト C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、h C D 2 8 を発現する細胞への特異的結合

h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の h C D 8 6 部分が h C D 2 8 を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、h C D 2 8 を発現する C H O - K 1 細胞のクローンを生成した。2つの陽性クローン（C H O - K 1 / h C D 2 8 細胞クローンと呼ばれる）を抗 C D 2 8 抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図 6 3 に示すように、染色していない対照と比較して、アイソタイプ対照ではなく抗 C D 2 8 抗体による C H O - K 1 / h C D 2 8 クローンの染色により、C H O - K 1 / h C D 2 8 クローンの生成が確認された。

【 0 4 3 1 】

h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が C H O - K 1 / h C D 2 8 細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。図 6 4 A 及び図 6 4 B に示すように、h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質は、W T C H O - K 1 細胞（図 6 4 A）と比較して、C H O - K 1 / h C D 2 8 細胞（図 6 4 B）への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、C H O - K 1 / h C D 2 8 細胞によって発現される h C D 2 8 に対する h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の用量依存的結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された（図 6 5）。これらの結果は、h C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が h C D 2 8 を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

【 0 4 3 2 】

実施例 3 3 : マウス C D 8 0 - F c - N K G 2 A 及び C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の、m C D 2 8 を発現する細胞への特異的結合

m C D 8 0 - F c - N K G 2 A 及び m C D 8 6 - N K G 2 A キメラタンパク質の m C D 8 0 及び m C D 8 6 部分がそれぞれ、m C D 2 8 を発現する細胞と特異的に結合できるかどうかを理解するために、m C D 2 8 を発現する C H O - K 1 細胞のクローンを生成した。2つの陽性クローン（C H O - K 1 / m C D 2 8 細胞クローンと呼ばれる）を抗 C D 2 8 抗体またはアイソタイプ対照で染色し、フローサイトメトリー分析に供した。図 6 6 に示すように、染色していない対照と比較して、アイソタイプ対照ではなく抗 C D 2 8 抗体による C H O - K 1 / m C D 2 8 クローンの染色により、C H O - K 1 / m C D 2 8 クローンの生成が確認された。

【 0 4 3 3 】

m C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が C H O - K 1 / m C D 2 8 細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。図 6 7 A 及び図 6 7 B に示すように、m C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質は、W T C H O - K 1 細胞（図 6 7 A）と比較して、C H O - K 1 / m C D 2 8 細胞（図 6 7 B）への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、C H O - K 1 / m C D 2 8 細胞によって発現される m C D 2 8 に対する m C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質の用量依存的結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された（図 6 8）。これらの結果は、m C D 8 0 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質が m C D 2 8 を発現する細胞と特異的に結合することを実証する。

【0434】

mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCHO-K1/mCD28細胞と特異的に結合できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーベースのアッセイを行った。図69A及び図69Bに示すように、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、WT CHO-K1細胞（図69A）と比較して、CHO-K1/mCD28細胞（図69B）への結合がより多く示された。フローサイトメトリープロファイルにおける用量依存的シフトは、CHO-K1/mCD28細胞によって発現されるmCD28に対するmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の用量依存的結合を示す。結合の定量により、用量依存的結合が確認された（図70）。これらの結果は、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmCD28を発現する細胞と特異的に結合することを

10

【0435】

まとめて、実施例26～33の結果は、キメラタンパク質のN末端またはその付近に位置するI型膜貫通タンパク質部分が、それらの天然標的を発現する細胞に特異的に結合することができることを実証する。

【0436】

実施例34：NKG2A系キメラタンパク質のI型膜貫通タンパク質及びNKG2A部分が、それらのリガンドの下流でシグナル伝達を開始する能力

これらの実験の目的は、(i)キメラタンパク質のN末端またはその付近に位置するI型膜貫通タンパク質部分が、それらの標的を活性化することができるかどうかを理解することと、(ii)キメラタンパク質のC末端またはその付近に位置するNKG2A部分が、その標的を活性化することができるかどうかを理解することであった。これらのアッセイで使用した様々なリガンドを発現するCHO-K1細胞クローンは、CHO-K1細胞クローンが発現するリガンドへのリガンドの結合に感受性のあるNFκB-ルシフェラーゼレポーターを保有する。

20

【0437】

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が2B4シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/m2B4細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、m2B4の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図71に示すように、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/m2B4細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がm2B4シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

30

【0438】

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が2B4及びmCD2シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/m2B4細胞、CHO-K1/mCD2細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、m2B4またはmCD2の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図72に示すように、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/m2B4及びCHO-K1/mCD2細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がm2B4及びmCD2シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

40

【0439】

mSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmSLAMF6シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のmSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/mSLAMF

50

6細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、mSLAMF6の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図73に示すように、mSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/mSLAMF6細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、mSLAMF6-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmSLAMF6シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

【0440】

hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD28(hCD28)シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のhCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/hCD28細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、hCD28の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図74に示すように、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/hCD28細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhCD28シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

10

【0441】

hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD28(hCD28)シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のhCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/hCD28細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、hCD28の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図75に示すように、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/hCD28細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhCD28シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

20

【0442】

hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がヒトHLA-Eシグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のhPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/HLA-E細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、hHLA-Eの活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図76に示すように、hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/HLA-E細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が用量依存的にHLA-Eシグナル伝達を活性化することを実証する。

30

【0443】

mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がマウスQa1(mQa1)シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/mQa1細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、mQa1の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図77に示すように、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/mQa1細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmQa1シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

40

【0444】

mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmQa1シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のmPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/mQa1細胞、またはWT

50

CHO-K1細胞とともにインキュベートし、mQa1の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図78に示すように、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/mQa1細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmQa1シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

【0445】

TGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がQa1シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のTGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/mQa1細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、mQa1の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図79に示すように、TGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/mQa1細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、TGFB R2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がmQa1シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

10

【0446】

hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が2B4(h2b4)シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のhCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/h2B4細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、h2B4の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図80に示すように、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/h2B4細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がh2B4シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

20

【0447】

hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がCD2(h2b4)シグナル伝達を活性化できるかどうかを理解するために、以下の実験を実行した。簡潔に述べると、増加量のhCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、CHO-K1/hCD2細胞、またはWT CHO-K1細胞とともにインキュベートし、hCD2の活性化をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図81に示すように、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、CHO-K1/hCD2細胞においてルシフェラーゼ活性を誘導したが、WT CHO-K1細胞においては誘導しなかった。これらのデータは、hCD58-Fc-NKG2Aキメラタンパク質がhCD2シグナル伝達を用量依存的に活性化することを実証する。

30

【0448】

まとめて、これらの結果は、キメラタンパク質のN末端にまたはその付近に位置するI型膜貫通タンパク質部分、ならびにキメラタンパク質のN末端にまたはその付近に位置するNKG2A部分が独立して、それらの天然リガンドを活性化することができることを実証する。

40

【0449】

実施例35：本開示のキメラタンパク質の、ヒトナチュラルキラー細胞株NK-92への結合

この実験の目的は、本明細書に開示されるヒトキメラタンパク質がNK細胞に結合することができるかどうかを理解することであった。ヒトNK細胞株NK92CD16Vをこの目的のために用いた。

【0450】

フローサイトメトリーによって測定される、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のNK92-CD16V細胞への結合。図82に示すように、フローサイトメトリー

50

プロファイルは、右側への用量依存的シフトを示した。これらの結果は、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への用量依存的結合を示す。

【0451】

hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への結合を、フローサイトメトリーによって測定した。図83Aに示すように、フローサイトメトリープロファイルは、右側への用量依存的シフトを示した。ピークの幾何平均をプロットした。図83Bに示すように、結合の幾何平均は、用量依存的増加を示した。これらの結果は、hCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への用量依存的結合を示す。

10

【0452】

フローサイトメトリーによって測定される、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のNK92-CD16V細胞への結合。図84に示すように、フローサイトメトリープロファイルは、右側への用量依存的シフトを示した。これらの結果は、hCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への用量依存的結合を示す。

【0453】

フローサイトメトリーによって測定される、hPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質のNK92-CD16V細胞への結合。図85に示すように、フローサイトメトリープロファイルは、右側への用量依存的シフトを示した。これらの結果は、PD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の、NK92-CD16V細胞への用量依存的結合を示す。

20

【0454】

まとめて、これらの結果は、本明細書に開示されるキメラタンパク質が用量依存的にNK細胞に結合することを実証する。

【0455】

実施例36：活性化T細胞によって媒介される抗原陽性細胞の死滅の、本開示のキメラタンパク質による誘導

この実験の目的は、本明細書に開示されるヒトキメラタンパク質が、抗原活性化T細胞によって媒介される抗原陽性細胞の死滅を誘導することができるかどうかを理解することであった。抗原活性化T細胞（OT-1ナイーブT細胞）に曝露したときに、マウスキメラタンパク質が抗原特異的抗腫瘍応答を向上させることができるかどうかを決定するためのアッセイを開発した。標的細胞は、抗原陽性（OVA+）細胞であった。

30

【0456】

増加量のmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、OT-1ナイーブT細胞（エフェクター細胞）及びEO771 OVA+細胞（標的細胞）とともに、エフェクター細胞：標的細胞比5：1でインキュベートした。カスパーゼ3/7活性を測定することによって、アポトーシスを評価した。このアッセイには、カスパーゼ3/7（アポトーシスマーカー）の生細胞イメージング及び蛍光シグナル伝達を可能にするINCUCYTシステムを用いた。図86に示すように、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、エフェクター細胞によって媒介される標的細胞のアポトーシスの用量依存的増加を誘導した。これらのデータは、本明細書に開示されるキメラタンパク質が、用量依存的に、エフェクター細胞に曝露されるときに、標的細胞のアポトーシスを誘導することを実証する。

40

【0457】

実施例37：NK細胞媒介抗体依存性細胞傷害（ADCC）の、本開示のキメラタンパク質による誘導

この実験の目的は、本明細書に開示されるキメラタンパク質が、NK細胞によって媒介される抗体依存性細胞傷害（ADCC）を増強することができるかどうかを理解することであった。

50

【0458】

このアッセイのために、ADCC可能な抗EGFR抗体セツキシマブ及びEGFR陽性ヒトA431ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞を標的細胞として使用した。増加量のhCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び1 μ g/mLのセツキシマブ及びNK92-CD16V細胞（エフェクター細胞）を、エフェクター細胞：標的細胞比5：1でA431細胞（標的細胞）と混合し、インキュベートした。アポトーシスは、INCUCYTE生細胞イメージングシステムを使用してアネキシンVを測定することによって評価した。図87に示すように、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、アネキシンV陽性細胞の用量依存的増加を引き起こした。したがって、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、ヒトNK細胞及びADCC可能なセツキシマブ抗体に曝露されたときに、ヒトA431細胞の細胞死を増強した。したがって、本明細書に開示されるキメラタンパク質は、用量依存的に、ヒトNK細胞及びADCC可能なセツキシマブ抗体に曝露されると、ヒトA431細胞の細胞死を増強した。

10

【0459】

実験は、異なるEGFR陽性標的細胞：A549ヒト肺癌細胞株で実行した。このアッセイのために、ADCC可能な抗EGFR抗体セツキシマブ及びEGFR陽性ヒトA549ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞を標的細胞として使用した。増加量のhCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び10 μ g/mLのセツキシマブ及びNK92-CD16V細胞（エフェクター細胞）を、エフェクター細胞：標的細胞比5：1でA549細胞（標的細胞）と混合し、インキュベートした。アポトーシスは、INCUCYTE生細胞イメージングシステムを使用してアネキシンVを測定することによって評価した。図88に示すように、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、アネキシンV陽性細胞の用量依存的増加を引き起こした。したがって、hCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、用量依存的に、ヒトNK細胞及びADCC可能なセツキシマブ抗体に曝露されたときに、ヒトA549細胞の細胞死を増強した。したがって、本明細書に開示されるキメラタンパク質は、用量依存的に、ヒトNK細胞及びADCC可能なセツキシマブ抗体に曝露されると、ヒトA549細胞の細胞死を増強した。

20

【0460】

これらのデータは、本明細書に開示されるキメラタンパク質が、NK細胞によって媒介される抗体依存性細胞傷害（ADCC）を増強することができることを実証する。

30

【0461】

実施例38：脾細胞によって媒介される抗原陽性細胞の死滅の、本開示のキメラタンパク質による誘導

この実験の目的は、本明細書に開示されるヒトキメラタンパク質が、抗原活性化されない脾細胞によって媒介される抗原陽性細胞の死滅を誘導することができるかどうかを理解することであった。

【0462】

複数の異なる免疫エフェクター細胞（T細胞、NK細胞等）からなる非活性化脾細胞をエフェクター細胞として使用し、ネズミA20リンパ球、ネズミA20リンパ球を標的細胞として使用した。増加量のmCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質を、新たに単離した脾細胞（エフェクター細胞）及びA20細胞（標的細胞）とともにインキュベートした。陰性対照には、脾細胞のみ（標的細胞なし）及びA20細胞のみ（エフェクター細胞なし）が含まれた。アポトーシスは、INCUCYTEシステムを使用してカスパーゼ3/7活性を測定することによって評価した。図89Aに示すように、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、エフェクター細胞によって媒介される標的細胞のアポトーシスの用量依存的増加を誘導した。図89Bは、3.5時間におけるカスパーゼ3/7活性を示す棒グラフを示す。図89Bに示すように、脾細胞なし（図89Bのグラフに記録されない黒色の棒）では、アポトーシスは観察されなかった。脾細胞のみ（標的細胞なし）でアポトーシスを示し、新鮮な脾細胞でアポトーシスが進行していることを示した。興味深いことに、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、脾細胞の存在下

40

50

で、標的細胞の有意なアポトーシスを誘導した。これらのデータは、本明細書に開示されるキメラタンパク質が、用量依存的に、エフェクター細胞に曝露されるときに、標的細胞のアポトーシスを誘導することを実証する。

【0463】

実施例39：結腸直腸癌同種移植片に対する本開示のキメラタンパク質のインビボ有効性
この実験の目的は、がんに対して開示されるキメラタンパク質の有効性を検討することであった。CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性は、ネズミ結腸直腸癌細胞株CT26同種移植片における抗Qa1抗体と比較して検討した。Balb/cマウスにCT26細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1)未処理、(2)100μg/マウスの抗Qa1抗体(Bioxcelクロン4C2.4A7.5H11)、及び(3)300μg/マウスのCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後5、8、11、14、16、及び18日目に処理し、指示された時間に腫瘍体積を測定した。図90Aに示すように、抗Qa1抗体及びCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質での処理により、未処理のマウスと比較して、腫瘍成長が著しく遅延した。CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、抗Qa1抗体と比較して、腫瘍サイズをより多く減少させた。18日目の腫瘍体積を図90Bにプロットする。CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による処理により、抗Qa1抗体の処理と比較して、18日目の腫瘍体積がより多く減少した(図90B)。これらの結果は、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が腫瘍成長を有意に低下させ、抗Qa1抗体よりも性能が優れていたことを実証している。

10

20

【0464】

mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性は、ネズミ結腸直腸癌細胞株CT26同種移植片における抗Qa1抗体と比較して検討した。Balb/cマウスにCT26細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1)未処理、(2)100μg/マウスの抗Qa1抗体(Bioxcelクロン4C2.4A7.5H11)、及び(3)300μg/マウスのmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後5、8、11、14、16、及び18日目に処理し、指示された時間に腫瘍体積を測定した。図91Aに示すように、抗Qa1抗体及びmCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質での処理により、未処理のマウスと比較して、腫瘍成長が著しく遅延した。18日目の腫瘍体積を図91Bにプロットする。mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による処理により、抗Qa1抗体の処理と比較して、18日目の腫瘍体積がより多く減少した(図91B)。これらの結果は、mCD80-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が、抗Qa1抗体と同様の効果で、腫瘍成長を有意に低下させたことを実証する。

30

【0465】

mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性は、ネズミ結腸直腸癌細胞株CT26同種移植片における抗Qa1抗体と比較して検討した。Balb/cマウスにCT26細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1)未処理、(2)100μg/マウスの抗Qa1抗体(Bioxcelクロン4C2.4A7.5H11)、及び(3)300μg/マウスのmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後5、8、11、14、16、及び18日目に処理し、指示された時間に腫瘍体積を測定した。図92Aに示すように、抗Qa1抗体及びmCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質での処理により、未処理のマウスと比較して、腫瘍成長が著しく遅延した。18日目の腫瘍体積を図92Bにプロットする。mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による処理により、抗Qa1抗体の処理と比較して、18日目の腫瘍体積がより多く減少した(図92B)。これらの結果は、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が、抗Qa1抗体と同様の効果で、腫瘍成長を有意に低下させたことを実証する。

40

【0466】

mPD-1-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の有効性は、ネズミ結腸直腸癌細胞株C

50

T26 同種移植片における抗 Qa1 抗体と比較して検討した。Balb/c マウスに CT26 細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗 Qa1 抗体 (Bio x cell クローン 4C2.4A7.5H11)、及び (3) 300 μ g/マウスの mPD-1-Fc-NKG2A キメラタンパク質。マウスを、接種後 5、8、11、及び 14 日目に処理し、指示された時間に腫瘍体積を測定した。図 93A に示すように、抗 Qa1 抗体及び mPD-1-Fc-NKG2A キメラタンパク質での処理により、未処理のマウスと比較して、腫瘍成長が著しく遅延した。11 日目の腫瘍体積を図 93B にプロットする。mPD-1-Fc-NKG2A キメラタンパク質による処理により、抗 Qa1 抗体の処理と比較して、11 日目の腫瘍体積がより多く減少した (図 93B)。これらの結果は、mPD-1-Fc-NKG2A キメラタンパク質が、抗 Qa1 抗体と同様の効果で、腫瘍成長を有意に低下させたことを実証する。

10

【0467】

まとめて、これらの結果は、本明細書に開示されるキメラタンパク質が、抗 Qa1 抗体と少なくとも同じくらいがんにに対して有効であることを実証する。

【0468】

実施例 40：抗原活性化 T 細胞を有する抗原陽性リンパ腫同種移植片に対する、本開示のキメラタンパク質のインビボ有効性

この実験の目的は、抗原活性化 T 細胞の存在下で、抗原に対して陽性であるがんの成長に対する、本開示のキメラタンパク質の効果を試験することであった。新規抗原 OVA (EG7-OVA) を発現するように操作されたネズミリンパ腫細胞株 EG7 の成長に対する、mCD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質の効果を検討した。簡単に述べると、マウスに EG7-OVA 細胞を接種し、CD4 及び CD8 OVA 特異的 T 細胞を注入した。マウスを、以下の 4 つの処理群のうちの 1 つに無作為に割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g/マウスの抗 PD1 抗体 (Bio x cell クローン RMP1-14)、(3) 100 μ g/マウスの抗 NKG2A (Bio x cell クローン 20D5)、及び (4) 300 μ g/マウスの CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質。マウスを、接種後 0、2、4、6、8 及び 10 日目に処理した。マウスを、接種後 0、2、4、6、8 及び 10 日目に処理した。腫瘍体積を測定した。図 94A に示すように、抗 PD1 抗体、抗 NKG2A 抗体、または CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質での各処理により、未処理マウスと比較して、腫瘍成長が遅延した。CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質は、抗 PD1 抗体または抗 NKG2A 抗体と比較して、腫瘍サイズをより多く減少させた。7 日目の腫瘍体積を図 94B にプロットする。CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質による処理により、抗 PD-1 抗体と比較して、腫瘍が有意に多く減少した。これらの結果は、mCD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質が腫瘍成長を有意に低下させ、抗 PD-1 抗体よりも性能が優れていたことを実証している。

20

30

【0469】

本明細書に開示されるキメラタンパク質で処理されたマウスの免疫構成を理解するために、以下の抗体を使用して、末梢表現型検査を実行した：CD44:PE/Cy7 (Bio legend: 103209 クローン IM7)、CD62L:APC (Bio legend: 104427 クローン MEL-14)、CD4:BV605 (Bio legend: 100451 クローン GK1.5)、Va2:AF488 (Bio legend: 127819 クローン B20.1)、CD8:AF700 (Bio legend: 100729 クローン 53-6/7)、及び PD1:BV421 (Bio legend: 135217 クローン 29F.1A12)。トランスジェニックから OT-1 マウスまでの OT-I: GFP からの細胞を使用して、OT-1 細胞を測定した。0 日目及び 3 日目のエフェクターメモリー T 細胞 (TEM 細胞) の画分をプロットする。図 95 に示されるように、CD86-Fc-NKG2A キメラタンパク質による効果により、抗 PD1 抗体、抗 NKG2A 抗体、または未処理マウスによる処理と比較して、エフェクターメモリー T 細胞 (TEM 細胞) が増加した。

40

50

【0470】

これらの結果は、本明細書に開示されるキメラタンパク質が、腫瘍成長を著しく低下させ、エフェクターメモリーT細胞（TEM細胞）集団を増強することを示す。

【0471】

実施例41：骨髄単球性白血病同種移植片に対する本開示のキメラタンパク質のインビオ有効性

この実験の目的は、本明細書に開示されるキメラタンパク質のがんに対する有効性をさらに検討することであった。いくつかのキメラタンパク質の有効性を、ネズミ骨髄単球性白血病細胞株WEHI-3同種移植片における抗PD-1抗体及び抗NKG2a抗体と比較して検討した。

