(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-541742
(P2022-541742A)
(43)公表日　令和4年9月27日(2022.9.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	ＺＺＮＡ	４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｐ	*21/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全139頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-501004(P2022-501004)
(86)(22)出願日　令和2年7月8日(2020.7.8)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月4日(2022.3.4)
(86)国際出願番号　PCT/IL2020/050762
(87)国際公開番号　WO2021/005599
(87)国際公開日　令和3年1月14日(2021.1.14)
(31)優先権主張番号　62/872,741
(32)優先日　令和1年7月11日(2019.7.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517307924
カール メディカル リミテッド
イスラエル国 エルサレム ピー．オー．ボックス ９７７９ キルヤット ハダサー １ ジェービーピー ビルディング
１ ｋｉｒｙａｔ Ｈａｄａｓｓａｈ，ＪＢＰ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ， Ｐ．Ｏ．Ｂｏｘ ９７７９ Ｊｅｒｕｓａｌｅｍ，Ｉｓｒａｅｌ
(71)出願人　516241599
トーマス・ジェファーソン・ユニバーシティ
アメリカ合衆国 １９１０７ ペンシルベニア州 フィラデルフィア チェストナット ストリート ９２５ スイート １１０
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ヘテロダイマーおよびその使用方法

(57)【要約】
ヘテロダイマーが提供される。従って、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列と、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列とに結合したダイマー化部分を含む、ヘテロダイマーが提供される。さらにヘテロダイマーをコードする核酸構築物およびシステム、それを発現する宿主細胞、およびそれらの使用も提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な、前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列と、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な、前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列と、に結合したダイマー化部分を含む、ヘテロダイマー。
【請求項２】
前記ダイマー化部分がタンパク性部分である、請求項１に記載のヘテロダイマー。
【請求項３】
前記ヘテロダイマー中のモノマーが共有結合されていない、請求項１または２に記載のヘテロダイマー。
【請求項４】
前記ダイマー化部分が、抗体またはその断片のＦｃドメインである、請求項１～３のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項５】
前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質が、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＬＡＧ３、ＢＴＮ３Ａ１、ＣＤ２７、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＥＮＧ、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＣＤ８４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ４０、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１６４、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ４、ＢＴＬＡ、ＬＩＬＲＢ１、ＬＩＬＲＢ２、ＴＹＲＯＢＰ、ＩＣＯＳ、ＶＥＧＦＡ、ＣＳＦ１、ＣＳＦ１Ｒ、ＶＥＧＦＢ、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、ＧＤＮＦ、ＰＤＧＦＣ、ＰＤＧＦＤ、ＲＡＥＴ１Ｅ、ＣＤ１５５、ＣＤ１６６、ＭＩＣＡ、ＮＲＧ１、ＨＶＥＭ、ＤＲ３、ＴＥＫ、ＴＧＦＢ１、ＬＹ９６、ＣＤ９６、ＫＩＴ、ＣＤ２４４、ＧＦＥＲおよびＳＩＧＬＥＣからなる群より選ばれる、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項６】
前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質が、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＴＩＧＩＴ、ＬＩＬＲＢ２およびＳＩＧＬＥＣからなる群より選ばれる、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項７】
前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質が、ＰＤ１およびＳＩＲＰαからなる群より選ばれる、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項８】
前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質が、４－１ＢＢＬ、ＦａｓＬ、ＴＲＡＩＬ、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ２７Ｌ、ＣＤ３０Ｌ、ＲＡＮＫＬ、ＴＷＥＡＫ、ＡＰＲＩＬ、ＢＡＦＦ、ＬＩＧＨＴ、ＶＥＧＩ、ＧＩＴＲＬ、ＥＤＡｌ／２、リンホトキシン・アルファおよびリンホトキシン・ベータからなる群より選ばれる、請求項１～７のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項９】
前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質が、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＬＩＧＨＴおよびＧＩＴＲＬからなる群より選ばれる、請求項１～７のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１０】
前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質が、４－１ＢＢＬおよびＣＤ４０Ｌからなる群より選ばれる、請求項１～７のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１１】
前記Ｉ型膜タンパク質および前記ＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種が免疫調節因子である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１２】
前記ヘテロダイマーが、前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列および前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種の

アミノ酸配列を含む第１のモノマーを含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１３】
前記ヘテロダイマーが、前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列を含む第１のモノマー、および前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１４】
前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が、前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、且つ前記ヘテロダイマーが、前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１５】
前記第１のモノマーの前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の前記少なくとも１種と、前記第２のモノマーの前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の前記少なくとも１種が同一である、請求項１４に記載のヘテロダイマー。
【請求項１６】
前記第１のモノマーの前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の前記少なくとも１種と、前記第２のモノマーの前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の前記少なくとも１種が異なる、請求項１４に記載のヘテロダイマー。
【請求項１７】
前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、且つ前記ヘテロダイマーが、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列および前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第１のモノマー、および前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１８】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が前記Ｉ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記Ｉ型膜タンパク質がＰＤ１であり、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＰＤ１の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と前記４－１ＢＢＬの前記少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＰＤ１の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項１９】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が前記Ｉ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記Ｉ型膜タンパク質がＬＩＬＲＢ２であり、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＬＩＬＲＢ２の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と前記４－１ＢＢＬの前記少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＬＩＬＲＢ２の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項２０】

前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が前記Ｉ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記Ｉ型膜タンパク質がＬＩＬＲＢ２であり、前記ＩＩ型膜タンパク質がＣＤ４０Ｌであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＬＩＬＲＢ２の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と前記ＣＤ４０Ｌの前記少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＬＩＬＲＢ２の前記少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項２１】

前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＰＤ１およびＳＩＲＰαを含み、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＳＩＲＰαの前記アミノ酸配列と前記４－１ＢＢＬの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項２２】

前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＰＤ１およびＳＩＲＰαを含み、前記ＩＩ型膜タンパク質がＣＤ４０Ｌであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＳＩＲＰαの前記アミノ酸配列と前記ＣＤ４０Ｌの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項２３】