【0472】

WEHI-3同種移植片に対するCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の効果を、抗PD-1抗体及び抗NKG2A抗体と比較して検討した。簡潔に述べると、Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：（1）未処理、（2）100μg/マウスの抗PD1抗体（BioxcellクローンRMP1-14）、（3）100μg/マウスの抗NKG2A抗体（Bioxcellクローン20D5）、及び（4）300μg/マウスのCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。マウスは、2日空けて6回処理した。腫瘍体積を測定した。図96Aに示すように、抗NKG2A抗体またはCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質での各処理により、未処理マウスと比較して、腫瘍成長が遅延した。抗PD1抗体による処理は有意な効果を及ぼさなかった。CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、抗PD1抗体または抗NKG2A抗体と比較して、腫瘍サイズをより多く減少させた。18日目の腫瘍体積を図96Bにプロットする。CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による処理は、未処理マウス及び抗PD-1抗体処理マウスの両方における腫瘍と比較して、有意に腫瘍体積が減少した。これらの結果は、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が腫瘍成長を有意に低下させ、抗PD-1抗体よりも性能が優れていたことを実証している。これらの結果は、WEHI3腫瘍の腫瘍体積の減少において、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が抗PD-1及び抗NKG2A抗体よりも性能が優れていたことを実証する。

【0473】

WEHI-3同種移植片に対するSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の効果を、抗PD-1抗体及び抗NKG2A抗体と比較して検討した。簡潔に述べると、Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：（1）未処理、（2）100μg/マウスの抗PD1抗体（BioxcellクローンRMP1-14）、（3）100μg/マウスの抗NKG2A抗体（Bioxcellクローン20D5）、及び（4）300μg/マウスのSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。マウスは、2日空けて6回処理した。腫瘍体積を測定した。図97Aに示すように、抗NKG2A抗体またはSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による各処理により、未処理マウスと比較して、腫瘍成長が遅延した。抗PD1抗体による処理は有意な効果を及ぼさなかった。SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、抗PD1抗体または抗NKG2A抗体と比較して、腫瘍サイズをより多く減少させた。18日目の腫瘍体積を図97Bにプロットする。SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による処理は、未処理マウス及び抗PD-1抗体処理マウスの両方における腫瘍と比較して、有意に腫瘍体積が減少した。これらの結果は、mSIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が腫瘍成長を有意に低下させ、抗PD-1抗体よりも性能が優れていたことを実証している。これらの結果は、WEHI3腫瘍の腫瘍体積の減少において、SIRPα-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が抗PD-1及び抗NKG2A抗体よりも性能が優れていたことを実証する。

10

20

30

40

50

【0474】

WEHI-3 同種移植片に対するCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の効果を、抗PD-1抗体及び抗NKG2A抗体と比較して検討した。簡潔に述べると、Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 µg/マウスの抗PD1抗体 (BioxcellクローンRMP1-14)、(3) 100 µg/マウスの抗NKG2A抗体 (Bioxcellクローン20D5)、及び(4) 300 µg/マウスのCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。マウスは、2日空けて6回処理した。腫瘍体積を測定した。図98Aに示すように、抗NKG2A抗体またはCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質での各処理により、未処理マウスと比較して、腫瘍成長が遅延した。抗PD1抗体による処理は有意な効果を及ぼさなかった。CD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、抗PD1抗体または抗NKG2A抗体と比較して、腫瘍サイズをより多く減少させた。18日目の腫瘍体積を図98Bにプロットする。CD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による処理は、未処理マウス及び抗PD-1抗体処理マウスの両方における腫瘍と比較して、有意に腫瘍体積が減少した。これらの結果は、mCD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が腫瘍成長を有意に低下させ、抗PD-1抗体よりも性能が優れていたことを実証している。これらの結果は、WEHI3腫瘍の腫瘍体積の減少において、CD48-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が抗PD-1及び抗NKG2A抗体よりも性能が優れていたことを実証する。

10

20

【0475】

WEHI-3 同種移植片に対するTGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の効果を、抗PD-1抗体及び抗NKG2A抗体と比較して検討した。簡潔に述べると、Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の処理群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 µg/マウスの抗PD1抗体 (BioxcellクローンRMP1-14)、(3) 100 µg/マウスの抗NKG2A抗体 (Bioxcellクローン20D5)、及び(4) 300 µg/マウスのTGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。マウスは、2日空けて6回処理した。腫瘍体積を測定した。図99Aに示すように、抗NKG2A抗体またはTGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質での各処理により、未処理マウスと比較して、腫瘍成長が遅延した。抗PD1抗体による処理は有意な効果を及ぼさなかった。TGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、抗PD1抗体または抗NKG2A抗体と比較して、腫瘍サイズをより多く減少させた。18日目の腫瘍体積を図99Bにプロットする。TGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質による処理は、未処理マウス及び抗PD-1抗体処理マウスの両方における腫瘍と比較して、有意に腫瘍体積が減少した。これらの結果は、mTGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が腫瘍成長を有意に低下させ、抗PD-1抗体よりも性能が優れていたことを実証している。これらの結果は、WEHI3腫瘍の腫瘍体積の減少において、TGFB2-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が抗PD-1及び抗NKG2A抗体よりも性能が優れていたことを実証する。

30

40

【0476】

まとめて、これらの結果は、本明細書に開示されるキメラタンパク質が、がんに対して抗PD-1及び抗NKG2A抗体よりも有効であることを実証する。

【0477】

本明細書に開示されるキメラタンパク質の作用機序をさらに理解するために、CD8 T細胞の役割を探索した。CD8+細胞を枯渇させることが知られている抗CD8a抗体 (Bioxcellクローン2.43) を使用してCD8 T細胞を枯渇させ、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質が腫瘍増殖を制御する能力を測定した。簡潔に述べると、Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の治療群にランダムに割り当てた：(1) 250 µg/マウスの抗CD8a抗体

50

(Bioxcclクローン2.43)、(2) 300 μ g / マウスのCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質、及び(3) 250 μ g / マウスの抗CD8a抗体(Bioxcclクローン2.43) + 300 μ g / マウスのCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。抗CD8a抗体(Bioxcclクローン2.43)を治療レジメンの-1日目、1日目、及び3日目に投与して、CD8細胞を枯渇させた。群2及び3のマウスを、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で接種後0、2、4、6、8及び10日目に処理した。マウスは、2日空けて6回処理した。腫瘍体積を、指示した日に測定した。図100Aに示すように、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウスは、抗CD8a抗体で処理したマウスと比較して、より多くの抗腫瘍活性を示した。興味深いことに、抗CD8a抗体及びCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質との併用処理により、観察された抗腫瘍活性が消滅した。図100Bに示すように、18日目の腫瘍体積は、抗CD8a抗体及びCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質の組み合わせと比較して、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質単独で処理したマウスにおいて有意に小さかった。これらの結果は、CD8 T細胞が、本明細書に開示されるキメラタンパク質の抗腫瘍効果に必要であることを実証する。

10

【0478】

実施例42：本開示のキメラタンパク質での処理中の腫瘍、脾臓、及びリンパ節における免疫細胞の浸潤

腫瘍、脾臓、及びリンパ節における免疫細胞のレベルに対する、本開示のキメラタンパク質の効果を検討した。簡潔に述べると、Balb/cマウスにWEHI-3細胞を接種した。腫瘍が確立された後、マウスを、以下の治療群にランダムに割り当てた：(1) 未処理、(2) 100 μ g / マウスの抗NKG2A抗体(Bioxcclクローン20D5)、及び(3) 300 μ g / マウスのCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質。マウスを、接種後1、3、5、及び7日目に処理した。未処理の処理後8日目に、抗NKG2A抗体、及びmCD86-Fc-NKG2Aマウスを殺し、腫瘍、リンパ節、及び脾臓を単離し、消化し、NKパネル及び抗体のT細胞パネルを使用して、これらの各環境における異なる免疫細胞の量について分析した。NKパネルは、NKG2A-PeCy7 (Biolegend 142809クローン16A11)、CD107-PE (Biolegend: 121611クローン1D4B)、CD137-APC (Biolegend: 106109クローン17B5)、グランザイムB-Fitc (Biolegend 515402クローンGB11)、NKP46-BV421 (Biolegend 137611クローン29A1.4)、CD16-BV510 (Biolegend 149531クローン9E9)、CD27-PerCP-Cy5.5 (Biolegend 124213クローンLG.3A10)、KLRG1-BV605 (Biolegend 138419クローン2F1/KLRG1)、CD11b-APC/Cy7 (Biolegend 101225クローンM1/70)、及びCD3-AF700 (Biolegend 100215クローン17A2)を含んでいた。T細胞パネルは、NKG2A-PeCy7 (Biolegend 142809クローン16A11)、CD3-Fitc (Biolegend 100306クローン145-2C11)、CD8a-AF700 (Biolegend 100729クローン54-6.7)、CD62L-BV421 (Biolegend 104435クローンMEL-14)、CD44-PeCy5 (Biolegend 103009クローンIM7)、パーフォリン: PE (Biolegend 154305クローンS16009A)、IAIE-BV605 (Biolegend 107639クローンM5/114.15.2)、PD1-BV510 (Biolegend 135241クローン29F.1A12)、IFN-g-APC/Cy7 (Biolegend 505849クローンXMG1.2)、及びCD137-APC (Biolegend 106109クローン17B5)を含んでいた。

20

30

40

【0479】

図101Aに示すように、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウスでは、未処理マウス及び抗NKG2A抗体で処理したマウスと比較して、サイトカイン

50

分泌CD3-CD11b+CD27+脾細胞が有意に増加した。同様に、脾臓におけるCD3-NKG2A+CD11b+CD27+サイトカイン分泌NK細胞（図101B）、及び脾臓におけるCD3-KLRG1+CD11b+CD27+サイトカイン分泌NK細胞（図101C）は、未処理マウス及び抗NKG2A抗体で処理したマウスと比較して、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウスで有意に増加した。したがって、mCD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、未処理及び抗NKG2A抗体療法の両方と比較して、脾臓におけるサイトカイン分泌細胞の増殖を誘導した。これらの結果は、本開示のキメラタンパク質が、未処理及び抗NKG2A抗体療法の両方と比較して、脾臓におけるサイトカイン分泌細胞の増殖を誘導することを実証する。

【0480】

脾臓を単離し、消化し、異なる免疫細胞の量について分析した。図102Aに示すように、脾臓におけるPD-1+細胞傷害性Tリンパ球（CTL）は、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウス及び抗NKG2A抗体で処理したマウスでは、未処理マウスと比較して有意に増加した。さらに、図102Bに示すように、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウスでは、未処理マウスと比較して、マウス脾臓内のCD107+細胞が有意に増加した。したがって、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、活性化された細胞毒性T細胞及びCD107+細胞（細胞毒性を向上させるためのマーカー）の成長を誘導した。示されるように、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び抗NKG2A抗体の効果は、本システムにおいて等価であった。これらの結果は、本開示のキメラタンパク質が、活性化された細胞傷害性T細胞及びCD107+細胞（細胞傷害性向上のためのマーカー）の成長を誘導することを実証する。

【0481】

腫瘍を単離し、消化し、腫瘍中のグランザイムB+細胞の量について分析した。図103に示すように、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウス及び抗NKG2A抗体で処理したマウスでは、未処理マウスと比較して腫瘍中のグランザイムB+細胞が有意に増加した。したがって、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、細胞溶解性マーカーグランザイムBで免疫細胞の腫瘍への浸潤強化を誘導した。CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び抗NKG2A抗体の効果は、このシステムにおいて同等であった。これらの結果は、本開示のキメラタンパク質が、細胞溶解性マーカーグランザイムBを用いて、腫瘍への免疫細胞の浸潤強化を誘導することを実証する。

【0482】

加えて、図104Aに示すように、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウス及び抗NKG2A抗体で処理したマウスでは、未処理マウスと比較して腫瘍中のCD137+細胞が有意に増加した。同様に、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウス及び抗NKG2A抗体で処理したマウスでは、未処理マウスと比較して腫瘍中のIFN γ +細胞が有意に増加した（図104B）。腫瘍におけるPD-1+細胞傷害性Tリンパ球（CTL）は、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウスにおいて、未処理マウスと比較して有意に増加した（図104C）。したがって、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質は、強力な活性化マーカー（CD137、IFN- γ 、及びPD1）を発現する腫瘍への免疫細胞の浸潤強化を誘導した。CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質及び抗NKG2A抗体の効果は、本システムで同等であった。これらの結果は、本開示のキメラタンパク質が、強力な活性化マーカー（例えば、CD137、IFN- γ 、及びPD1）を発現する腫瘍への免疫細胞の浸潤強化を誘導することを実証する。

【0483】

リンパ節を単離し、消化し、異なる免疫細胞の量について分析した。図105Aに示すように、CD86-Fc-NKG2Aキメラタンパク質で処理したマウスでは、未処理マウス及び抗NKG2A抗体で処理したマウスと比較して、リンパ節におけるエフェクターメモリーT細胞が有意に増加した。同様に、未処理マウスと比較して、CD86-Fc-N

K G 2 A キメラタンパク質で処理したマウスのリンパ節において、セントラルメモリー T 細胞が有意に増加した（図 1 0 5 B）。さらに、C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質で処理したマウスでは、未処理マウス及び抗 N K G 2 A 抗体で処理したマウスと比較して、マウスのリンパ節における N K G 2 a + 細胞傷害性 T リンパ球（C T L）が増加した（図 1 0 5 C）。したがって、C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質は、エフェクターメモリー T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、及び N K G 2 A + C D 8 + T 細胞の流入領域リンパ節における免疫細胞の浸潤強化を誘導し、m C D 8 6 - F c - N K G 2 A がこれらの重要なエフェクター免疫細胞の浸潤及び増殖を誘導することができたことを示す。C D 8 6 - F c - N K G 2 A キメラタンパク質及び抗 N K G 2 A 抗体の効果は、本システムで同等であった。これらの結果は、本開示のキメラタンパク質が、エフェクターメモリー T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、及び N K G 2 A + C D 8 + T 細胞の流入領域リンパ節における免疫細胞の浸潤強化を誘導することを実証し、m C D 8 6 - F c - N K G 2 A がこれらの重要なエフェクター免疫細胞の浸潤及び増殖を誘導することができたことを示す。

10

【 0 4 8 4 】

参照による組み込み

本明細書で参照されるすべての特許及び刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 4 8 5 】

本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示に対してのみ提供される。本明細書におけるいずれの内容も、本技術が先行発明によりそのような刊行物に先行する資格がないことを認めるものと解釈されるべきではない。

20

【 0 4 8 6 】

本書で使用されるように、すべての表題は単純に組織化するためのものであり、いかなる様式においても開示を制限することを意図したものではない。あらゆる個々の段落の内容は、すべての段落に等しく適用可能であり得る。

【 0 4 8 7 】

均等物

本発明は、その特定の実施形態に関連して開示したが、さらなる修正が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原理に従って、本発明の任意の変型、使用、または適応を網羅するものであり、本発明が属する技術分野において知られているか、または慣行に含まれるような、及び前述される本質的な特徴に適用され得るもの、ならびに添付の請求項の範囲に含まれるような本開示からの逸脱を含むことを理解されたい。

30

【 0 4 8 8 】

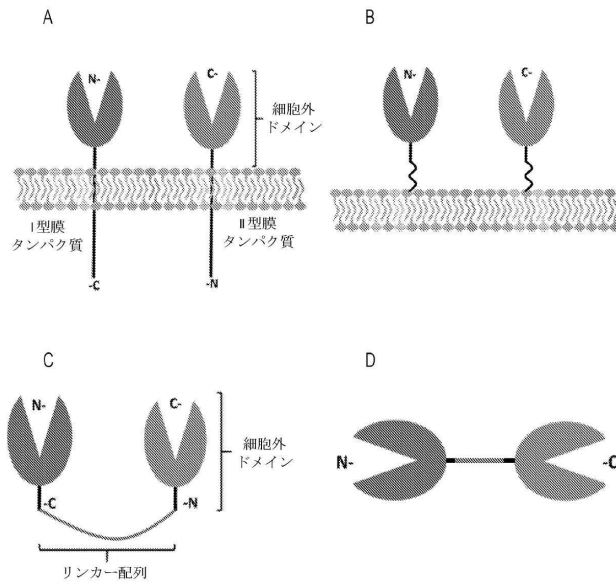
当業者であれば、単なる日常的な実験を使用して、本明細書に詳細に記載される特定の実施形態の多数の均等物を認識するか、または確認することができるであろう。かかる均等物は、以下の特許請求の範囲内に包含されることが企図される。

40

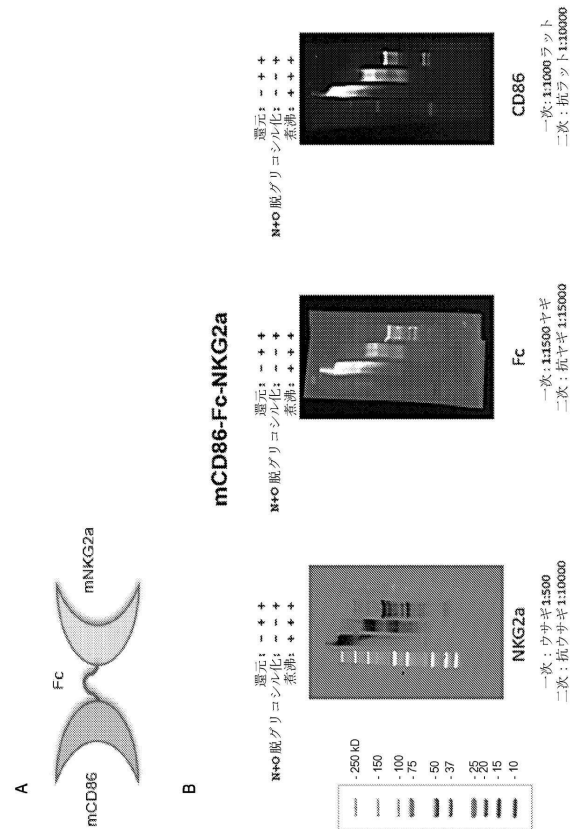
50

【図面】

【図 1】



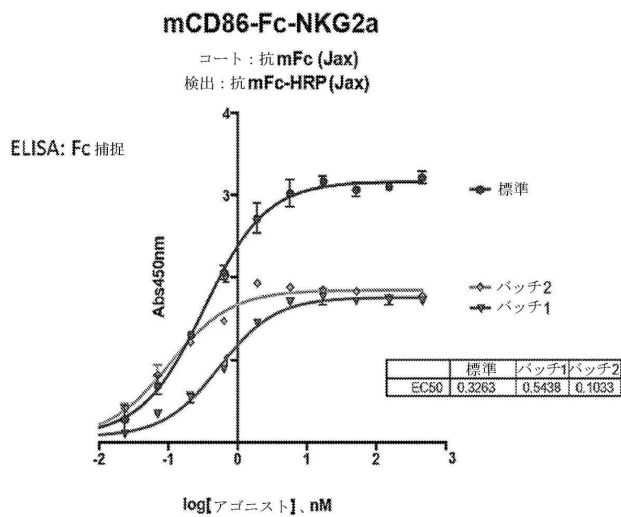
【図 2】



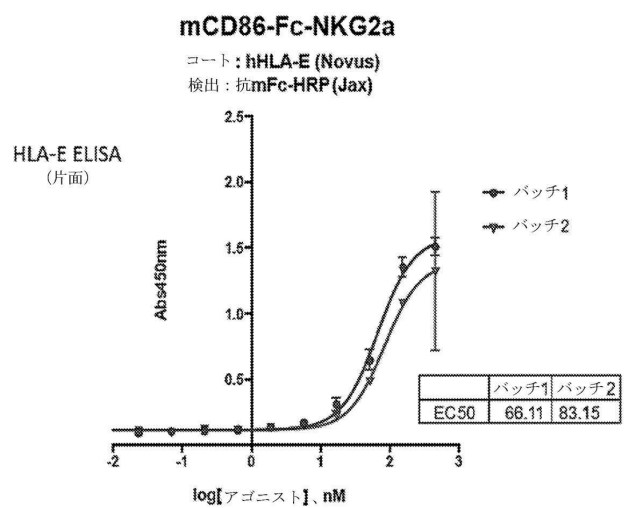
10

20

【図 3 A】



【図 3 B】

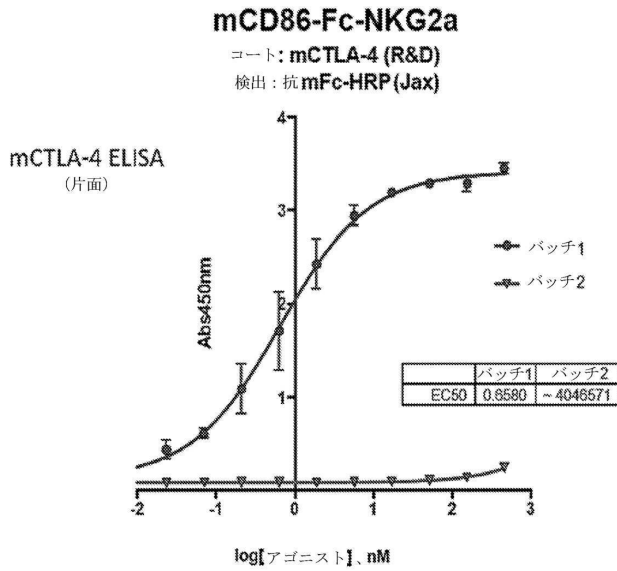


30

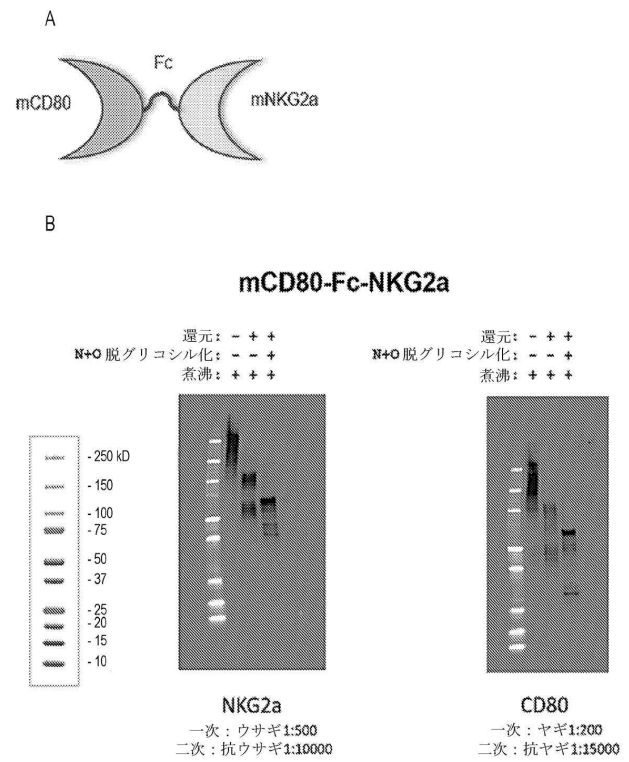
40

50

【図 3 C】



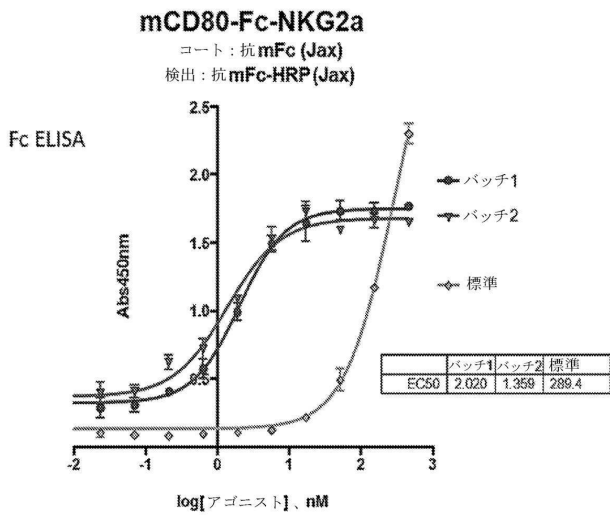
【図 4】



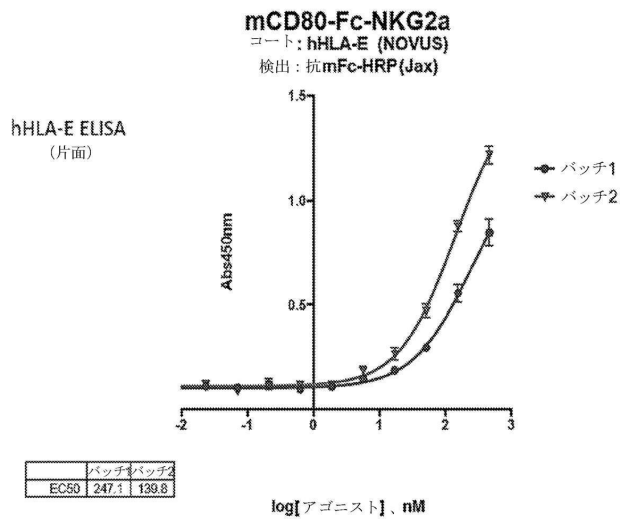
10

20

【図 5 A】



【図 5 B】

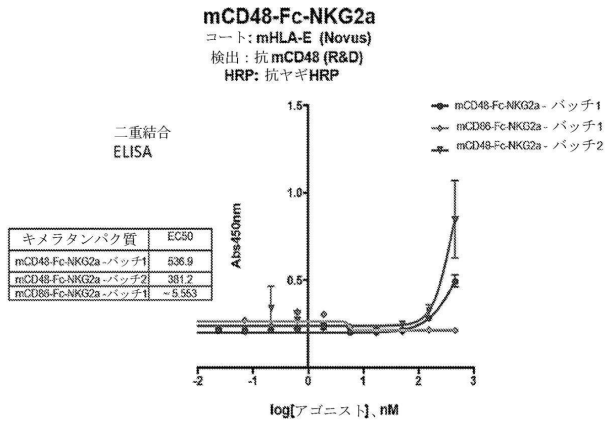


30

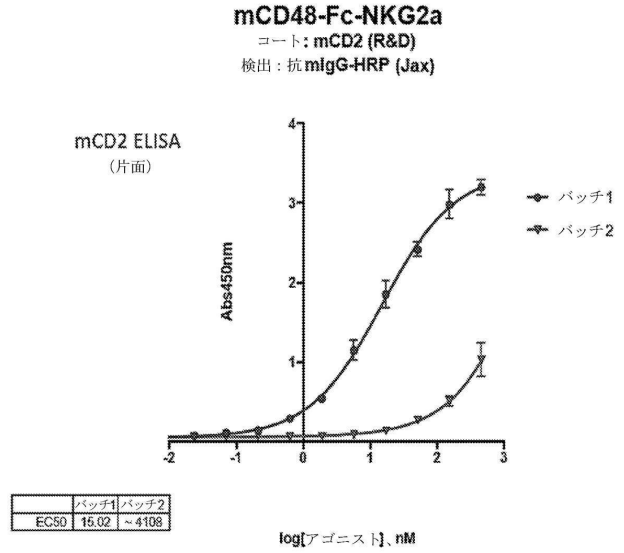
40

50

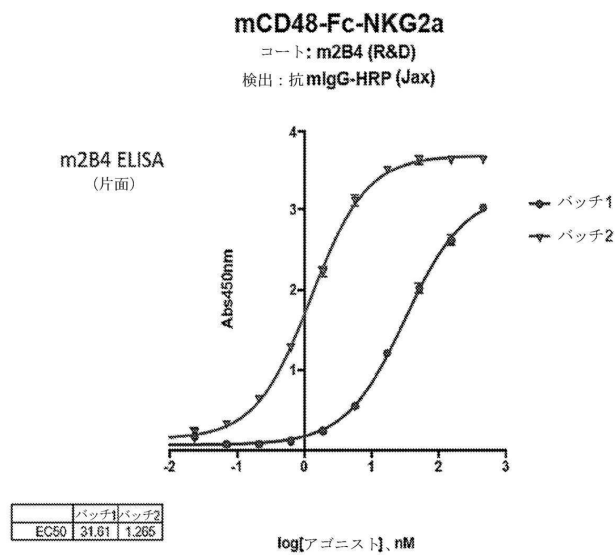
【図 7 B】



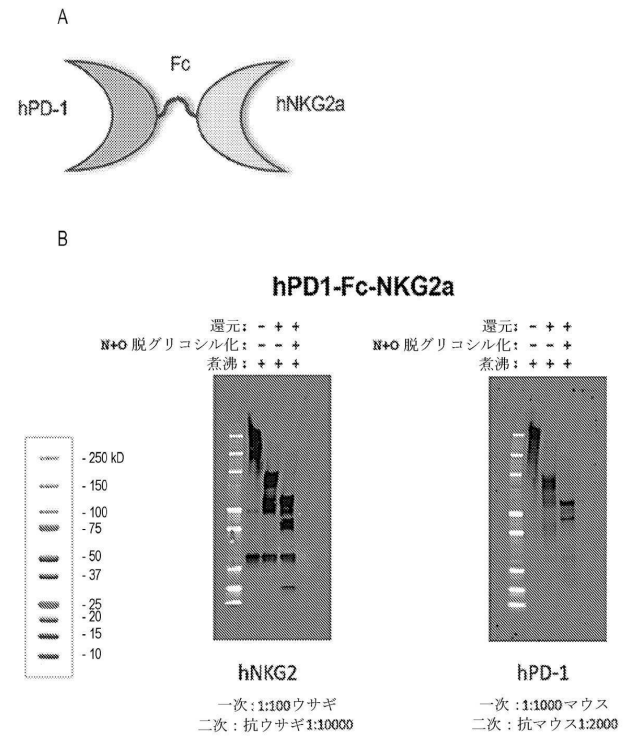
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 8】