前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＬＩＬＲＢ２およびＳＩＲＰαを含み、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＳＩＲＰαの前記アミノ酸配列と前記４－１ＢＢＬの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＬＩＬＲＢ２の前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項２４】

前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＬＩＬＲＢ２およびＳＩＲＰαを含み、前記ＩＩ型膜タンパク質がＣＤ４０Ｌであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＳＩＲＰαの前記アミノ酸配列と前記ＣＤ４０Ｌの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＬＩＬＲＢ２前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項２５】

前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＬＩＬＲＢ２およびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列と前記４－１ＢＢＬの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＬＩＬＲＢ２の前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項２６】

前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＬＩＬＲＢ２およびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質がＣＤ４０Ｌであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列と前記ＣＤ４０Ｌの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＬＩＬＲＢ２の前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項２７】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＳＩＧＬＥＣおよびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列と前記４－１ＢＢＬの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＳＩＧＬＥＣの前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項２８】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＳＩＧＬＥＣおよびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質がＣＤ４０Ｌであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列と前記ＣＤ４０Ｌの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＳＩＧＬＥＣの前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項２９】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列と前記４－１ＢＢＬの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＴＩＧＩＴの前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項３０】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質がＣＤ４０Ｌであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列と前記ＣＤ４０Ｌの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＴＩＧＩＴの前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項３１】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質が４－１ＢＢＬであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＴＩＧＩＴの前記アミノ酸配列と前記４－１ＢＢＬの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項３２】
前記Ｉ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、前記少なくとも２種のＩ型膜タンパク質がＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、前記ＩＩ型膜タンパク質がＣＤ４０Ｌであり、且つ前記ヘテロダイマーが、前記ＴＩＧＩＴの前記アミノ酸配列と前記ＣＤ４０Ｌの前記アミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および前記ＰＤ１の前記アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項３３】
前記ＳＩＧＬＥＣがＳＩＧＬＥＣ１０である、請求項５、６、２７および２８のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。
【請求項３４】
前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が前記タンパク性ダイマー化部分のＮ末端に結合しており、且つ前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列が前記タンパク性ダイマー化部分のＣ末端に結合している、請求項２～３３のいずれか一項に記載のヘテロダイマー。

【請求項３５】
請求項２～３４に記載のヘテロダイマーをコードする少なくとも１種のポリヌクレオチドと、宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドの発現を指示する制御因子とを含む、核酸構築物またはシステム。
【請求項３６】
請求項２～３４に記載のヘテロダイマーまたは請求項３５に記載の核酸構築物またはシステムを含む、宿主細胞。
【請求項３７】
ヘテロダイマーの製造方法であって、請求項１～３４に記載のヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステムを宿主細胞内で発現させることを含む、方法。
【請求項３８】
前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列および前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の前記少なくとも１種のアミノ酸配列に前記ダイマー化部分を追加することを含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ヘテロダイマーを単離することを含む、請求項３７または３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記ヘテロダイマーによる治療が有効に作用し得る疾患の治療における、請求項１～３４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、またはそれを含む細胞の使用。
【請求項４１】
免疫細胞の調節が有効に作用し得る疾患の治療における、請求項１１～３４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、またはそれを含む宿主細胞の使用。
【請求項４２】
前記疾患の細胞が前記Ｉ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する、請求項４０または４１に記載の使用に用いるための組成物。
【請求項４３】
前記疾患の細胞が前記ＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する、請求項４０～４２のいずれか一項に記載の使用に用いるための組成物。
【請求項４４】
前記疾患が癌である、請求項４０～４３のいずれか一項に記載の使用に用いるための組成物。
【請求項４５】
前記癌がリンパ腫、白血病、および癌腫からなる群より選ばれる、請求項４４に記載の使用に用いるための組成物。
【請求項４６】
免疫細胞の活性を調節するための方法であって、請求項１１～３４のいずれか一項に記載のヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、またはそれを含む宿主細胞の存在下、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで免疫細胞を活性化することを含む、方法。
【請求項４７】
前記活性が、前記Ｉ型膜タンパク質または前記ＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する細胞、あるいは前記Ｉ型膜タンパク質または前記ＩＩ型膜タンパク質の外因性リガンドまたは受容体の存在下で行われる、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記調節が活性化である、請求項４６または４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記調節が阻害である、請求項４６または４７に記載の方法。
【請求項５０】
前記免疫細胞がＴ細胞を含む、請求項４１～４９のいずれか一項に記載の方法または使

用のための組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０１９年７月１１日に出願した米国特許出願第６２／８７２，７４１号の優先権を主張するものであり、その内容の全てが本参照をもって本願に組み込まれるものとする。
【０００２】
配列表に関する陳述
２０２０年７月７日に作製し、３４７，２９３バイトからなる、82913 SequenceListing.txtと命名したＡＳＣＩＩファイルは本願と同時に提出され、その内容の全てが本参照をもって本願に組み込まれるものとする。
【背景技術】
【０００３】
本発明は、そのいくつかの実施形態において、ヘテロダイマーおよびその使用方法に関する。
【０００４】
二重シグナル伝達タンパク質（ＤＳＰ）は、シグナル変換タンパク質（ＳＣＰ）としても公知である、Ｉ型膜タンパク質の細胞外部分（細胞外アミノ末端）をＩＩ型膜タンパク質の細胞外部分（細胞外カルボキシル末端）に結合させた、２つの活性面を有する融合タンパク質（ポリペプチド鎖）を形成する二機能性融合タンパク質である（例えば、米国特許第７，５６９，６６３号および同第８，０３９，４３７号を参照）。このようなＤＳＰのいくつかは当業界で既に開示されており、例えば、ＰＤ１－４－１ＢＢＬおよびＳＩＲＰα－４－１ＢＢＬが含まれる（例えば、国際公開第２０１８／１２７９１９号公報および第２０１８／１２７９１７号公報を参照）。本来の対応するリガンドまたは受容体に結合することで、ＤＳＰは、その組成に応じて、例えば、細胞のシグナル伝達経路、成長、生存および活性に影響する標的化および／または機能的性質を有し得る。よって、例えばＤＳＰの１つのアームが腫瘍部位または腫瘍の微小環境を選択的に標的化するために働き、他のアームが免疫調節因子として働くように設計することができる。このようなＤＳＰの独自の組成は、ＰＤ１－４－１ＢＢＬおよびＳＩＲＰα－４－１ＢＢＬのように、腫瘍部位における獲得免疫の標的化活性化を促進することができる。このプラットフォーム技術は、大部分のチェックポイント標的に適応可能であり、好ましい危険度と受益度との割合を維持しながら、潜在的に効率を高める。
【発明の概要】
【０００５】
本発明のいくつかの実施形態の一態様において、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列と、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列とに結合したダイマー化部分を含む、ヘテロダイマーが提供される。
【０００６】
本発明のいくつかの実施形態によると、ダイマー化部分はタンパク性部分である。
【０００７】
本発明のいくつかの実施形態によると、ヘテロダイマー中のモノマーは共有結合されていない。
【０００８】
本発明のいくつかの実施形態によると、ダイマー化部分は、抗体またはその断片のＦｃドメインである。