10

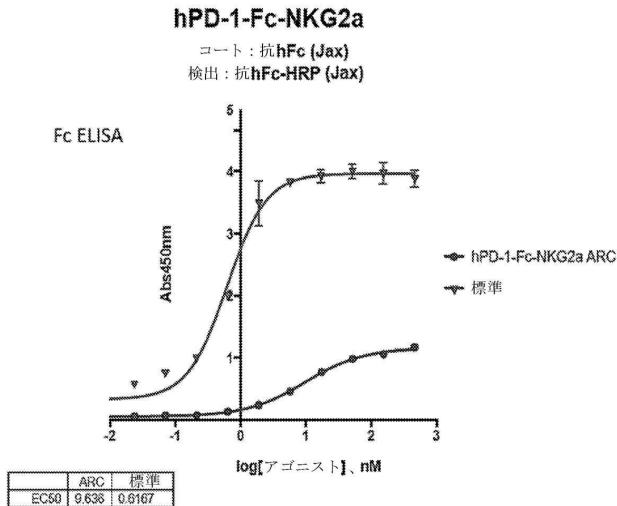
20

30

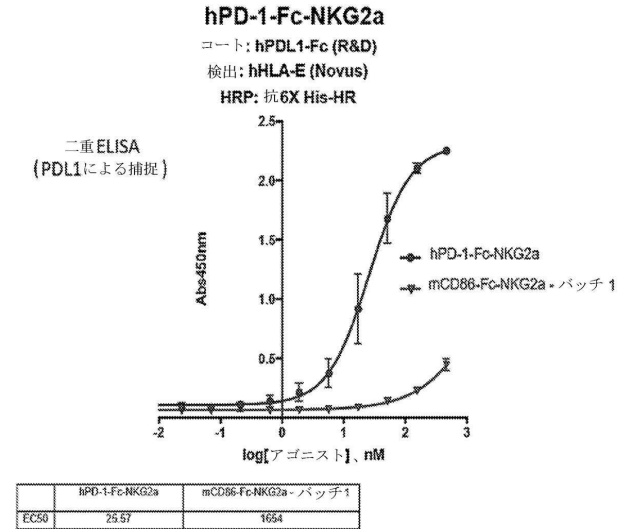
40

50

【図 9 A】

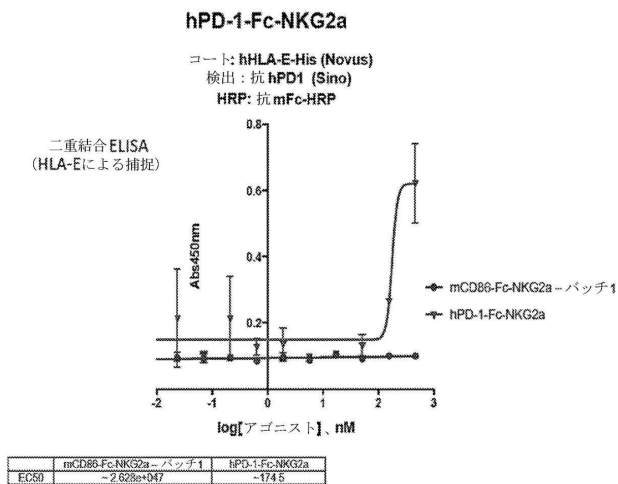


【図 9 B】

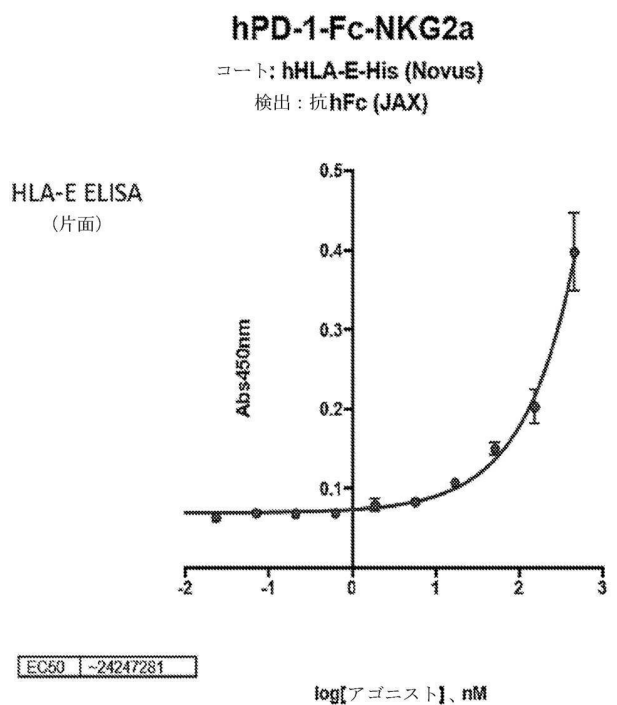


10

【図 9 C】



【図 9 D】



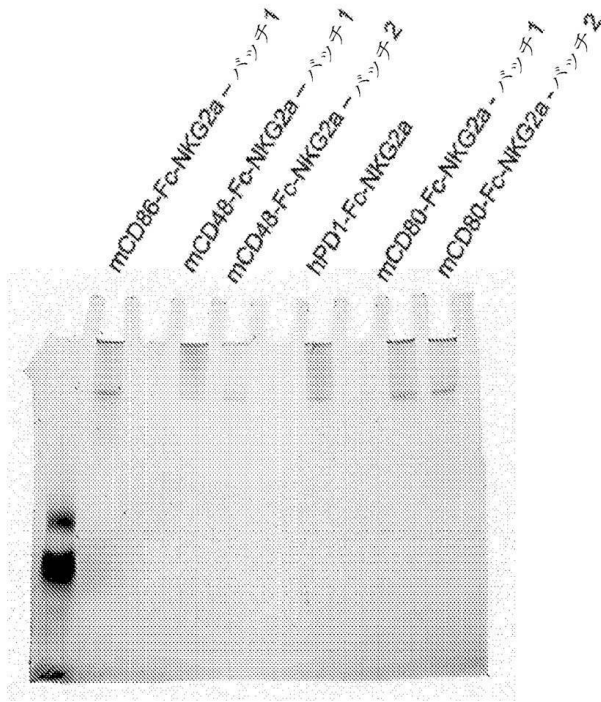
20

30

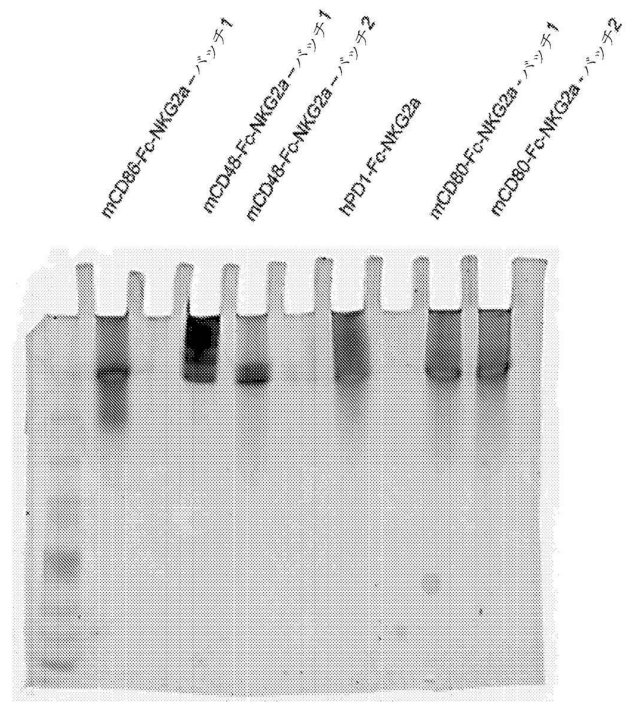
40

50

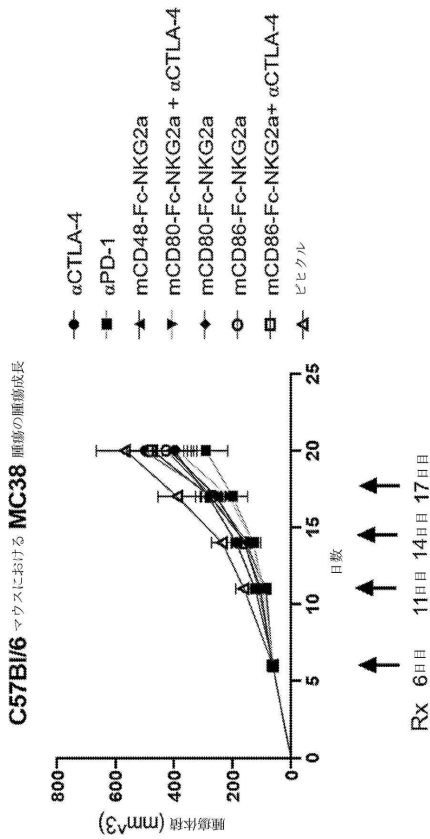
【図 10 A】



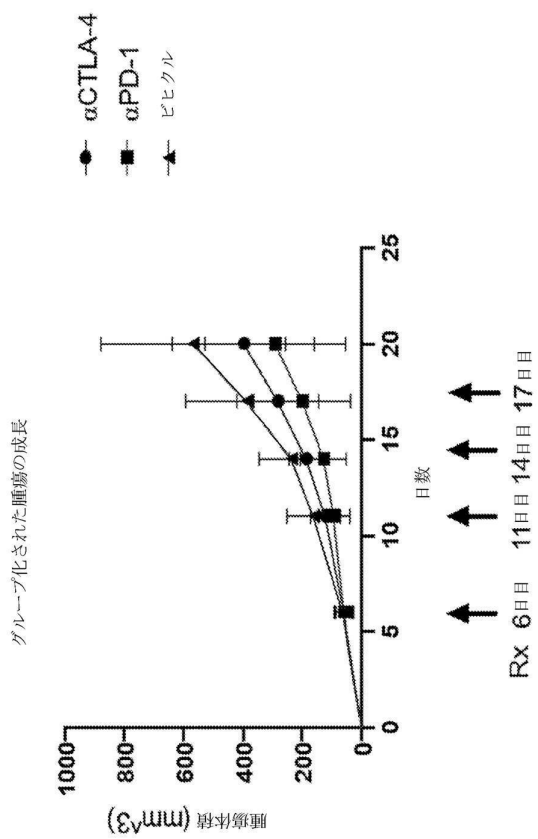
【図 10 B】



【図 11 A】



【図 11 B】



10

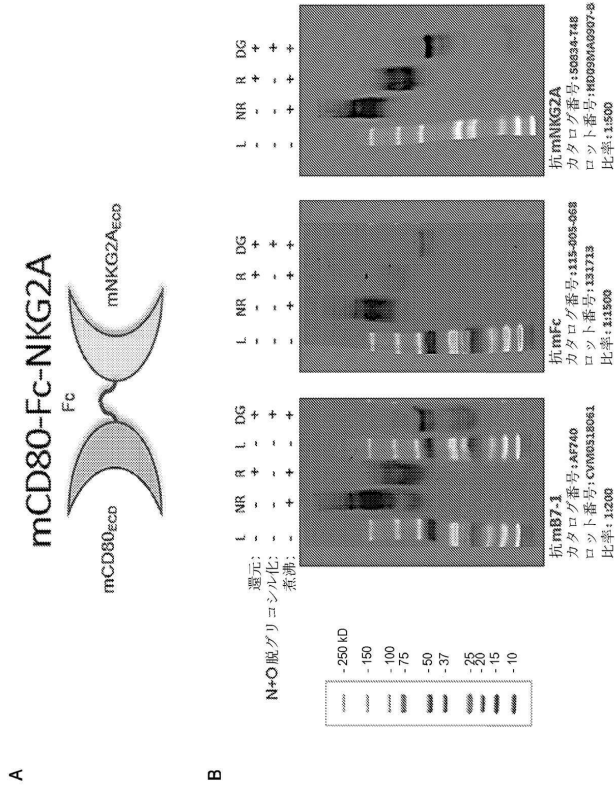
20

30

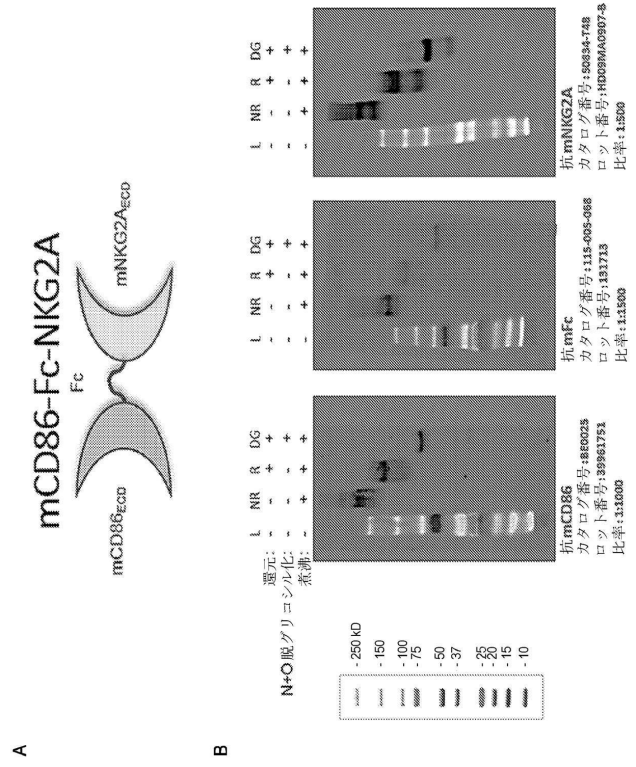
40

50

【図 17】



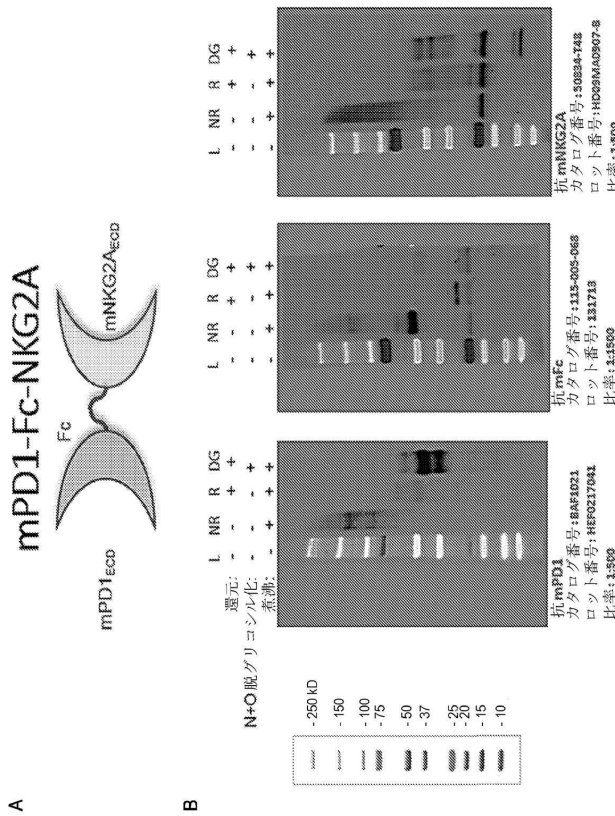
【図 18】



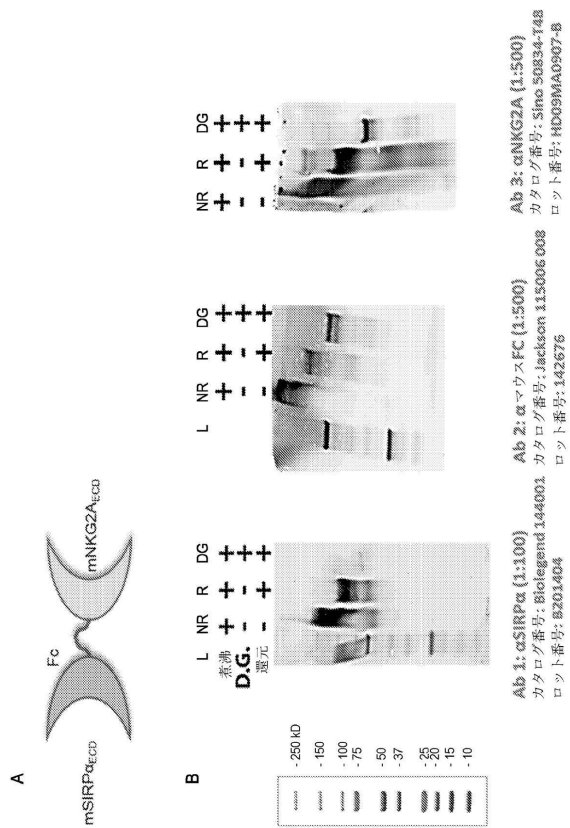
10

20

【図 19】



【図 20】

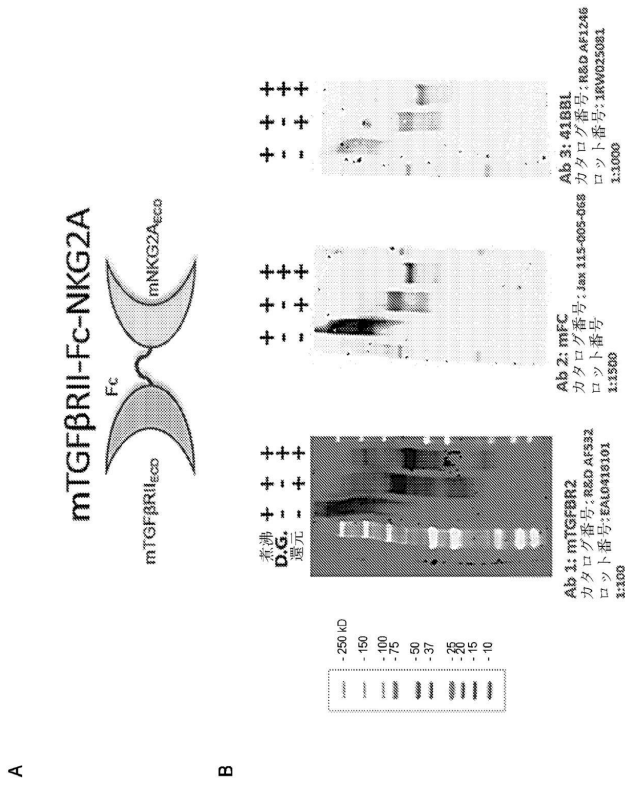


30

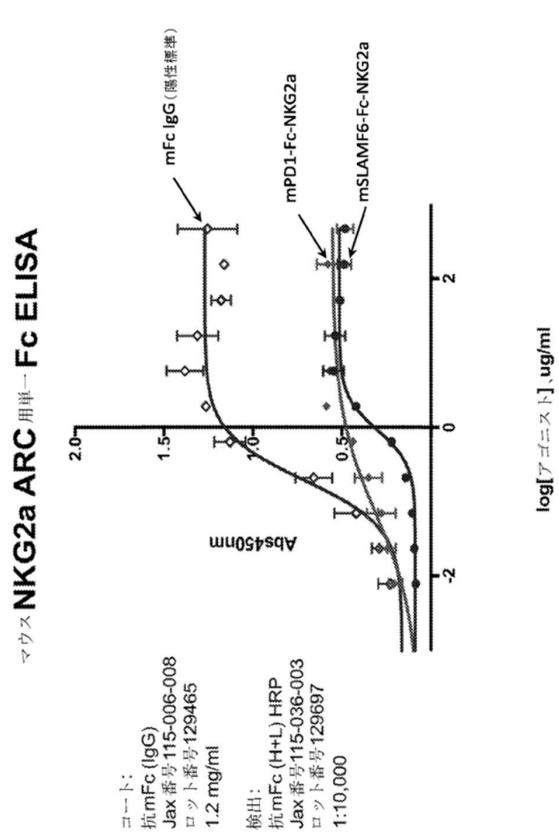
40

50

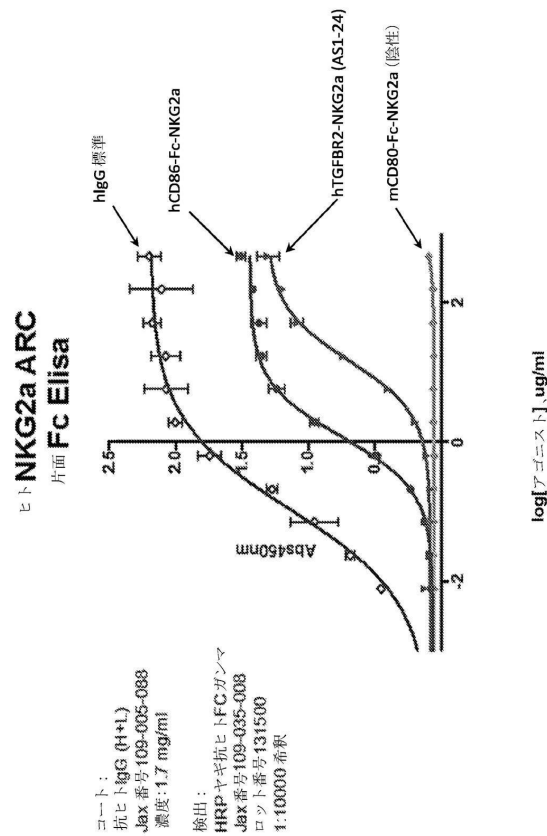
【図 2 1】



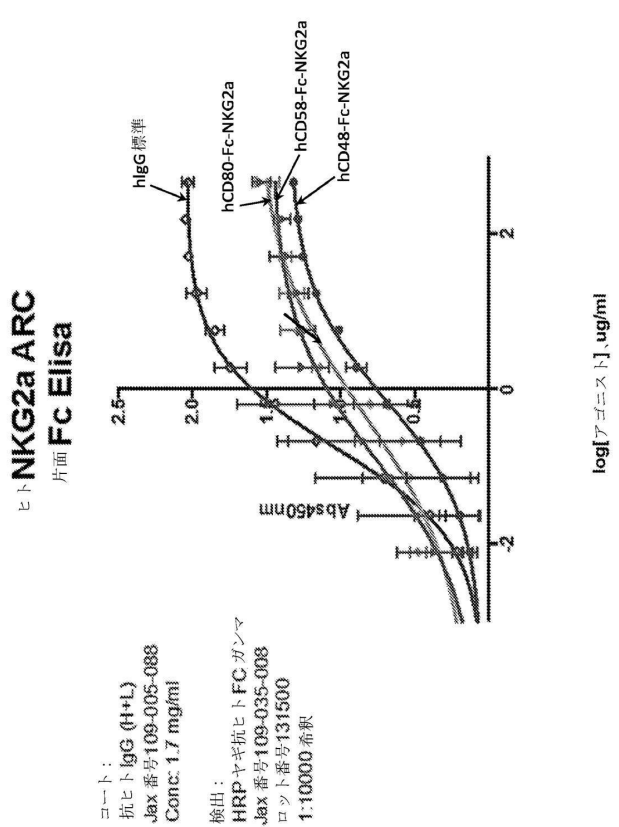
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

20

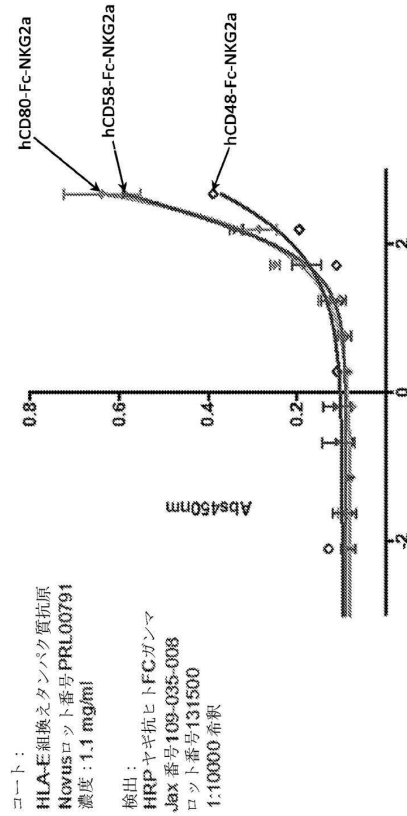
30

40

50

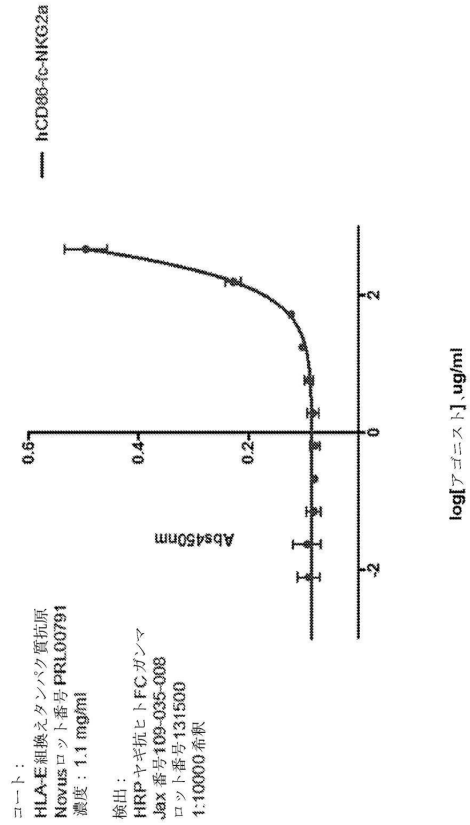
【図 25】

NKG2a ARC
単一 **NKG2a Elisa**



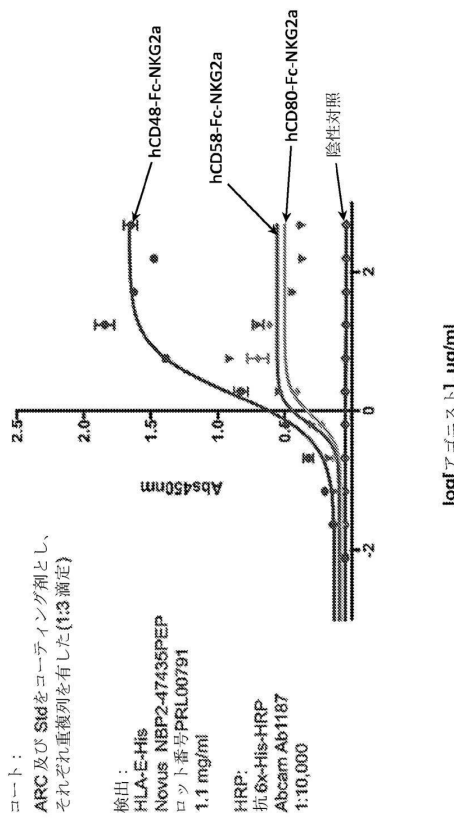
【図 26】

NKG2a ARC
単一 **NKG2a Elisa**



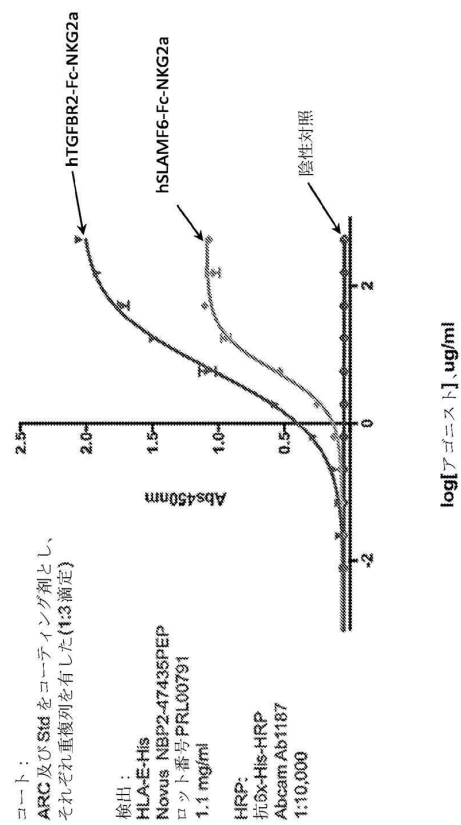
【図 27】

hCD48-fc-NKG2a、hCD58-fc-NKG2a 及び hCD80-fc-NKG2a
単一 **HLA-E Elisa**



【図 28】

hTGFR2-fc-NKG2a 及び hSLAMF6-fc-NKG2a
単一 **HLA-E Elisa**



10

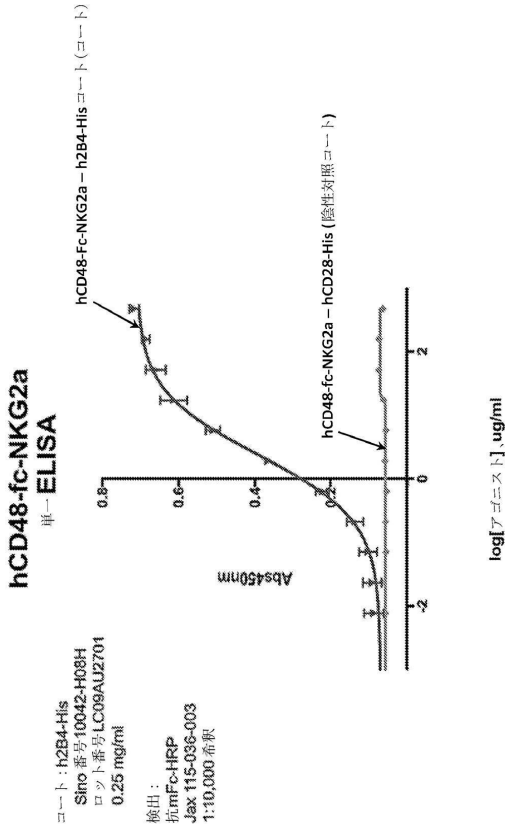
20

30

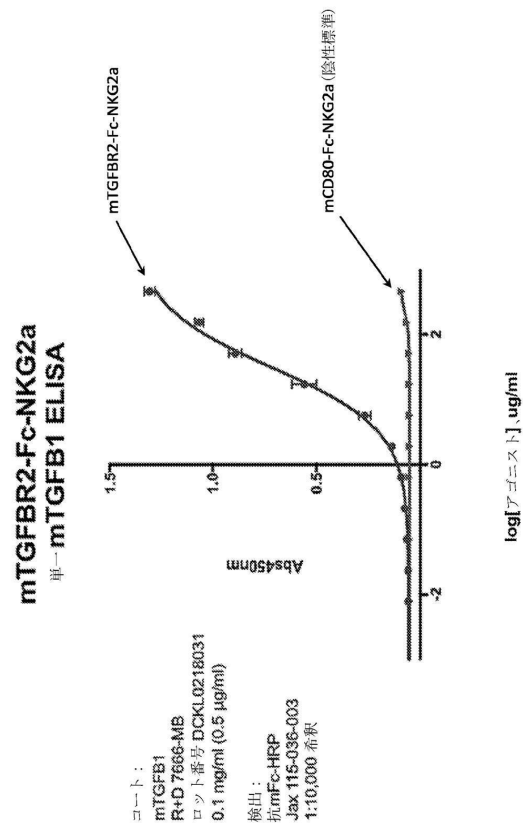
40

50

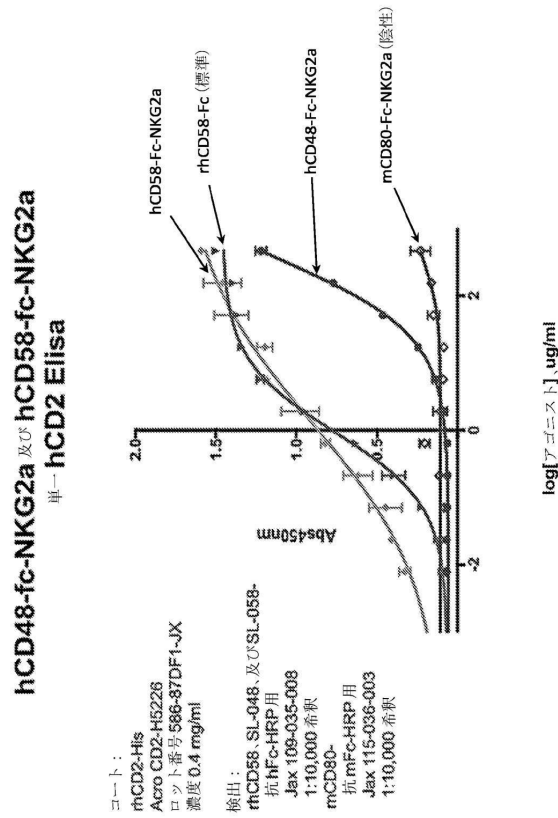
【図 29】



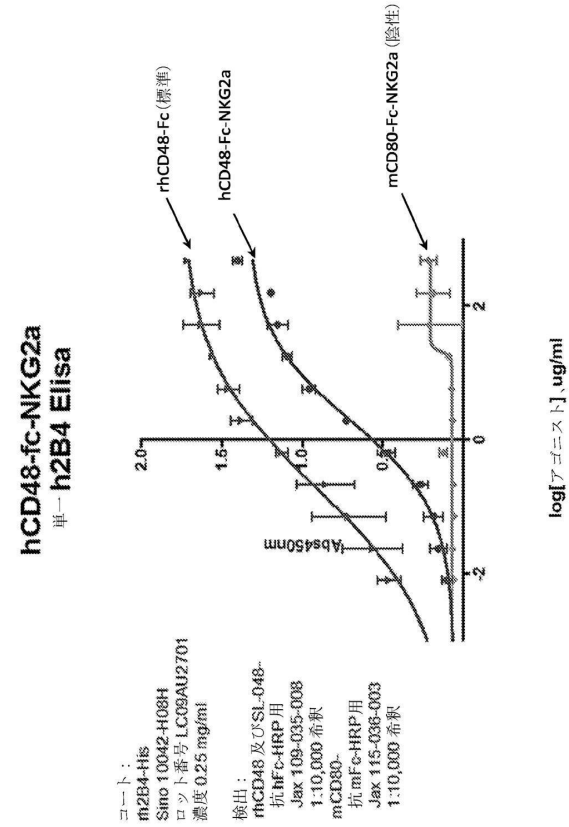
【図 30】



【図 31】



【図 32】



10

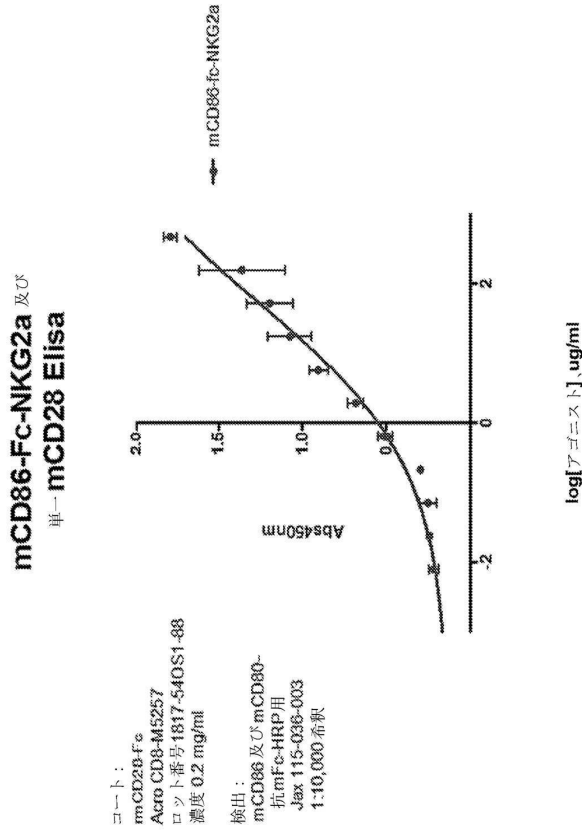
20

30

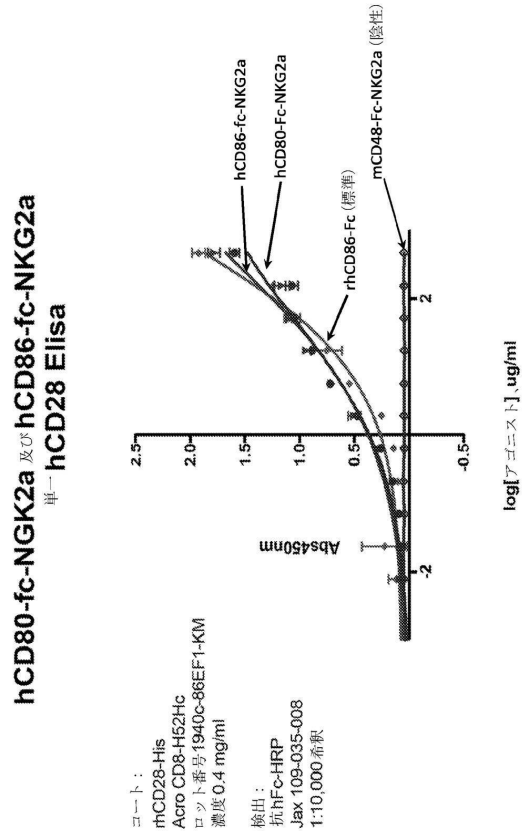
40

50

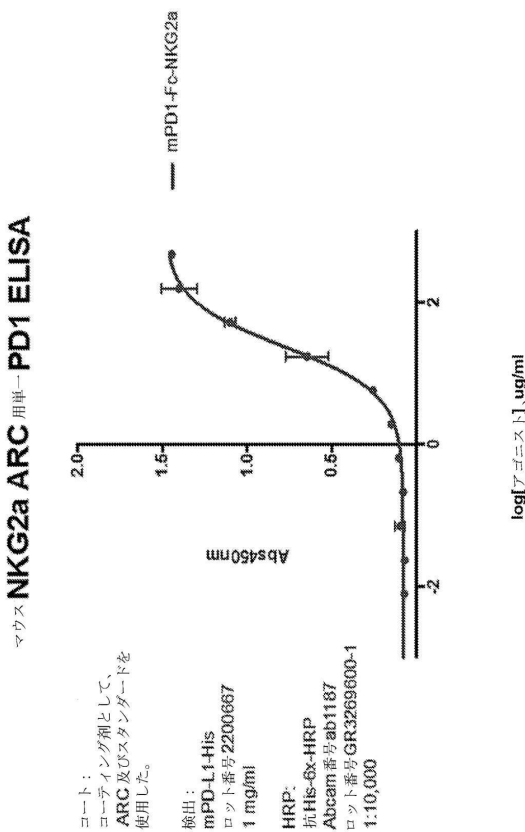
【図 3 3】



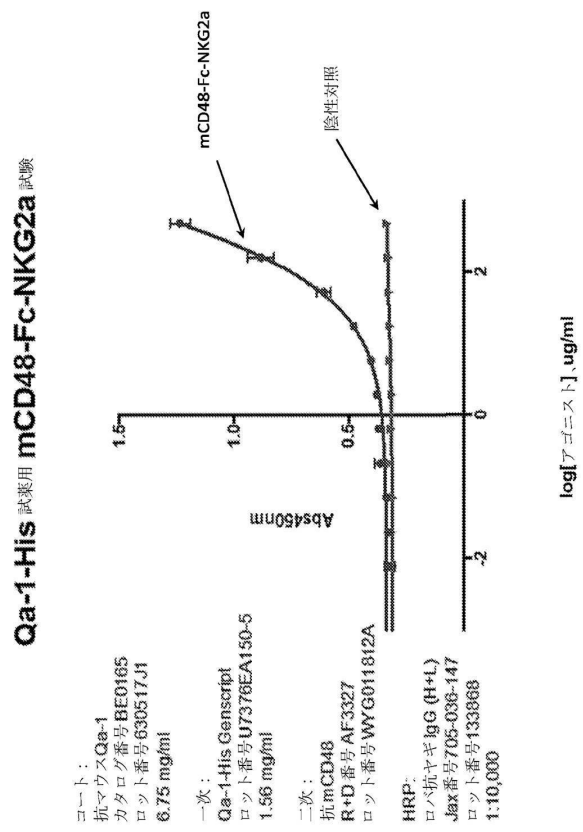
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】



10

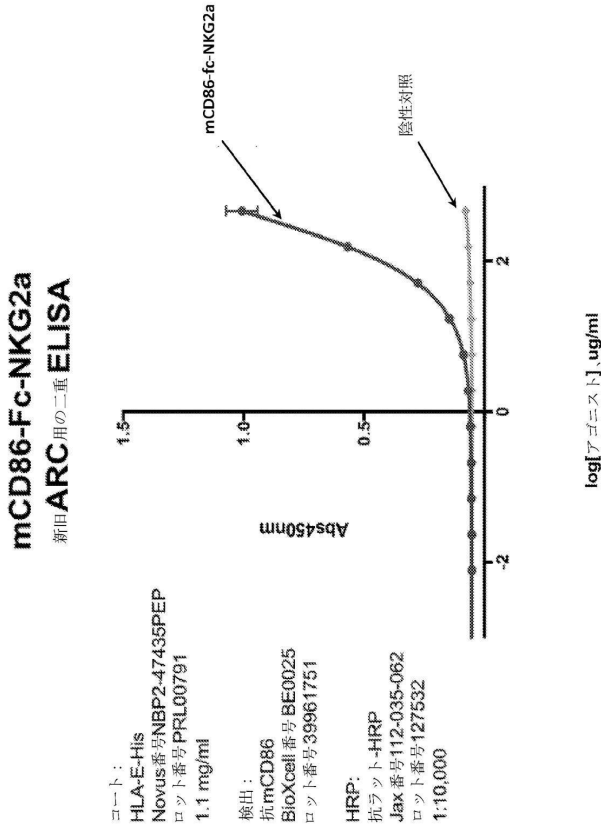
20

30

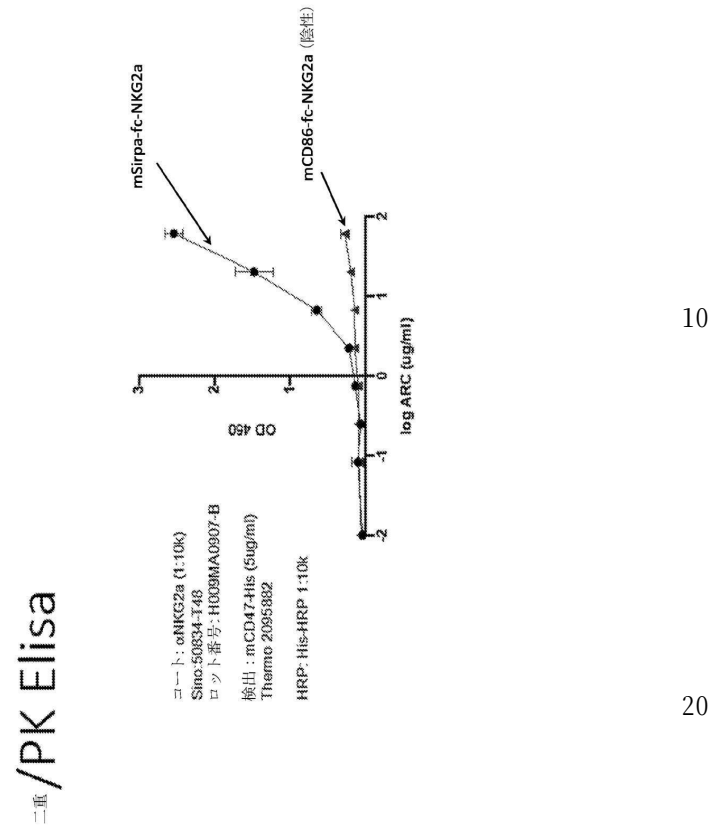
40

50

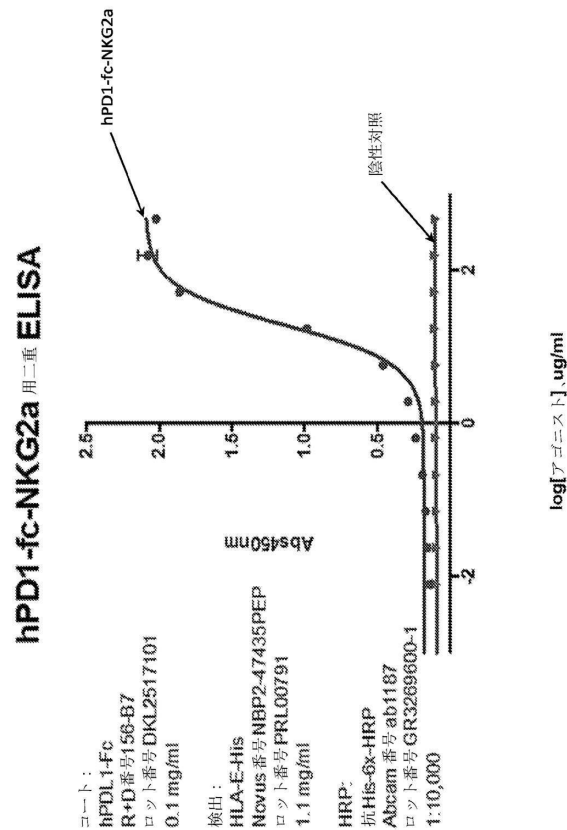
【図 37】



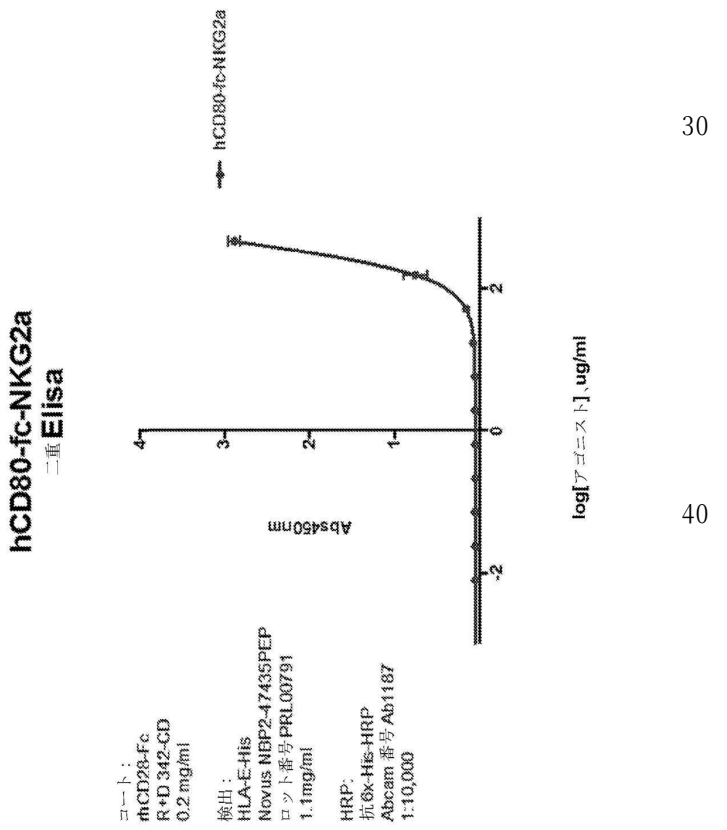
【図 38】



【図 39】



【図 40】



10

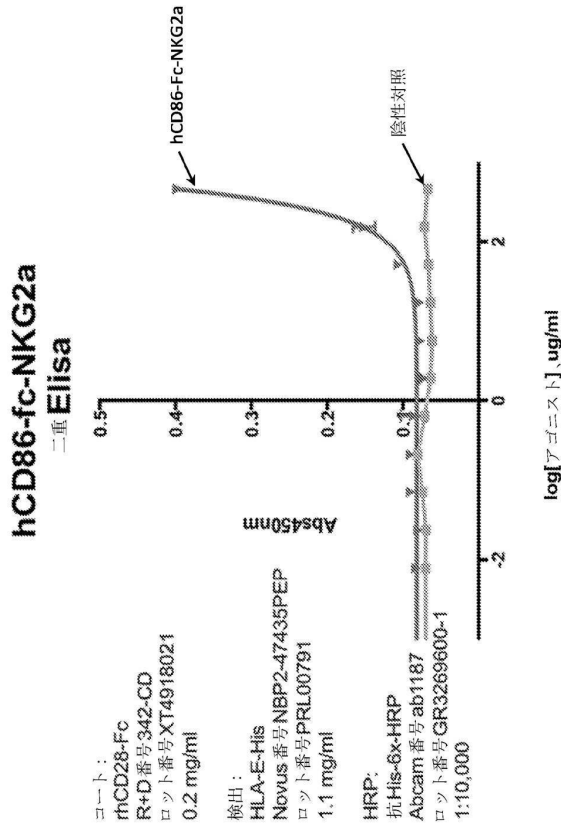
20

30

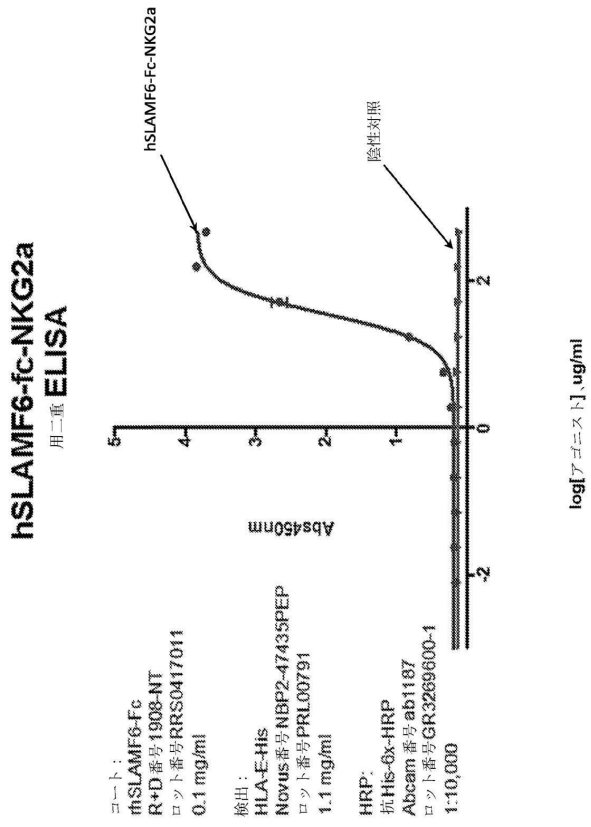
40

50

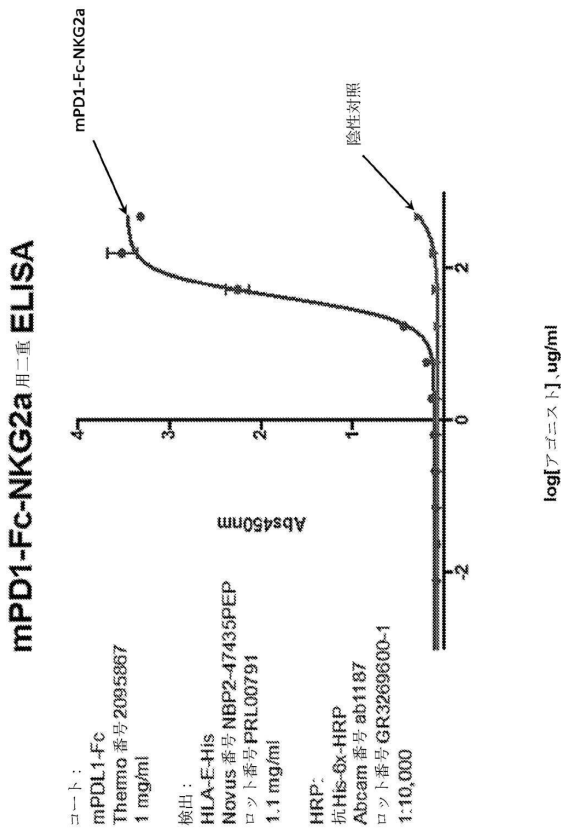
【図 4 1】



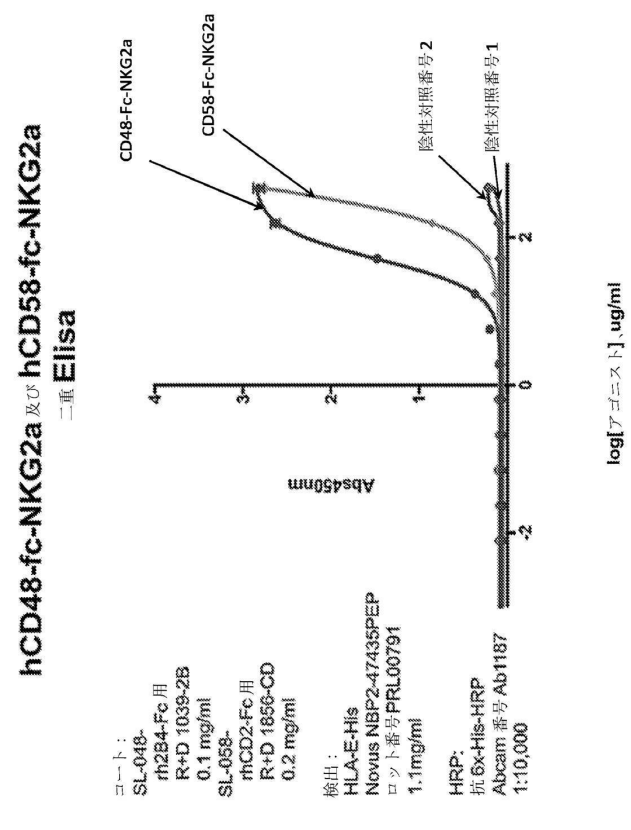
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