【０００９】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質は、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＬＡＧ３、ＢＴＮ３Ａ１、ＣＤ２７、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＥＮＧ、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＣＤ８４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ４０、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１６４、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ４、ＢＴＬＡ、ＬＩＬＲＢ１、ＬＩＬＲＢ２、ＴＹＲＯＢＰ、ＩＣＯＳ、ＶＥＧＦＡ、ＣＳＦ１、ＣＳＦ１Ｒ、ＶＥＧＦＢ、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、ＧＤＮＦ、ＰＤＧＦＣ、ＰＤＧＦＤ、ＲＡＥＴ１Ｅ、ＣＤ１５５、ＣＤ１６６、ＭＩＣＡ、ＮＲＧ１、ＨＶＥＭ、ＤＲ３、ＴＥＫ、ＴＧＦＢ１、ＬＹ９６、ＣＤ９６、ＫＩＴ、ＣＤ２４４、ＧＦＥＲおよびＳＩＧＬＥＣからなる群より選ばれる。

【００１０】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質は、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＬＡＧ３、ＢＴＮ３Ａ１、ＣＤ２７、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＥＮＧ、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＣＤ８４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ４０、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１６４、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ４、ＢＴＬＡ、ＬＩＬＲＢ１、ＬＩＬＲＢ２、ＴＹＲＯＢＰ、ＩＣＯＳ、ＶＥＧＦＡ、ＣＳＦ１、ＣＳＦ１Ｒ、ＶＥＧＦＢ、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、ＧＤＮＦ、ＰＤＧＦＣ、ＰＤＧＦＤ、ＲＡＥＴ１Ｅ、ＣＤ１５５、ＣＤ１６６、ＭＩＣＡ、ＮＲＧ１、ＨＶＥＭ、ＤＲ３、ＴＥＫ、ＴＧＦＢ１、ＬＹ９６、ＣＤ９６、ＫＩＴ、ＣＤ２４４、およびＧＦＥＲからなる群より選ばれる。

【００１１】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質は、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＬＩＬＲＢ１／２、ＣＳＦ１、ＣＳＦ１ＲおよびＴＧＦＢ１からなる群より選ばれる。

【００１２】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質は、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＴＩＧＩＴ、ＬＩＬＲＢ２およびＳＩＧＬＥＣからなる群より選ばれる。

【００１３】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質は、ＰＤ１およびＳＩＲＰαからなる群より選ばれる。

【００１４】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質は、４－１ＢＢＬ、ＦａｓＬ、ＴＲＡＩＬ、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ２７Ｌ、ＣＤ３０Ｌ、ＲＡＮＫＬ、ＴＷＥＡＫ、ＡＰＲＩＬ、ＢＡＦＦ、ＬＩＧＨＴ、ＶＥＧＩ、ＧＩＴＲＬ、ＥＤＡｌ／２、リンホトキシン・アルファおよびリンホトキシン・ベータからなる群より選ばれる。

【００１５】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質は、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＬＩＧＨＴおよびＧＩＴＲＬからなる群より選ばれる。

【００１６】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質は、４－１ＢＢＬおよびＣＤ４０Ｌからなる群より選ばれる。

【００１７】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質は、４－１ＢＢＬである。

【００１８】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質およびＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種は免疫調節因子である。

【００１９】
本発明のいくつかの実施形態によると、ヘテロダイマーは、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列と、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少

なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマーを含む。
【００２０】
本発明のいくつかの実施形態によると、ヘテロダイマーは、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列を含む第１のモノマー、および少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００２１】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、且つヘテロダイマーは少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、および少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む。
【００２２】
本発明のいくつかの実施形態によると、第１のモノマーの少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種は、第２のモノマーのＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と同一である。
【００２３】
本発明のいくつかの実施形態によると、第１のモノマーの少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種は、第２のモノマーのＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と異なる。
【００２４】
本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、且つヘテロダイマーは、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列と、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種とを含む第１のモノマー、および少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む。
【００２５】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列はＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、Ｉ型膜タンパク質はＰＤ１であり、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＰＤ１の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と４－１ＢＢＬの少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む。
【００２６】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列はＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２であり、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＬＩＬＲＢ２の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種と４－１ＢＢＬの少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む。
【００２７】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列はＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２であり、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、且つヘテロダイマーは、ＬＩＬＲＢ２の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種とＣＤ４０Ｌの少なくとも１種のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２の少なくとも２種のアミノ酸配列の内の少なくとも１種を含む第２のモノマーを含む。

【００２８】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＰＤ１およびＳＩＲＰαを含み、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００２９】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＰＤ１およびＳＩＲＰαを含み、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、且つヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００３０】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＳＩＲＰαを含み、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００３１】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＳＩＲＰαを含み、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、且つヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００３２】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００３３】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、且つヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００３４】
本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＳＩＧＬＥＣおよびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＳＩＧＬＥＣのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【００３５】

本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＳＩＧＬＥＣおよびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、且つヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＳＩＧＬＥＣのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【００３６】