10

20

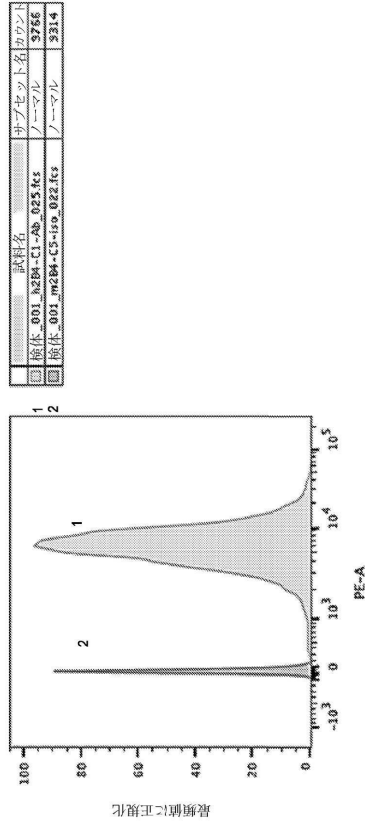
30

40

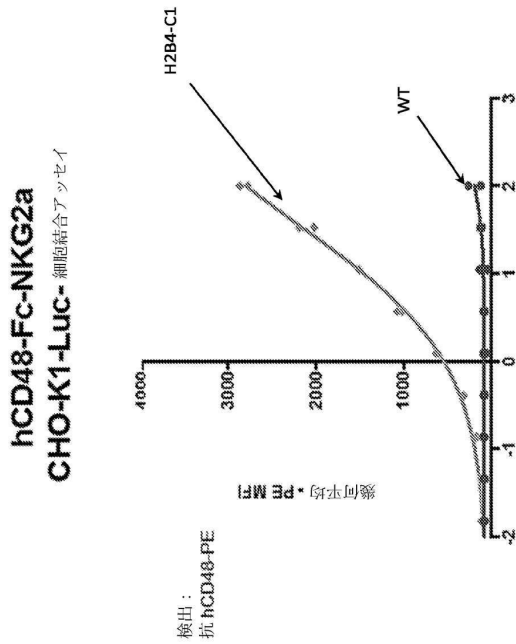
50

【図 4 5】

CHO-K1-Luc-h2B4-クロロゲン



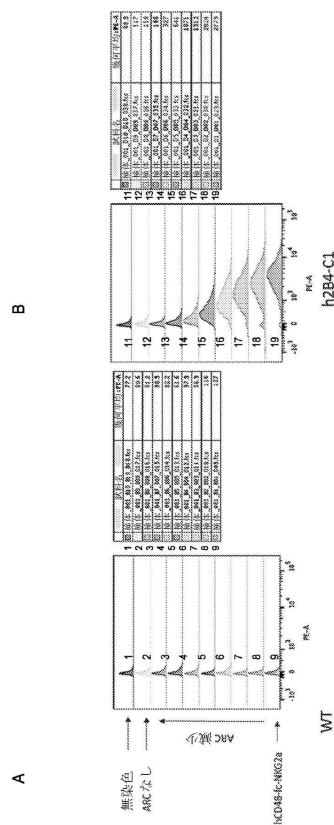
【図 4 7】



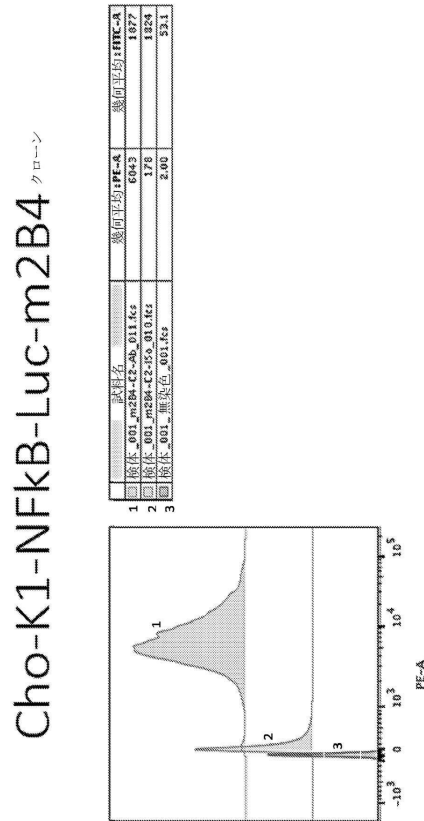
log[アゴニスト]、ug/ml

Cho-K1-NFkB-Luc-m2B4 クロロゲン

【図 4 6】



【図 4 8】



10

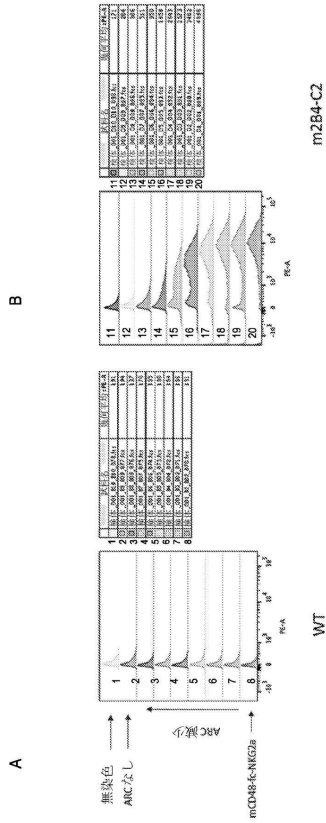
20

30

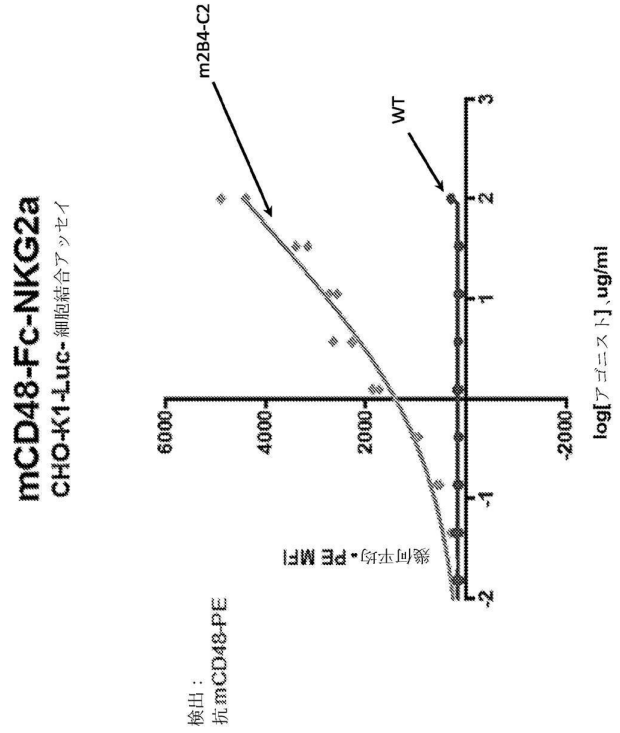
40

50

【図 4 9】



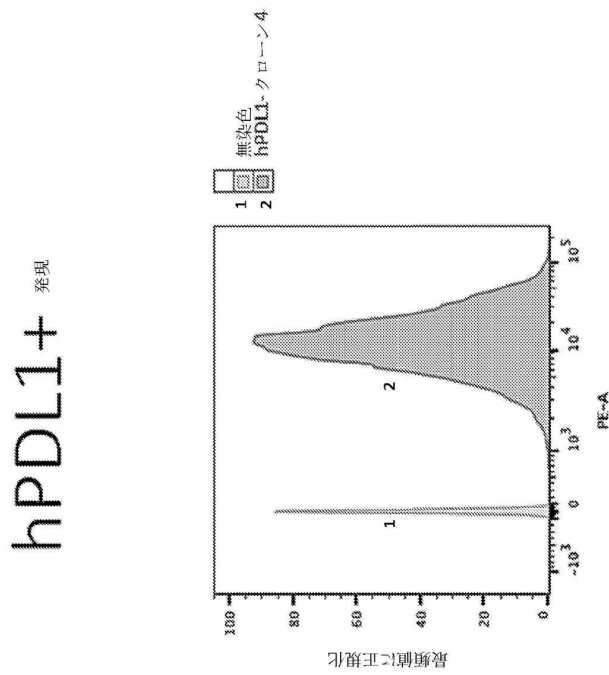
【図 5 0】



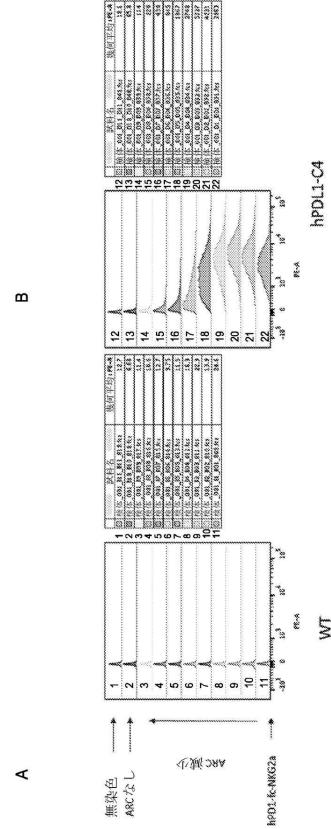
10

20

【図 5 1】



【図 5 2】

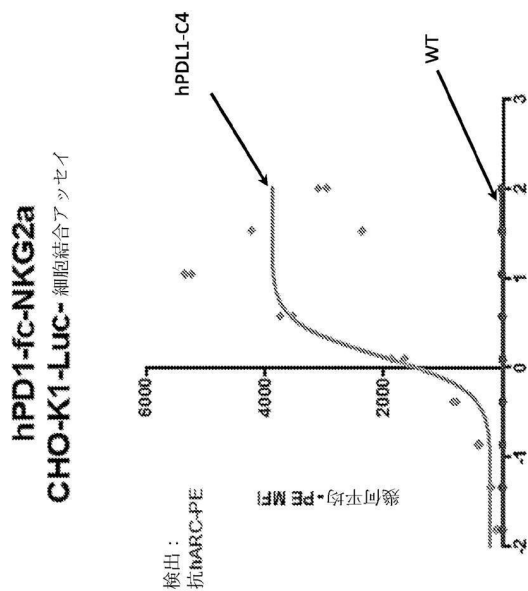


30

40

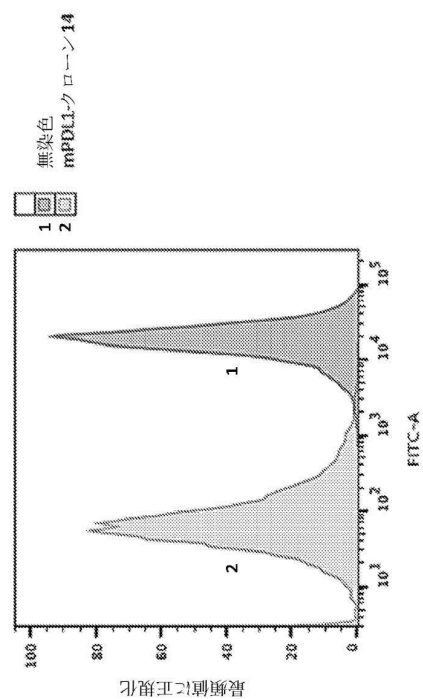
50

【図 5 3】

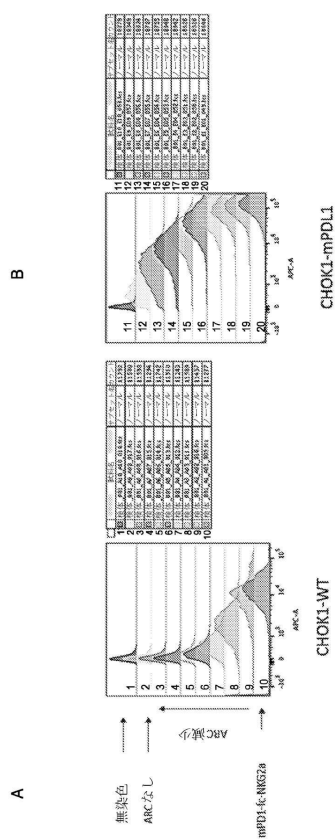


【図 5 4】

log[アゴニスト],ug/ml

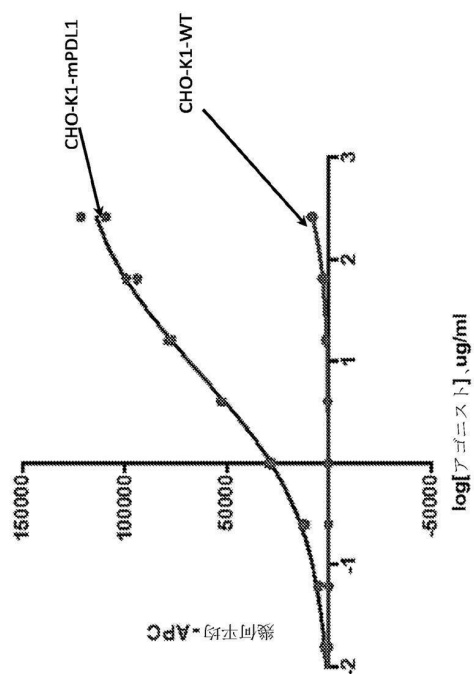


【図 5 5】

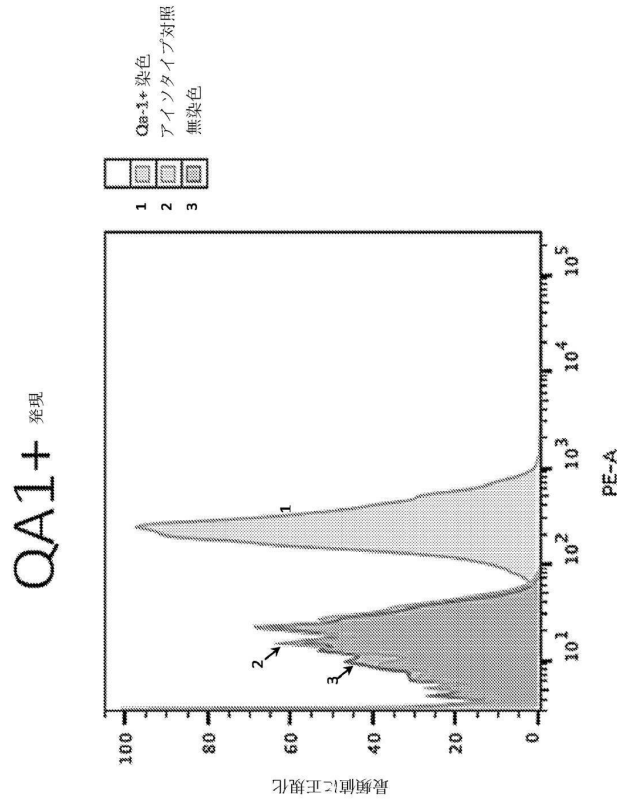


【図 5 6】

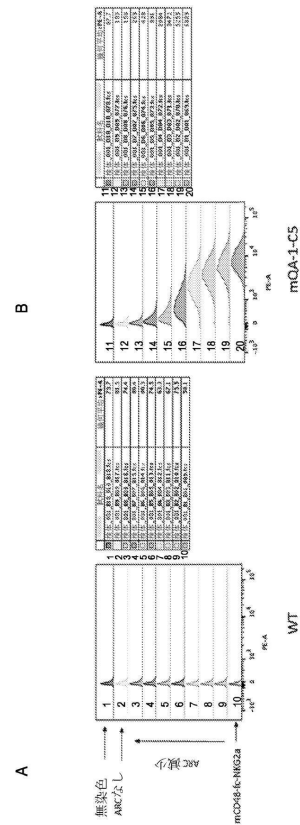
細胞結合アッセイ



【図 5 7】



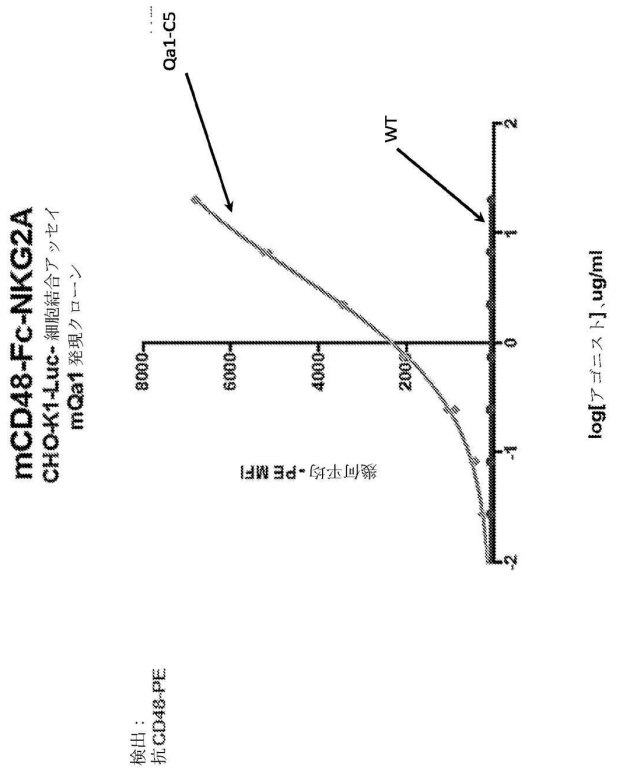
【図 5 8】



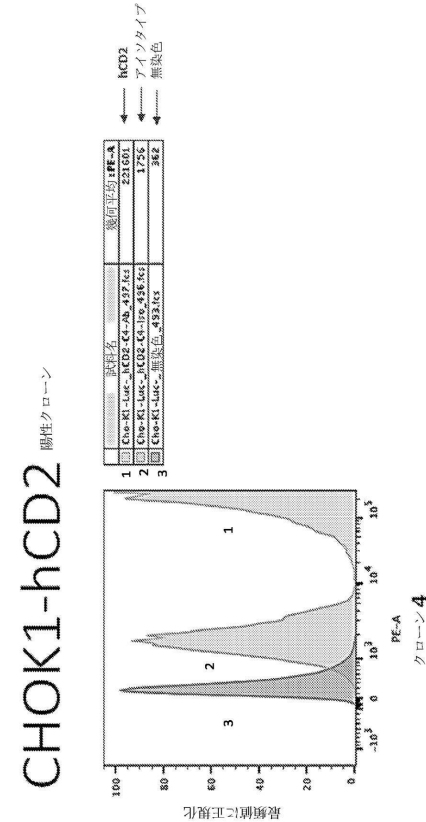
10

20

【図 5 9】



【図 6 0】



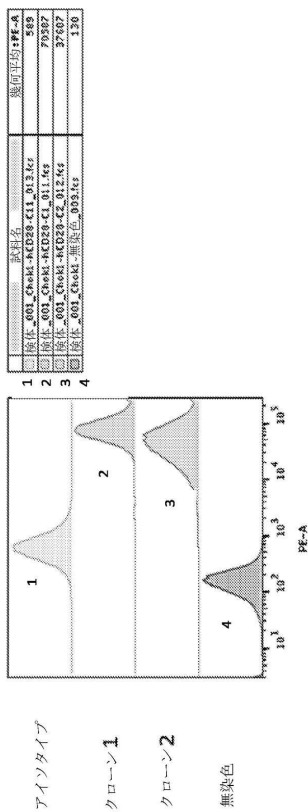
30

40

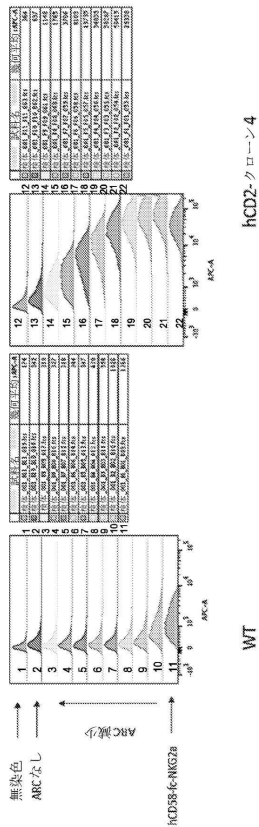
50

CHOK1 上での hCD28 の発現

【図 6 3】

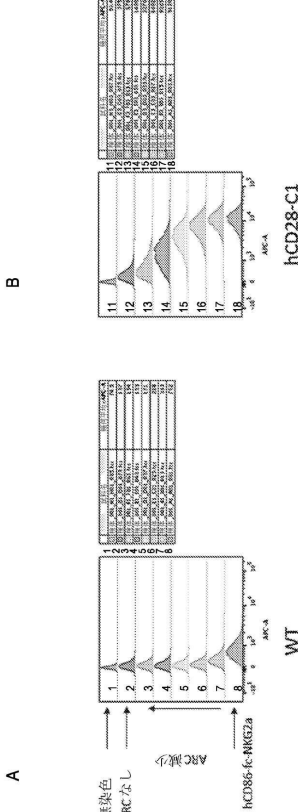


B



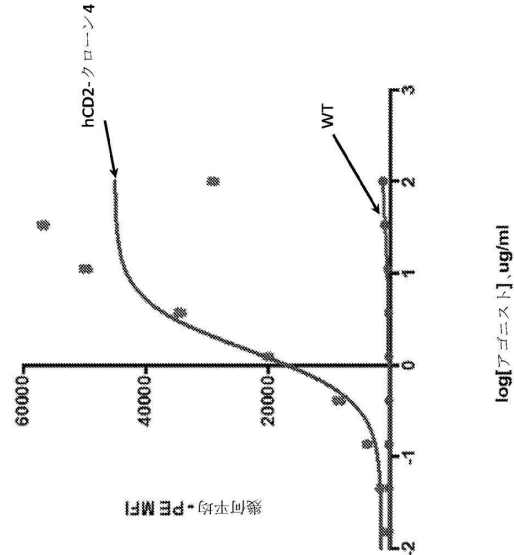
【図 6 1】

【図 6 4】



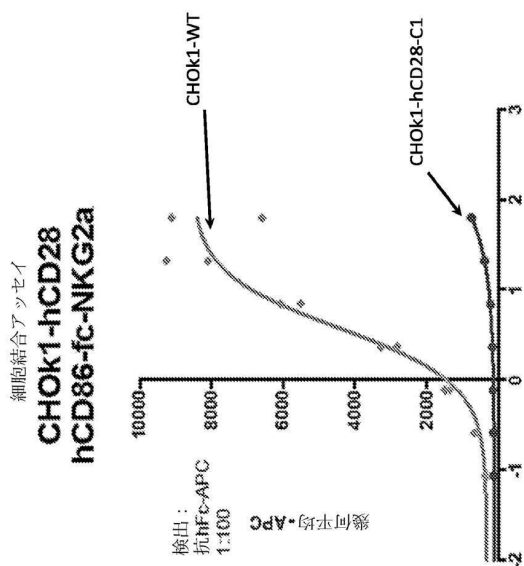
A

hCD58-fc-NGG2a を用いた
CHOK1 細胞結合アッセイ



【図 6 2】

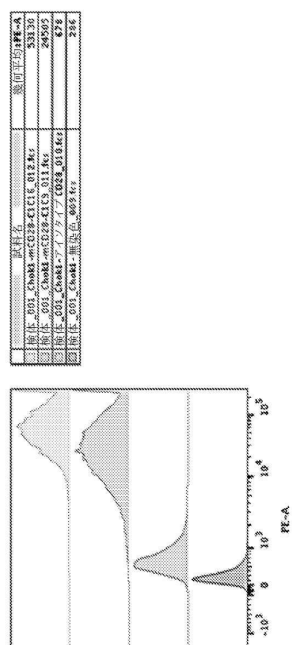
【図 6 5】



【圖 6 6】

log[アゴニスト], ug/ml

CHOK1 上での mCD28 の発現



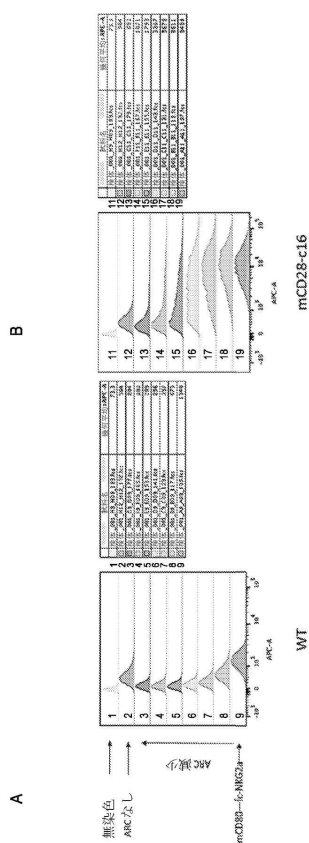
クロールン 16

クロン・9

アイソタイプ

無染色

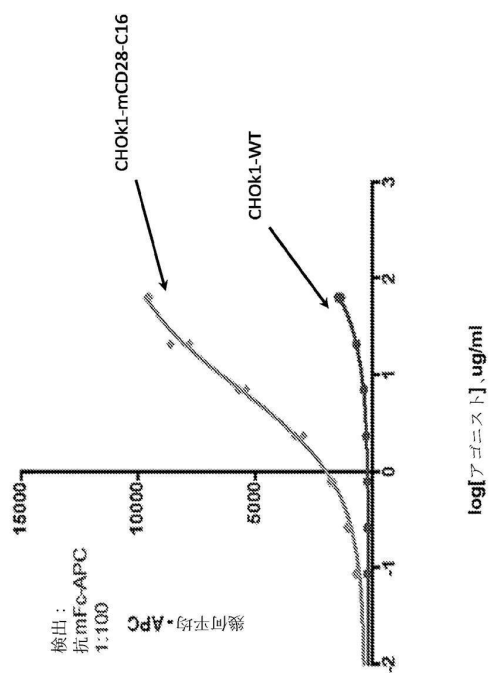
【図 67】



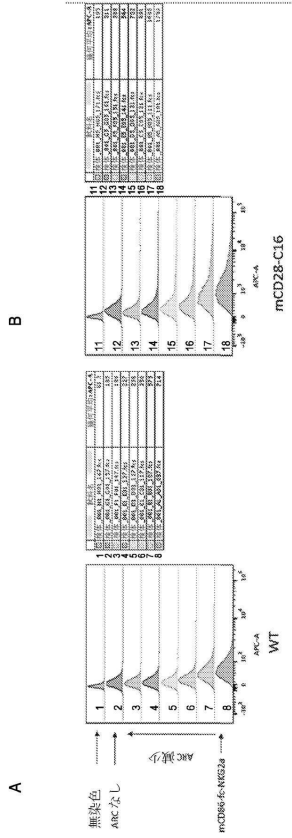
【圖 68】

細胞結合アッセイ

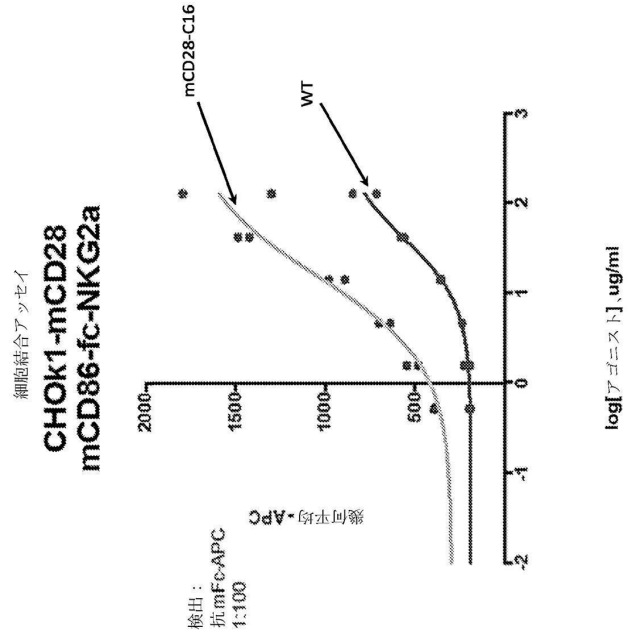
CHOK1-mCD28
mCD80-fc-NKG2a



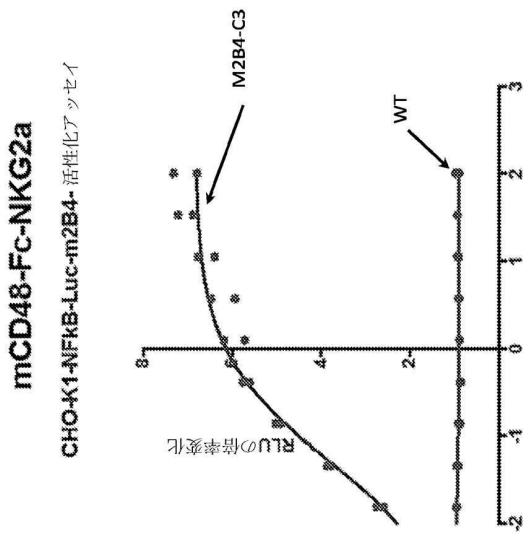
【図 6 9】



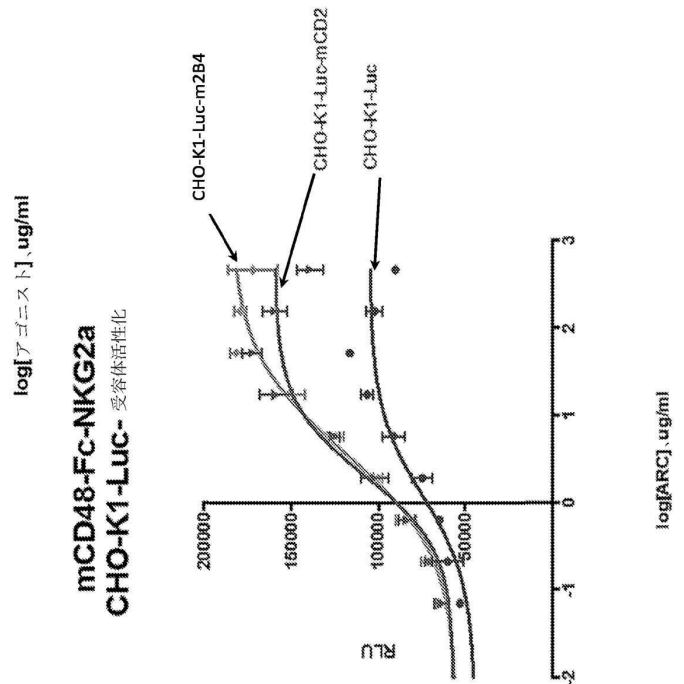
【図 7 0】



【図 7 1】



【図 7 2】



10

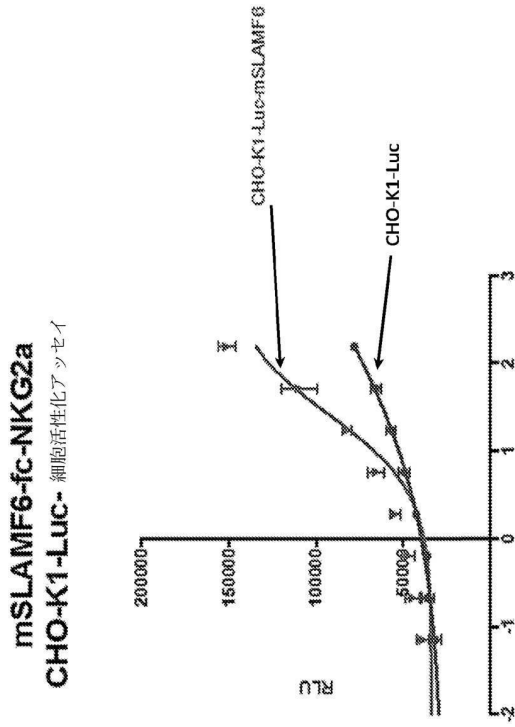
20

30

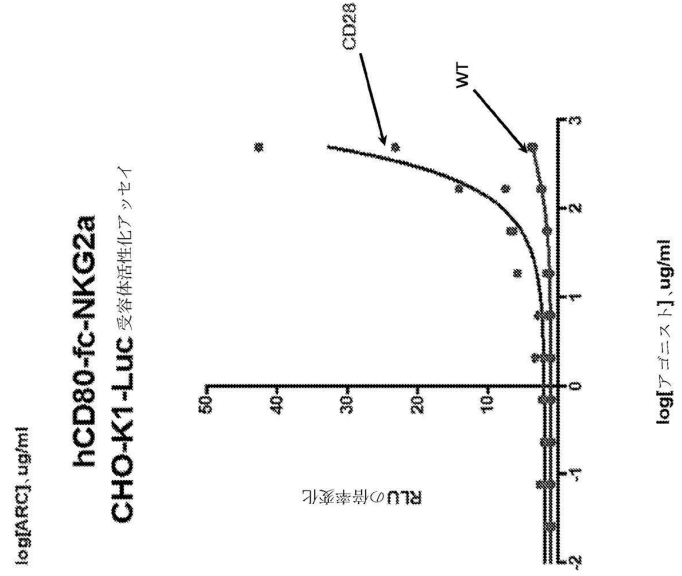
40

50

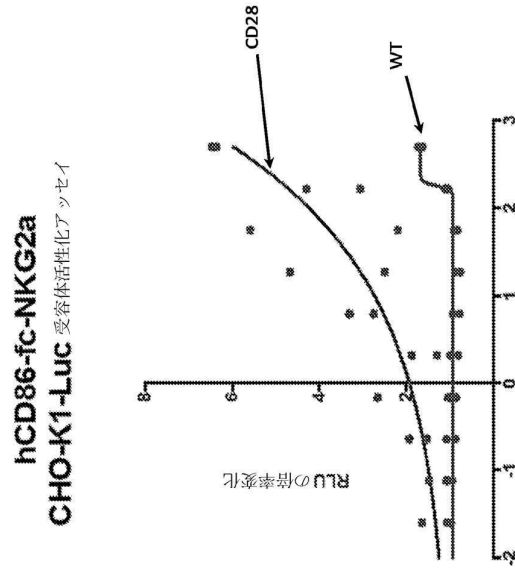
【図 7 3】



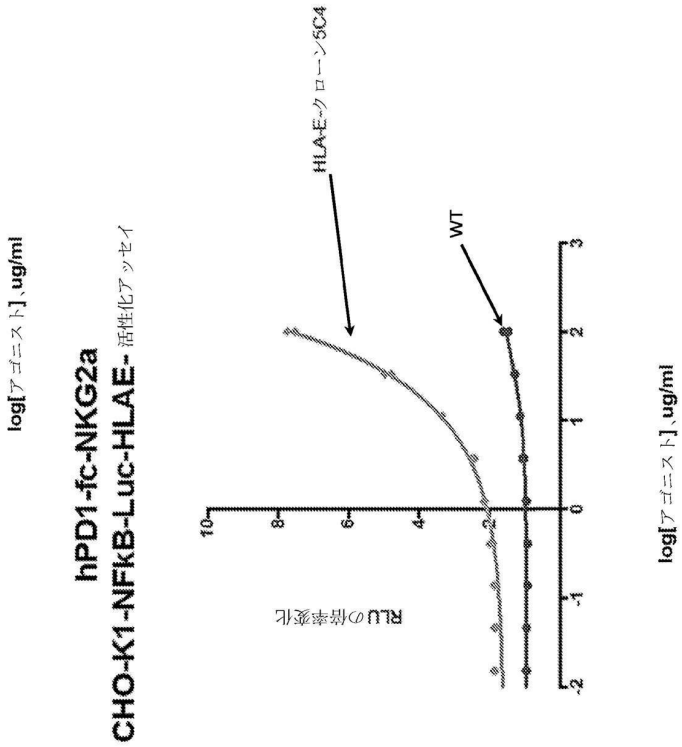
【図 7 4】



【図 7 5】



【図 7 6】



10

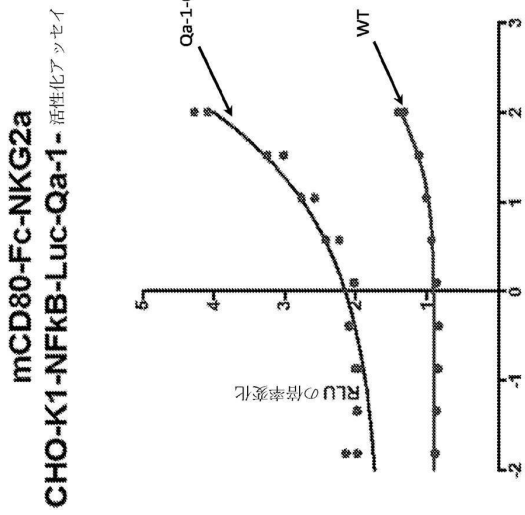
20

30

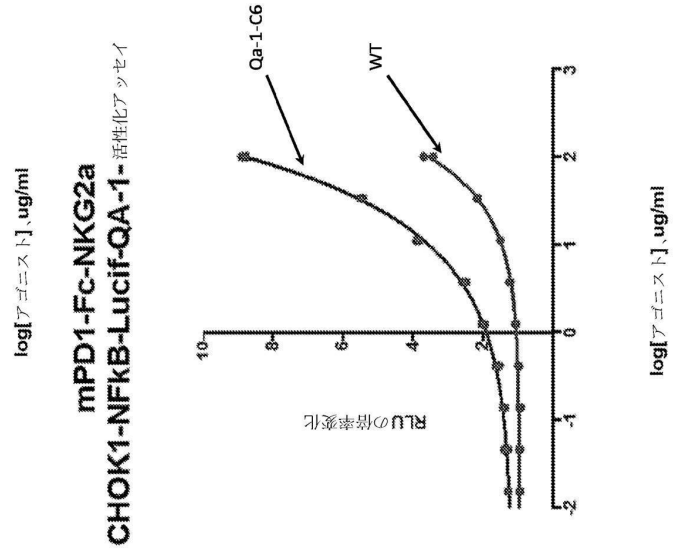
40

50

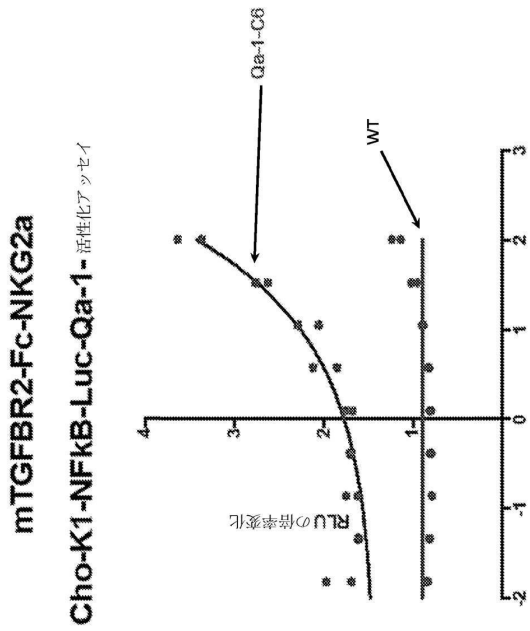
【図 7 7】



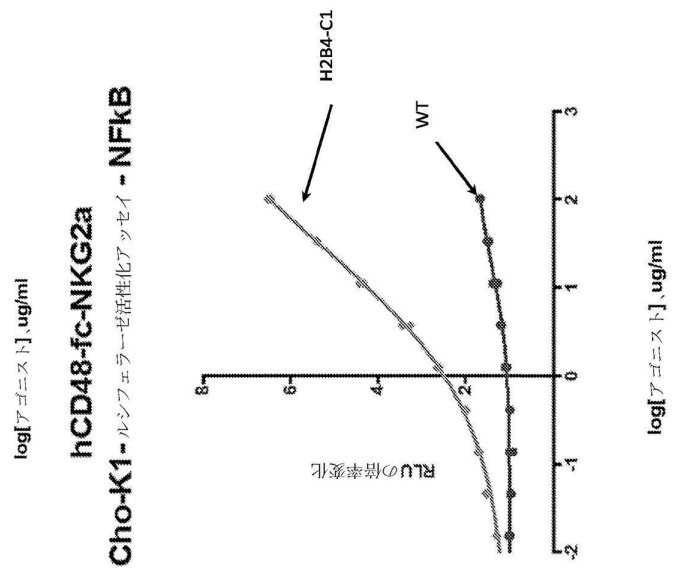