本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＴＩＧＩＴのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【００３７】

本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、且つヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＴＩＧＩＴのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【００３８】

本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、且つヘテロダイマーは、ＴＩＧＩＴのアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【００３９】

本発明のいくつかの実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質の少なくとも２種のアミノ酸配列を含み、少なくとも２種のＩ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴおよびＰＤ１を含み、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、且つヘテロダイマーは、ＴＩＧＩＴのアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【００４０】

本発明のいくつかの実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣはＳＩＧＬＥＣ１０である。

【００４１】

本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列はタンパク性ダイマー化部分のＮ末端に結合しており、且つ少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列はタンパク性ダイマー化部分のＣ末端に結合している。

【００４２】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、ヘテロダイマーをコードする少なくとも１種のポリヌクレオチドと、宿主細胞内でポリヌクレオチドの発現を指示する制御因子とを含む、核酸構築物またはシステムが提供される。

【００４３】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、ヘテロダイマーまたは核酸構築物またはシステムを含む、宿主細胞が提供される。

【００４４】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、ヘテロダイマーの製造方法であって、

ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステムを宿主細胞内で発現させることを含む、方法が提供される。

【００４５】

本発明のいくつかの実施形態によると、方法は、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列および少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列にダイマー化部分を追加することを含む。

【００４６】

本発明のいくつかの実施形態によると、方法は、ヘテロダイマーを単離することを含む。

【００４７】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、ヘテロダイマーによる治療が有効に作用し得る疾患を治療するための方法であって、ヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、あるいはそれを含む宿主細胞を治療を必要とする患者に投与することを含み、当該投与によって疾患を治療する方法が提供される。

【００４８】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、免疫細胞の調節が有効に作用し得る疾患を治療するための方法であって、ヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、あるいはそれを含む宿主細胞を治療を必要とする患者に投与することを含み、当該投与によって疾患を治療する方法が提供される。

【００４９】

本発明のいくつかの実施形態によると、方法は、疾患の治療のための治療剤の投与をさらに含む。

【００５０】

本発明のいくつかの実施形態によると、ヘテロダイマーによる治療が有効に作用し得る疾患の治療において使用するための、ヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、またはそれを含む細胞が提供される。

【００５１】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、免疫細胞の調節は有効な疾患の治療において使用するための、ヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、またはそれを含む細胞が提供される。

【００５２】

本発明のいくつかの実施形態によると、組成物は疾患の治療のための治療剤をさらに含む。

【００５３】

本発明のいくつかの実施形態によると、疾患の治療のための治療剤は抗体を含む。

【００５４】

本発明のいくつかの実施形態によると、疾患の細胞はＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する。

【００５５】

本発明のいくつかの実施形態によると、疾患の細胞はＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する。

【００５６】

本発明のいくつかの実施形態によると、疾患は癌である。

【００５７】

本発明のいくつかの実施形態によると、癌はリンパ腫、白血病、および癌腫からなる群より選ばれる。

【００５８】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、免疫細胞の活性を調節するための方法であって、ヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、またはそれを含む宿主細胞の存在下、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで免疫細胞を活性化することを含む方法が提供

される。
【００５９】
本発明のいくつかの実施形態によると、活性は、Ｉ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する細胞、あるいはＩ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質の外因性リガンドまたは受容体の存在下で行われる。
【００６０】
本発明のいくつかの実施形態によると、調節は活性化である。
【００６１】
本発明のいくつかの実施形態によると、調節は阻害である。
【００６２】
本発明のいくつかの実施形態によると、免疫細胞はＴ細胞を含む。
【００６３】
特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術および／または科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様のまたは等価な方法および材料を、本発明の実施形態の実践または試験に使用することができるが、例示的な方法および／または材料を下記に記載する。矛盾する場合、定義を含む特許明細書が優先する。加えて、材料、方法、および実施例は単なる例示であり、必ずしも限定を意図するものではない。
【００６４】
本発明のいくつかの実施形態について、その例示のみを目的として添付の図面を参照して本明細書に記載する。以下、特に図面を詳細に参照して示す細部は、例示を目的とし、また本発明の実施形態の詳細な説明を目的とすることを強調する。同様に、図面と共に説明を見ることで、本発明の実施形態をどのように実践し得るかが当業者には明らかとなる。
【図面の簡単な説明】
【００６５】
【図１】図１は、ヘテロダイマーの可能な配座／コンホメーション（ａｒｒａｎｇｅｍｅｎｔｓ／ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ）の非限定的な例の模式図である。
【図２】図２は、本願において「ＤＳＰ３０５」（配列番号７９および８１）および「ＤＳＰ３０５＿Ｖ１」（配列番号７９および８３）と称する、ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬ（４－１ＢＢＬの細胞外ドメインの３つの繰り返し）のヘテロダイマーを模式的に表したものである。
【図３－１】図３Ａ～Ｈは、ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）およびＤＳＰ３０５＿Ｖ１（配列番号７９および８３）の予測される３Ｄ構造を表す。図３Ａは模式的３Ｄモデルであり、図３ＢはＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）の完全原子３Ｄモデルである。（「ノブ」および「ホール」の両方の）ＰＤ１配列は濃いグレーのリボンの表示（ｒｉｂｂｏｎｓ　ｄｉｓｐｌａｙ）で示されている（右側）。「ノブ」配列のｈＩｇＧ４は、図３Ａの中央の白いリボンで示されている。「ホール」配列のｈＩｇＧ４は、図３Ａの中央のグレーのリボンで示されている。４－１ＢＢＬは濃いグレーのリボン（左側）で示されている。「スペーサー」／「リンカー」セグメントは、ＰＤ１、ｈＩｇＧ４および４－１ＢＢＬの構造要素の間のグレーのリボンおよび白いリボンで示されている。ｈＩｇＧ４のＦｃドメインのヒンジ・システイン残基（複合体を安定化する）は、ＣＰＫ描写法で示されている。図３Ｃは模式的３Ｄモデルであり、図３Ｄはリガンド（ＰＤＬ１および４－１ＢＢ）の存在下におけるＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）の完全原子３Ｄモデルである。異なるドメインは、図３Ａと同様に表示される異なるリボンで示されている。さらに、ＰＤ１に結合したＰＤＬ１はグレーのリボンで示され（右側）、３つの４－１ＢＢドメインは４－１ＢＢＬと複合したグレーのリボンとして示されている（左側）。図３Ｅは模式的３Ｄモデルであり、図３ＦはＤＳＰ３０５＿Ｖ１（配列番号７９および８３）の完全原子３Ｄモデルである。異なるドメインは、図３Ａと同様に表示される異なるリボンで示されている。図３Ｇは

模式的３Ｄモデルであり、図３Ｈはリガンド（ＰＤＬ１および４－１ＢＢ）の存在下におけるＤＳＰ３０５＿Ｖ１（配列番号７９および８３）の完全原子３Ｄモデルである。異なるドメインは、図３Ａと同様に表示される異なるリボンで示されている。さらに、ＰＤ１に結合したＰＤＬ１はグレーのリボンで示され（右側）、３つの４－１ＢＢドメインは４－１ＢＢＬと複合したグレーのリボンとして示されている（左側）。

【図３－２】同上

【図３－３】同上

【図３－４】同上

【図４】図４は、還元および／または非還元条件下で分離したＤＳＰ３０５およびＤＳＰ３０５＿Ｖ１のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）解析の写真である。図に示したサンプルは粗（未精製）またはプロテインＡ精製した５日目の上清である。上清は表示したヘテロダイマーをコードするプラスミドで形質転換されたＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から得たものである。対照上清は非形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞の５日目の上清である。

【図５】図５は、本願において「ＴＳＰ１１１」（配列番号８５および８１）、「ＴＳＰ１１１＿Ｖ１」（配列番号８９および９１）および「ＴＳＰ１１１＿Ｖ２」（配列番号８５および８３）と称する、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーを模式的に表したものである。

【図６－１】図６Ａ～Ｄは、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）の予測される３Ｄ構造を表す。図６Ａは模式的３Ｄモデルであり、図６ＢはＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）の完全原子３Ｄモデルである。（「ノブ」鎖中の）ＰＤ１は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側下）。（「ホール」鎖中の）ＳＩＲＰαは、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側上）。「ノブ」配列のｈＩｇＧ４は、図中央の白いリボンで示されている。「ホール」配列のｈＩｇＧ４は、図中央のグレーのリボンで示されている。４－１ＢＢ－Ｌは濃いグレーのリボン（左側）で示されている。「スペーサー」／「リンカー」セグメントは、ＰＤ１、ｈＩｇＧ４および４－１ＢＢＬの構造要素の間のグレーのリボンおよび白いリボンで示されている。ｈＩｇＧ４のＦｃドメインのヒンジ・システイン残基（複合体を安定化する）は、ＣＰＫ描写法で示されている。図６Ｃは模式的３Ｄモデルであり、図６ＤはリガンドＣＤ４７、ＰＤＬ１および４－１ＢＢ）の存在下におけるＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）の完全原子３Ｄモデルである。異なるドメインは、図６Ａと同様に表示される異なるリボンで示されている。さらに、ＰＤ１に結合したＰＤＬ１はグレーのリボンで示され（右側下）、ＣＤ４７（ＳＩＲＰα受容体）はグレーのリボンで示され（右側上）、３つの４－１ＢＢ受容体は４－１ＢＢＬと複合したグレーのリボンとして示されている（左側）。

【図６－２】同上

【図７】図７は、還元および／または非還元条件下で分離したＴＳＰ１１１、ＴＳＰ１１１＿Ｖ１およびＴＳＰ１１１＿Ｖ２のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析の写真である。図に示したサンプルは粗（未精製）の５日目の上清である。上清は表示したヘテロダイマーをコードするプラスミドで形質転換されたＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から得たものである。対照上清は非形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞の５日目の上清である。

【図８－１】図８Ａ～Ｄは、ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）の、細胞表面に発現されたそのリガンドに対する結合を表す。図８Ａは、ＤＬＤ１－ＰＤＬ１細胞系上のＰＤＬ１受容体の発現を表すフローサイトメトリー解析ヒストグラムである。ＰＤＬ１の表面発現レベルは、ＤＬＤ１　ＷＴおよびＰＤＬ１過剰発現細胞系（ＤＬＤ１－ＰＤＬ１）の抗ＰＤＬ１抗体による免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＧＭＦＩ値は、ＦＡＣＳの検出およびＦｌｏｗＪｏソフトウエア解析で決定されたものを示した。図８Ｂは、ＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞系上の４－１ＢＢ受容体の発現を表すフローサイトメトリー解析ヒストグラムである。４－１ＢＢの表面発現レベルは、ＨＴ１０８０　ＷＴおよび４－１ＢＢ過剰発現細

胞系の抗４－１ＢＢ抗体による免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＧＭＦＩ値を示した。図８Ｃは、ＤＬＤ１　ＷＴおよびＰＤＬ１過剰発現細胞系に対するＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）の結合を表すフローサイトメトリー解析を示す。ヘテロダイマーのリガンド発現細胞系への結合を、抗４－１ＢＢＬ抗体を用いたその４－１ＢＢＬドメインの免疫染色と、続く表示したヘテロダイマーとの細胞のインキュベーションおよび続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＧＭＦＩ値を示し、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウエアによる結合曲線グラフの作製に使用した。図８Ｄは、ＨＴ１０８０　ＷＴおよび４－１ＢＢ過剰発現細胞系に対するＤＳＰ３０５の結合を表すフローサイトメトリー解析を示す。ヘテロダイマーのリガンド発現細胞系への結合を、抗ＰＤ１抗体を用いたそのＰＤ１ドメインの免疫染色と、続く表示したヘテロダイマーとの細胞のインキュベーションおよび続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＧＭＦＩ値を示し、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウエアによる結合曲線グラフの作製に使用した。