【図 7 8】



【図 7 9】



【図 8 0】



10

20

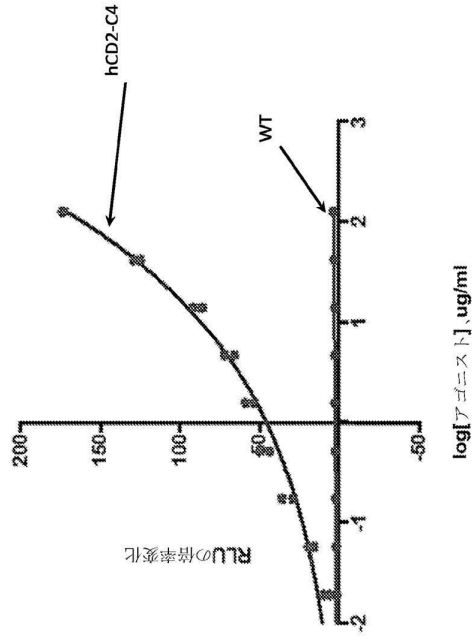
30

40

50

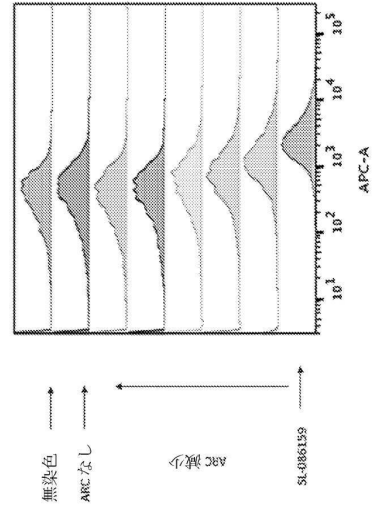
【図 8 1】

hCD58-fc-NKG2a
Chok1-NFkB
ルシフェラーゼ活性



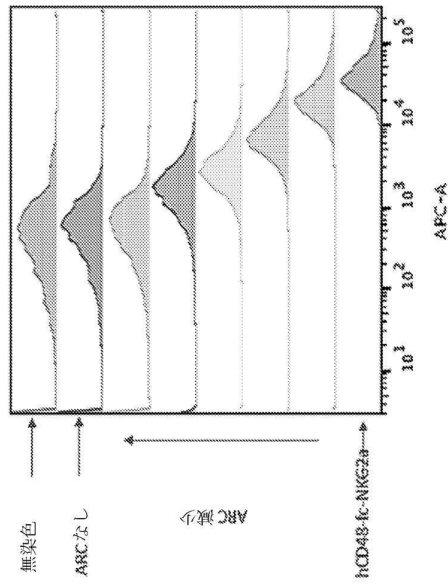
【図 8 2】

NK92-CD16V – hCD86-fc-NKG2a – 細胞結合アッセイ



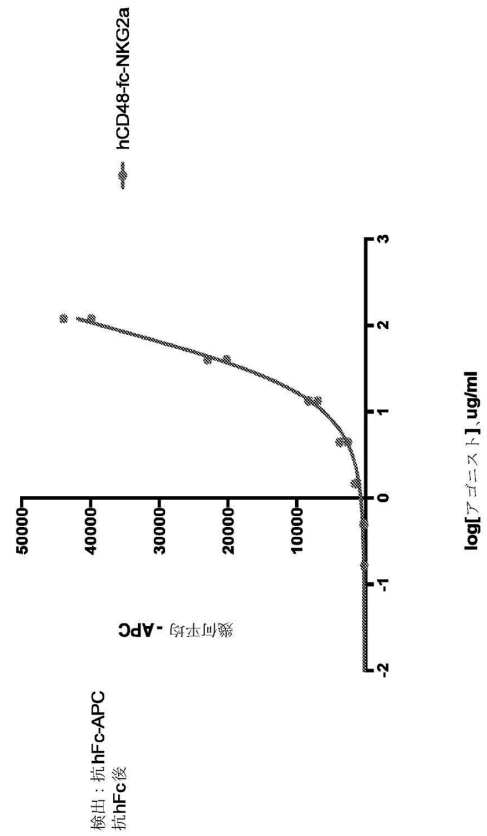
【図 8 3 A】

NK92-hCD48-fc-NKG2a
細胞結合アッセイ



【図 8 3 B】

NK92-CD16V- 細胞結合アッセイ
hCD48-fc-NKG2a



10

20

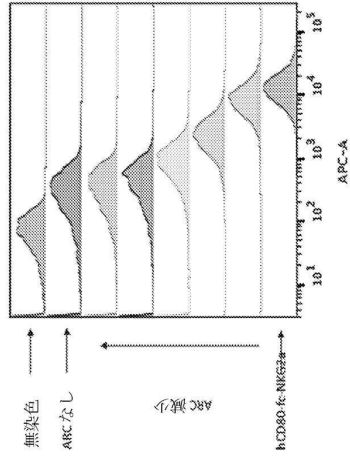
30

40

50

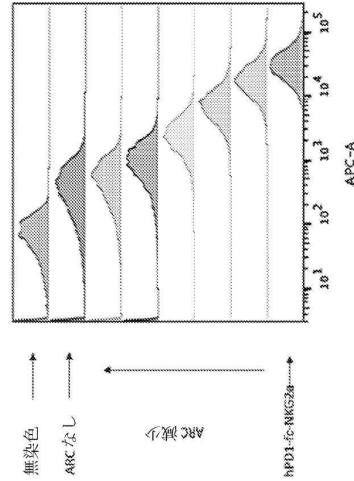
【図 8 4】

NK92-CD16V – hCD80-fc-NKG2a 細胞結合アッセイ



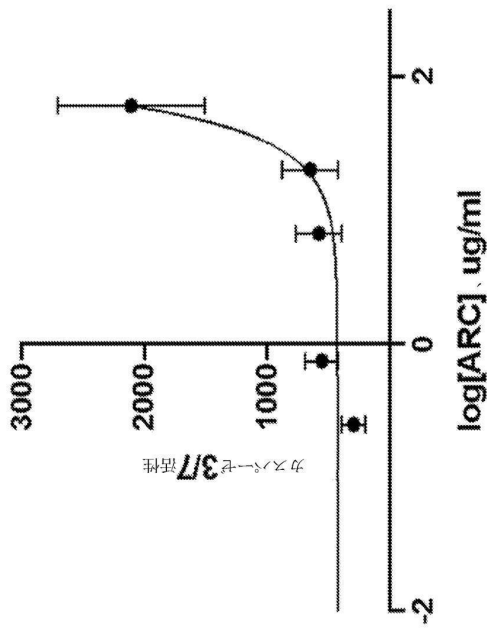
【図 8 5】

NK92-CD16V – hPD1-fc-NKG2a 細胞結合アッセイ



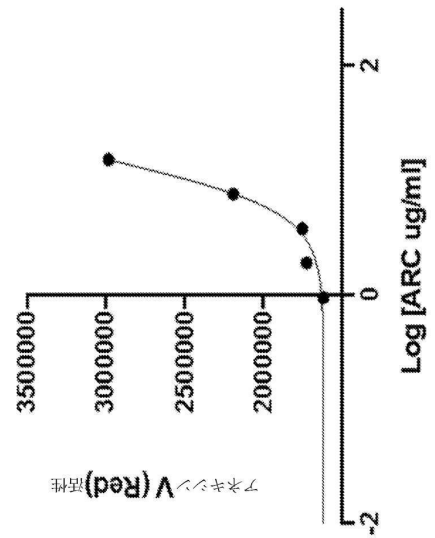
【図 8 6】

EO771-OVA- カスパーゼ 3/7 活性化アッセイ
mCD86-fc-NKG2a



【図 8 7】

NK92-CD16V + セツキシマブ (1ug/ml)
アネキシン V 死滅アッセイ
hCD86-fc-NKG2a



10

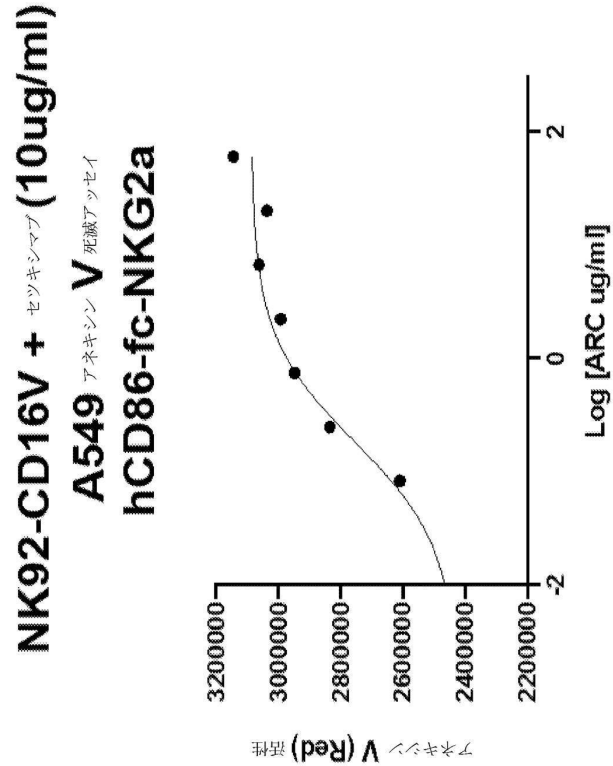
20

30

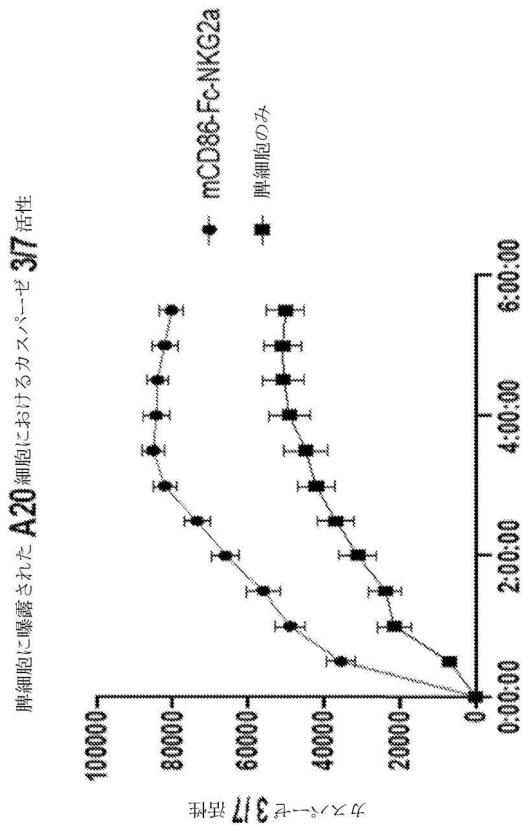
40

50

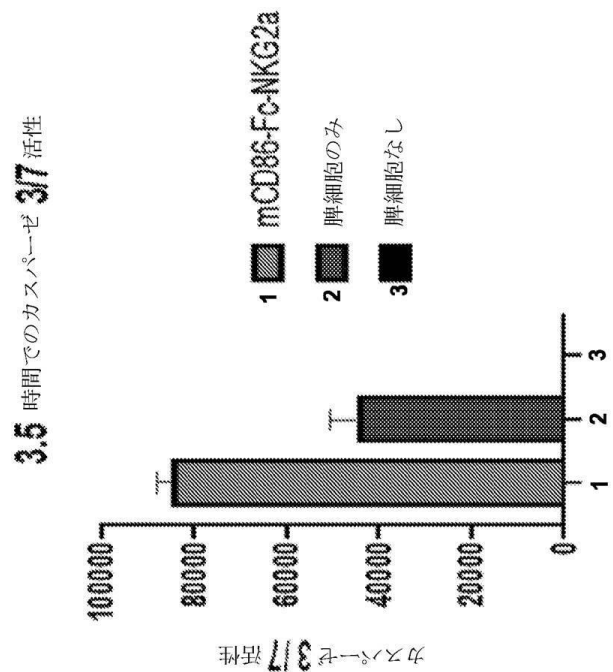
【図 8 8】



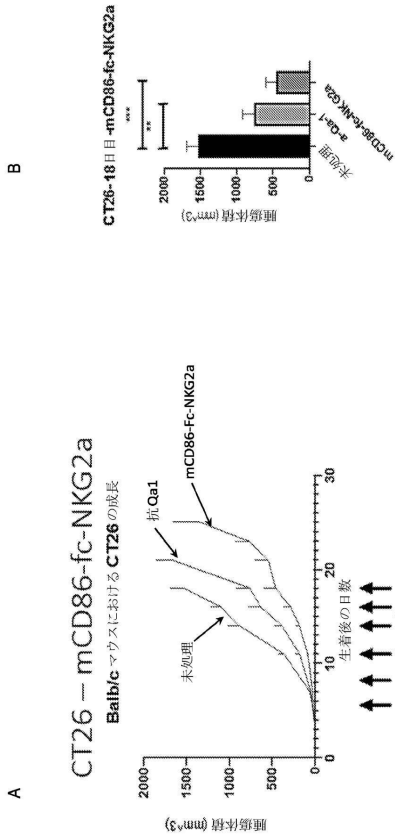
【図 8 9 A】



【図 8 9 B】



【図 9 0】



10

20

30

40

50

10

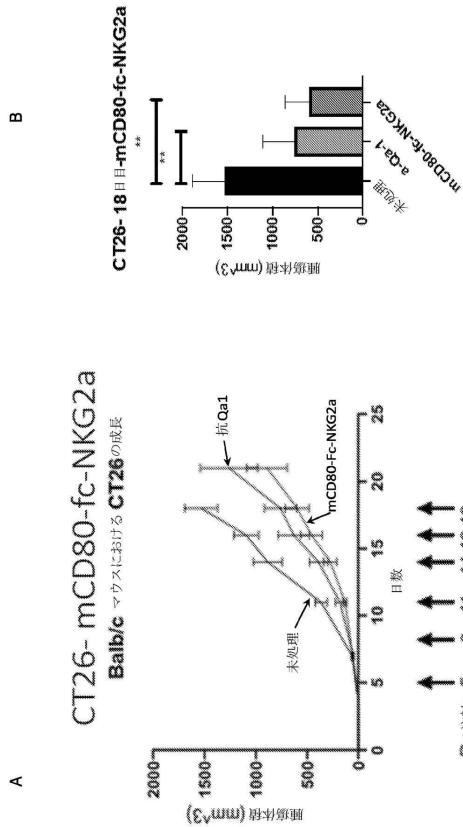
20

30

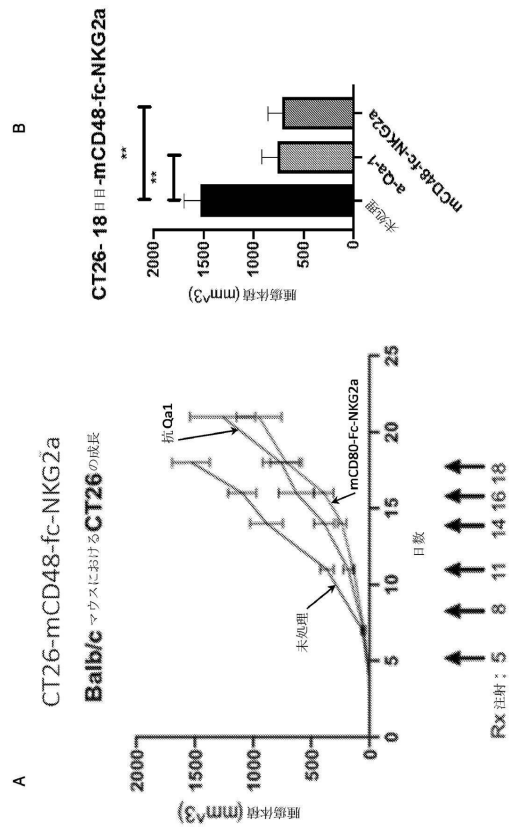
40

50

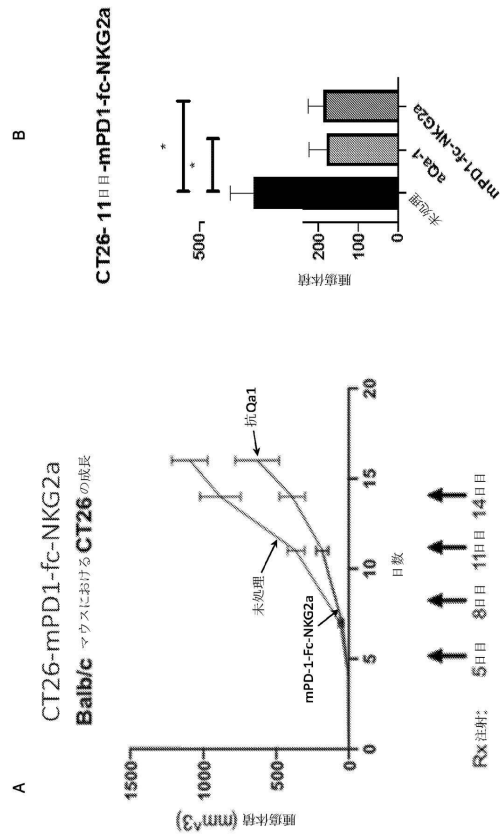
【図 9 1】



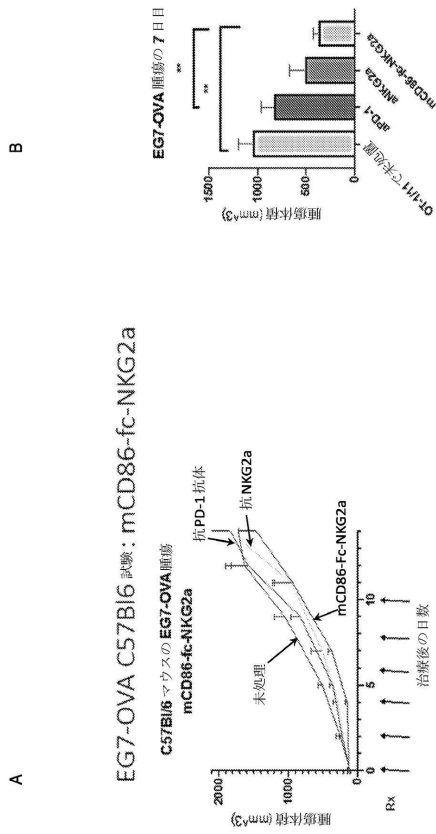
【図 9 2】



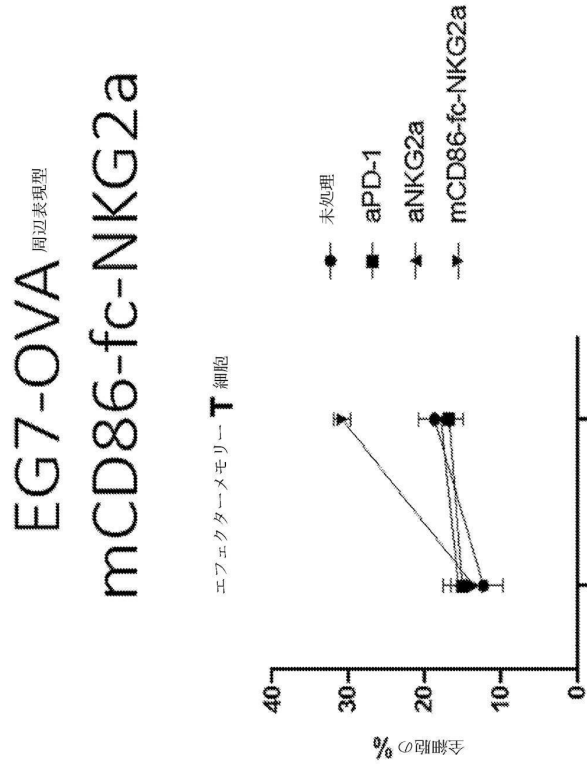
【図 9 3】



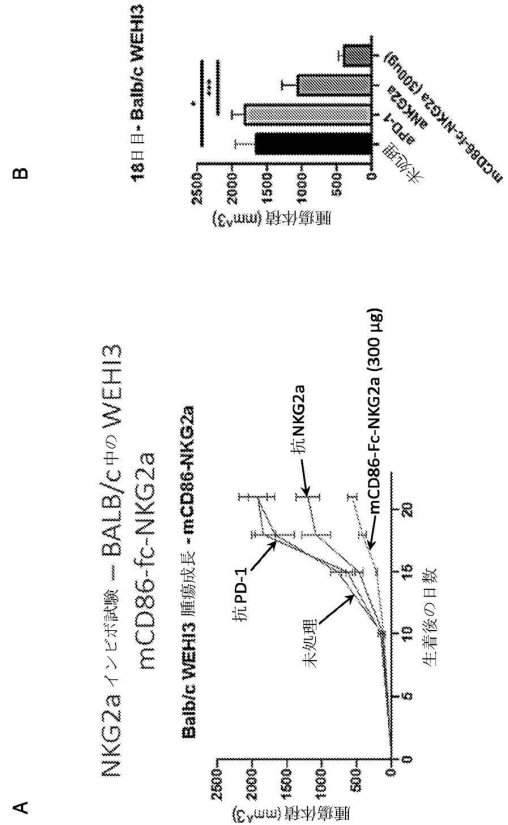
【図 9 4】



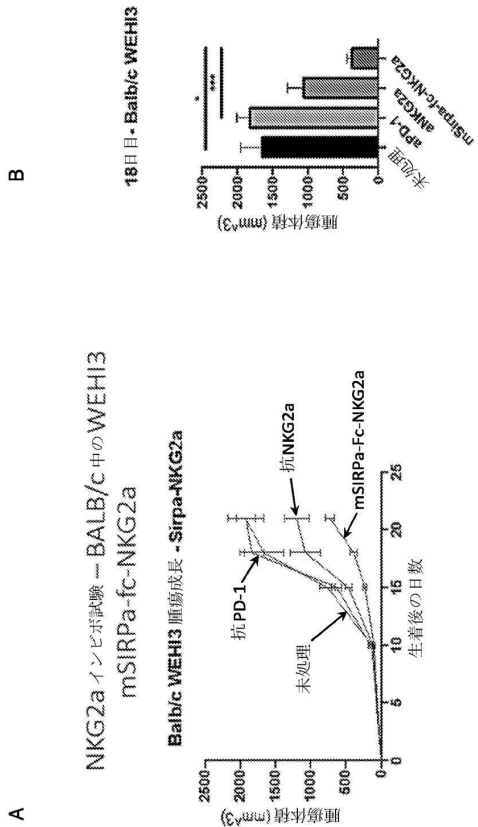
【図 9 5】



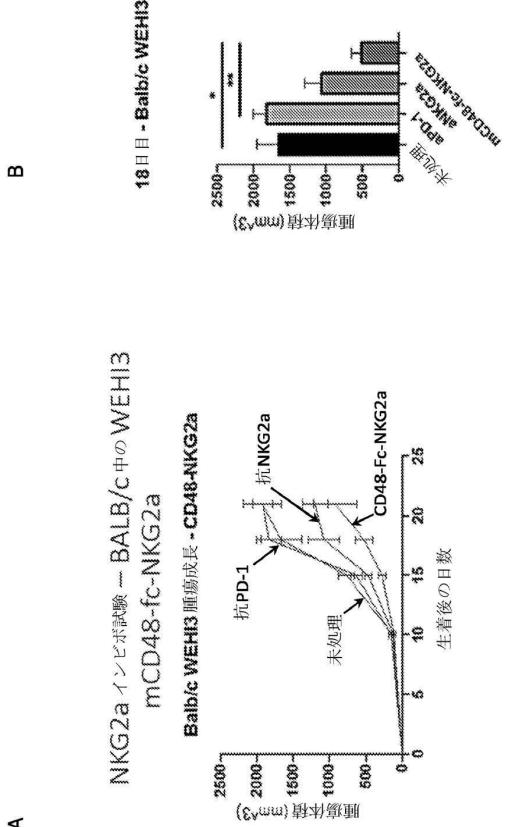
【図 9 6】



【図 9 7】



【図 9 8】



10

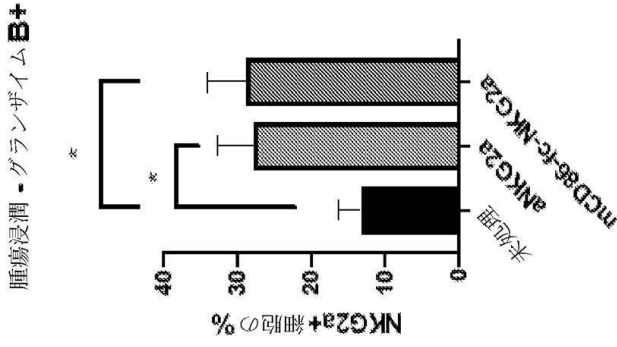
20

30

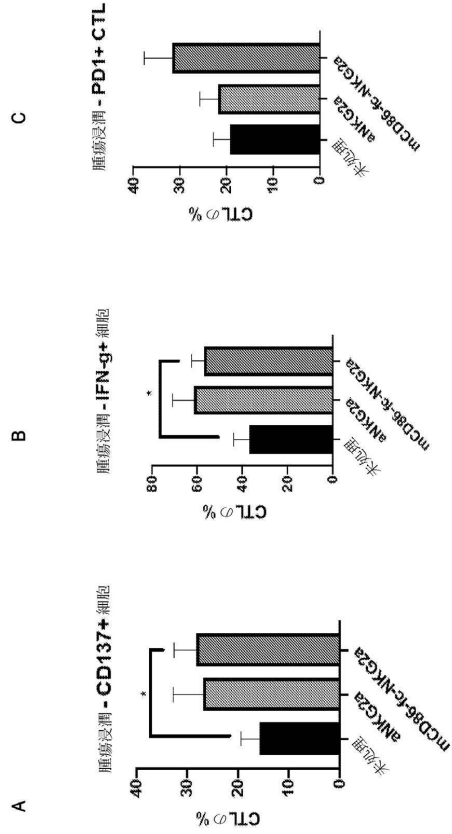
40

50

【図 103】



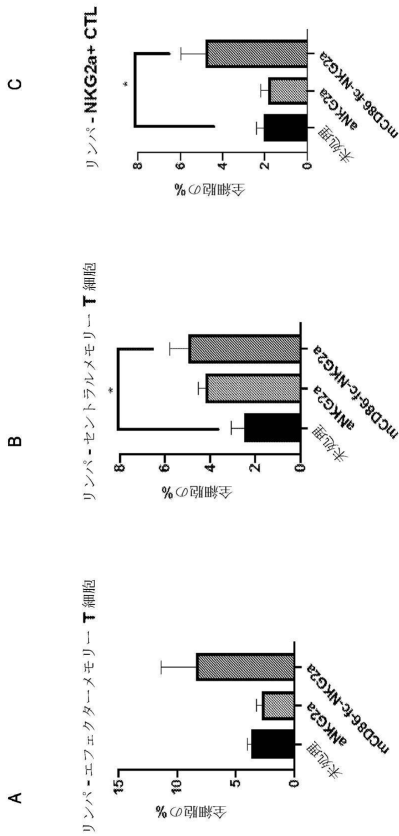
【図 104】



10

20

【図 105】



30

40

50

【配列表】

2022532430000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/033169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 47/68; C07K 14/705 (2020.01)

CPC - C07K 14/70503; C07K 14/70528; C07K 14/70532; C07K 14/70596; C07K 2319/30; C07K 2319/32 (2020.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

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

see Search History document

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