【図８－２】同上

【図９－１】図９Ａ～Ｄは、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＴＳＰ１１１の、細胞表面に発現されたそのリガンドに対する結合を表す。図９Ａは、ＤＬＤ１　ＷＴおよびＰＤＬ１過剰発現細胞系に対するＴＳＰ１１１の結合を表すフローサイトメトリー解析を示す。リガンド発現細胞系に対するヘテロダイマーの結合は、抗４－１ＢＢＬ抗体を用いた４－１ＢＢＬドメインの免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＧＭＦＩ値を示し、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウエアによる結合曲線グラフの作製に使用した。図９Ｂは、ＨＴ１０８０　ＷＴおよび４－１ＢＢ過剰発現細胞系に対するＴＳＰ１１１の結合を表すフローサイトメトリー解析を示す。ヘテロダイマータンパク質の細胞系への結合は、抗ＰＤ１抗体を用いたそのＰＤ１ドメインの免疫染色と、続く表示したヘテロダイマーとの細胞のインキュベーションおよび続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＧＭＦＩ値を示し、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウエアによる結合曲線グラフの作製に使用した。図９Ｃは、ＣＤ４７受容体のＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７過剰発現細胞系上の発現とＣＨＯ－Ｋ１　ＷＴ親細胞系状の未発現とを表すフローサイトメトリー解析ヒストグラムを示す。ＣＤ４７の表面発現レベルは、ＣＨＯ－Ｋ１　ＷＴおよびＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７細胞系の抗ヒトＣＤ４７抗体による免疫染色および続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＦＡＣＳ検出およびＦｌｏｗＪｏソフトウエア解析で決定したＧＭＦＩ値を示した。図９Ｄは、抗ＣＤ４７遮断抗体の不存在下または存在下におけるＣＨＯ－Ｋ１　ＷＴおよびＣＤ４７過剰発現細胞系に対するＴＳＰ１１１の結合を表すフローサイトメトリー解析を示す。リガンド発現細胞系に対するヘテロダイマーの結合は、抗ＰＤ１抗体を用いたそのＰＤ１ドメインの免疫染色と、続く表示したヘテロダイマーとの細胞のインキュベーションおよび続くフローサイトメトリー解析で決定した。ＧＭＦＩ値を示し、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウエアによる結合曲線グラフの作製に使用した。

【図９－２】同上

【図１０】図１０Ａ～Ｂは、ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＤＳＰ３０５と、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＴＳＰ１１１との、少なくとも２つのリガンドに対する同時結合を表す。ヘテロダイマーを含む上清または対照上清（未形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞由来）をＰＤＬ１またはＣＤ４７、あるいは両方のタンパク質を当モル量で含む混合物を予め被覆しておいた９６穴プレート上でインキュベートした。インキュベーションに続き、ビオチン化４－１ＢＢＬを用いて検出した。図１０Ａは、ＰＤＬ１被覆プレートに対する濃度依存的なＤＳＰ３０５の結合を示し、図１０Ｂは、ＣＤ４７被覆プレート、ＰＤＬ１被覆プレート、および混合タンパク質被覆プレートに対するＴＳＰ１１１の独立的な結合を示す。検出は、ＴＭＢ基質を用いた標準ＥＬＩＳＡプロトコルに従い、プレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製のＭｕｌｔｉｓｃａｎ　ＦＣ）を４５０ｎｍ（参照は５４０ｎｍ）で使用して実施した。

【図１１－１】図１１Ａ～Ｃは、ヘテロダイマーＤＳＰ３０５、ＴＳＰ１１１、ＴＳＰ１１１＿Ｖ１およびＴＳＰ１１１＿Ｖ２による４１ＢＢ仲介シグナル伝達の活性化を示す。図１１Ａ～Ｃは、以下の細胞によるＩＬ－８分泌を示す：ＤＳＰ３０５含有上清または対照上清（非形質転換細胞由来）の存在下においてＰＤ１被覆プレート内でインキュベートしたＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞（図１１Ａ）、ＴＳＰ１１１含有上清または対照上清（非形質転換細胞由来）の存在下においてＰＤ１またはＣＤ４７または量タンパク質の混合物を被覆したプレート内でインキュベートしたＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞（図１１Ｂ）、あるいはＴＳＰ１１１、ＴＳＰ１１１＿Ｖ１、またはＴＳＰ１１１＿Ｖ２含有上清または対照上清（非形質転換細胞由来）の存在下においてＣＤ４７被覆プレート内でインキュベートしたＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞（図１１Ｃ）。ＩＬ－８濃度を得るために、ＩＬ－８　ＥＬＩＳＡキットおよびプレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製のＭｕｌｔｉｓｃａｎ　ＦＣ）を４５０ｎｍ（参照は５４０ｎｍ）で使用して上清を解析した。

【図１１－２】同上

【図１２－１】図１２Ａは、本願において「ＴＳＰ１１２」（配列番号８１および１４６）と称するＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌヘテロダイマーの模式図である。図１２Ｂ～Ｃは、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘＣＤ４０ＬヘテロダイマーであるＴＳＰ１１２（配列番号８１および１４６）の予測される３Ｄ構造を表す。図１２Ｂは模式的３Ｄモデルであり、図１２ＣはＴＳＰ１１２（配列番号８１および１４６）の完全原子３Ｄモデルである。（「ノブ」鎖中の）ＰＤ１は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側下）。（「ホール」鎖中の）ＳＩＲＰαは、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側上）。「ノブ」配列のｈＩｇＧ４は、図中央の白いリボンで示されている。「ホール」配列のｈＩｇＧ４は、図中央のグレーのリボンで示されている。ＣＤ４０Ｌは濃いグレーのリボン（左側）で示されている。「スペーサー」／「リンカー」セグメントは、ＰＤ１、ＳＩＲＰαおよびｈＩｇＧ４およびＣＤ４０Ｌの構造要素の間のグレーのリボンおよび白いリボンで示されている。ｈＩｇＧ４のＦｃドメインのヒンジ・システイン残基（複合体を安定化する）は、ＣＰＫ描写法で示されている。