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/0326008 A1 (HEAT BIOLOGICS, INC.) 15 November 2018 (15.11.2018) entire document	1-5, 7, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64-67
Y		6
Y	US 2009/0281035 A1 (SPEE et al) 12 November 2009 (12.11.2009) entire document	6
A	EISENBERG et al. "Soluble SLAMF6 Receptor Induces Strong CD8+ T-cell Effector Function and Improves Anti-Melanoma Activity in Vivo," Cancer Immunology Research, 28 February 2018 (28.02.2018), Vol. 6, Iss. 2, Pgs. 127-138. entire document	1-7, 48-67
A	US 2018/0134766 A1 (EPICENTRX, INC.) 17 May 2018 (17.05.2018) entire document	1-7, 48-67
A	US 2017/0008951 A1 (GLIKNIK INC.) 12 January 2017 (12.01.2017) entire document	1-7, 48-67
A	PADUA et al. "Roles of TGFβ in metastasis," Cell Research, 02 December 2008 (02.12.2008), Vol. 19, Pgs. 89-102. entire document	1-7, 48-67

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2020

Date of mailing of the international search report

24 AUG 2020

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
Blaine R. Copenheaver
Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/033169

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-47, 68-93
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	11/04	(2006.01)	A 6 1 P	11/04	
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	V
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	47/55	(2017.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/55	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K	47/65	
			A 6 1 K	47/68	
			A 6 1 K	47/64	
			C 0 7 K	16/28	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ト 1 0 1 8 シャタック ラボ, インコーポレイテッド内

(72)発明者 フロム、ジョージ

アメリカ合衆国 7 8 7 0 3 テキサス オースティン、ウェスト 1 1 ストリート 1 0 1 8 シャ
タック ラボ, インコーポレイテッド内

(72)発明者 デ シルヴァ、スレシュ

アメリカ合衆国 7 8 7 0 3 テキサス オースティン、ウェスト 1 1 ストリート 1 0 1 8 シャ
タック ラボ, インコーポレイテッド内

F ターム (参考)	4C076	CC01 CC07 CC09 CC10 CC11 CC15 CC16 CC17 CC18 CC26 CC27 CC35 EE41 EE59 FF34
	4C084	AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 DC50 MA02 NA05 NA14 ZA021 ZA331 ZA341 ZA361 ZA591 ZA661 ZA671 ZA751 ZA811 ZA831 ZA891 ZA941 ZA961 ZB081 ZB091 ZB211 ZB261 ZB271 ZB331 ZC541 ZC551 ZC751
	4C085	AA13 AA14 AA33 BB33 BB34 BB35 BB36 BB42 CC23 EE03
	4H045	AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76 EA22 EA28 FA74