【図１２－２】同上

【図１３－１】図１３Ａは、本願において「ＴＳＰ２１５」（配列番号１３８および８５）と称する、ＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーを模式的に表したものである。図１３Ｂ～Ｃは、ＬＩＬＩＲＢ２－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＴＳＰ２１５（配列番号１３８および８５）の予測される３Ｄ構造を表す。図１３Ｂは模式的３Ｄモデルであり、図１３ＣはＴＳＰ１１５（配列番号１３８および８５）の完全原子３Ｄモデルである。（「ノブ」鎖中の）ＬＩＬＲＢ２は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側下）。（「ホール」鎖中の）ＳＩＲＰαは、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側上）。「ノブ」配列のｈＩｇＧ４は、図中央の白いリボンで示されている。「ホール」配列のｈＩｇＧ４は、図中央のグレーのリボンで示されている。４－１ＢＢＬは濃いグレーのリボン（左側）で示されている。「スペーサー」／「リンカー」セグメントは、ＬＩＬＲＢ２、ＳＩＲＰαおよびｈＩｇＧ４および４－１ＢＢＬの構造要素の間のグレーのリボンおよび白いリボンで示されている。ｈＩｇＧ４のＦｃドメインのヒンジ・システイン残基（複合体を安定化する）は、ＣＰＫ描写法で示されている。

【図１３－２】同上

【図１４】図１４Ａは、本願において「ＴＳＰ２１７」（配列番号１３８および１４６）と称する、ＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌヘテロダイマーを模式的に表したものである。図１４Ｂ～Ｃは、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘＣＤ４０ＬヘテロダイマーであるＴＳＰ２１７（配列番号１３８および１４６）の予測される３Ｄ構造を表す。図１４Ｂは模式的３Ｄモデルであり、図１４ＣはＴＳＰ２１７（配列番号１３８および１４６）の完全原子３Ｄモデルである。（「ノブ」鎖中の）ＬＩＬＲＢ２は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側下）。（「ホール」鎖中の）ＳＩＲＰαは、濃いグレ

ーのリボンの表示で示されている（右側上）。「ノブ」配列のｈＩｇＧ４は、図中央の白いリボンで示されている。「ホール」配列のｈＩｇＧ４は、図中央のグレーのリボンで示されている。ＣＤ４０Ｌは濃いグレーのリボン（左側）で示されている。「スペーサー」／「リンカー」セグメントは、ＬＩＬＲＢ２、ＳＩＲＰαおよびｈＩｇＧ４およびＣＤ４０Ｌの構造要素の間のグレーのリボンおよび白いリボンで示されている。ｈＩｇＧ４のＦｃドメインのヒンジ・システイン残基（複合体を安定化する）は、ＣＰＫ描写法で示されている。

【図１５】図１５Ａは、本願において「ＴＳＰ４０１」（配列番号１５０および７９）と称するＳＩＧＬＥＣ１０－ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーを模式的に表したものである。図１５Ｂ～Ｃは、ＳＩＧＬＥＣ１０－ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーである「ＴＳＰ４０１」（配列番号１５０および７９）の予測される３Ｄ構造を表す。図１５Ｂは模式的３Ｄモデルであり、図１５ＣはＴＳＰ４０１（配列番号１５０および７９）の完全原子３Ｄモデルである。（「ノブ」鎖中の）ＳＩＧＬＥＣ１０配列は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側下）。（「ホール」鎖中の）ＰＤ１は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側上）。「ノブ」配列のｈＩｇＧ４は、図中央の白いリボンで示されている。「ホール」配列のｈＩｇＧ４は、図中央のグレーのリボンで示されている。４－１ＢＢＬは濃いグレーのリボン（左側）で示されている。「スペーサー」／「リンカー」セグメントは、ＳＩＧＬＥＣ１０、ＰＤ１およびｈＩｇＧ４および４－１ＢＢＬの構造要素の間のグレーのリボンおよび白いリボンで示されている。ｈＩｇＧ４のＦｃドメインのヒンジ・システイン残基（複合体を安定化する）は、ＣＰＫ描写法で示されている。

【図１６】図１６Ａは、本願において「ＴＳＰ５０１」（配列番号１５２および７９）と称する、ＴＩＧＩＴ－ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーを模式的に表したものである。図１６Ｂ～ＣはＴＩＧＩＴ－ＰＤ１－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーである「ＴＳＰ５０１」（配列番号１５２および７９）の予測される３Ｄ構造を表す。図１６Ｂは模式的３Ｄモデルであり、図１６ＣはＴＳＰ５０１（配列番号１５２および７９）の完全原子３Ｄモデルである。（「ノブ」鎖中の）ＴＩＧＩＴ配列は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側下）。（「ホール」鎖中の）ＰＤ１は、濃いグレーのリボンの表示で示されている（右側上）。「ノブ」配列のｈＩｇＧ４は、図中央の白いリボンで示されている。「ホール」配列のｈＩｇＧ４は、図中央のグレーのリボンで示されている。４－１ＢＢＬは濃いグレーのリボン（左側）で示されている。「スペーサー」／「リンカー」セグメントは、ＴＩＧＩＴ、ＰＤ１およびｈＩｇＧ４および４－１ＢＢＬの構造要素の間のグレーのリボンおよび白いリボンで示されている。ｈＩｇＧ４のＦｃドメインのヒンジ・システイン残基（複合体を安定化する）は、ＣＰＫ描写法で示されている。

【図１７】図１７は、還元および／または非還元条件下で分離したＴＳＰ２１５、ＴＳＰ２１５＿Ｖ１、ＴＳＰ２１４およびＴＳＰ２１４＿Ｖ１のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析の写真である。図に示したサンプルは粗（未精製）の５日目の上清である。上清は表示したヘテロダイマーをコードするプラスミドで形質転換されたＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から得たものである。対照上清は非形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞の５日目の上清である。

【図１８－１】図１８Ａ～Ｂは、還元（Ｒ）および／または非還元（ＮＲ）条件下で分離したＴＳＰ１１２、ＴＳＰ２１７、ＤＳＰ２１８、ＴＳＰ２２１、ＴＳＰ２２２、ＴＳＰ４０１、ＴＳＰ４０３、ＴＳＰ５０１およびＴＳＰ５０３のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析の写真である。図に示したサンプルは粗（未精製、図１８Ａ）またはプロテインＡ精製した（図１８Ｂ）５日目の上清である。上清は表示したヘテロダイマーをコードするプラスミドで形質転換されたＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から得たものである。対照上清は非形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞の５日目の上清である。

【図１８－２】同上

【図１９】図１９Ａ～ＣはＴＳＰ１１１のウェスタンブロット解析の写真である。図に示したサンプルは粗（未精製）の５日目の上清である。上清は表示したヘテロダイマーをコードするプラスミドで形質転換されたＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から得たものである。対照上

清は非形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞の５日目の上清である。上清は非還元（ＮＲ）または還元（Ｒ）条件のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、次に、抗ＰＤ１（図１９Ａ）、抗ＳＩＲＰα（図１９Ｂ）または抗４－１ＢＢＬ（図１９Ｃ）抗体による免疫ブロッティングを実施した。

【図２０】図２０Ａ～ＣはＴＳＰ１１２、ＴＳＰ４０１、ＴＳＰ５０１およびＴＳＰ２２１のウェスタンブロット解析の写真である。図に示したサンプルは粗（未精製）の５日目の上清である。上清は表示したヘテロダイマーをコードするプラスミドで形質転換されたＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から得たものである。約５０ｎｇのヘテロダイマータンパク質を含む上清サンプルを非還元（ＮＲ）または還元（Ｒ）条件のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、次に、抗ＰＤ１（図２０Ａ）、抗ＳＩＲＰα（図２０Ｂ）または抗４－１ＢＢＬ（図２０Ｃ）抗体による免疫ブロッティングを実施した。

【図２１】図２１Ａ～ＣはＴＳＰ２１５、ＴＳＰ２１５＿Ｖ１、ＴＳＰ２１４、ＴＳＰ２１４＿Ｖ１、ＴＳＰ２１７およびＤＳＰ２１８のウェスタンブロット解析の写真である。図に示したサンプルは粗（未精製）の５日目の上清である。上清は表示したヘテロダイマーをコードするプラスミドで形質転換されたＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から得たものである。対照上清は非形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞の５日目の上清である。約５０ｎｇのヘテロダイマータンパク質を含む上清サンプルを非還元（ＮＲ）または還元（Ｒ）条件のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、次に、抗４－１ＢＢＬ抗体（図２１Ａ）、抗ＳＩＲＰα抗体（図２１Ｂ）および抗ＬＩＬＲＢ２抗体（図２１Ｃ）による免疫ブロッティングを実施した。

【図２２Ａ】図２２Ａ～Ｂは、ＴＳＰ４０１（図２２Ａ）およびＴＳＰ５０１（図２２Ｂ）ヘテロダイマーのＰＤ１アームのＤＬＤ１　ＰＤＬ１過剰発現細胞系の表面に発現されたリガンドＰＤＬ１との結合の、ＤＬＤ１－ＷＴ陰性対照細胞系との比較を表す。結合は、細胞を表示したヘテロダイマーとインキュベートした後の抗４－１ＢＢＬ抗体を用いた４－１ＢＢＬドメインの免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析によって決定した。

【図２２Ｂ】同上

【図２３】図２３は、ＴＳＰ４０１およびＴＳＰ５０１のＨＴ１０８０　ＷＴおよび４－１ＢＢ過剰発現細胞系への結合を示す。ヘテロダイマータンパク質の細胞系への結合は、細胞を表示したヘテロダイマーとインキュベートした後の抗ＰＤ１抗体を用いたＰＤ１ドメインの免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析によって決定した。

【図２４】図２４は、ＴＳＰ２１４のＨＴ１０８０過剰発現４－１ＢＢ細胞系への結合を示す。ヘテロダイマーの受容体発現細胞系への結合は、細胞を表示したヘテロダイマーとインキュベートした後の抗ＬＩＬＲＢ２抗体を用いたＬＩＬＲＢ２ドメインの免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析によって決定した。細胞の抗４－１ＢＢ遮断抗体とのインキュベーションはＴＳＰ２１４の細胞への結合を無くし、特異性を示した。

【図２５】図２５は、ＴＳＰ２１５のＨＴ１０８０過剰発現４－１ＢＢ細胞系への結合を示す。ヘテロダイマーの４－１ＢＢおよびＣＤ４７発現細胞系への結合は、細胞を表示したヘテロダイマーとインキュベートした後の抗ＬＩＬＲＢ２抗体を用いたＬＩＬＲＢ２ドメインの免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析によって決定した。特異性の試験のために、抗ＣＤ４７遮断抗体、抗４－１ＢＢ遮断抗体または両遮断抗体の組み合わせの不存在下または存在下で結合を決定した。

【図２６】図２６Ａ～Ｂは、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－ｓｃ３ｘＣＤ４０ヘテロダイマーであるＴＳＰ１１２の細胞表面に発現されたＣＤ４０への結合を表す。図２６Ａは、抗ＣＤ４０抗体を使用し、次にフローサイトメトリー解析を実施して決定した、ＨＴ１０８０－ＣＤ４０過剰発現細胞系上に発現されたＣＤ４０受容体のヒストグラムである。図２６Ｂは、ＨＴ１０８０過剰発現ＣＤ４０細胞へのＴＳＰ１１２の結合を表す。ヘテロダイマーのＣＤ４０発現細胞系への結合は、細胞を表示したヘテロダイマーとインキュベートした後の抗ＰＤ１抗体を用いたＰＤ１ドメインの免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析によって決定した。

【図２７】図２７Ａ～Ｃは、ＰＤ１－ＴＩＧＩＴ－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＴＳＰ５０１の細胞表面に発現されたＣＤ１５５（ＰＶＲ）への結合を表す。図２

６Ａ～Ｂは、抗ＣＤ１５５抗体を使用し、次にフローサイトメトリー解析を実施して決定した、内因性ＣＤ１５５のＤＬＤ１－ＷＴ細胞上の発現およびＵ９３７細胞による非発現を示すヒストグラムである。図２７Ｃは、ＴＳＰ５０１のＤＬＤ１－ＷＴ発現細胞への結合およびＵ９３７細胞への未結合を表す。結合は、細胞をヘテロダイマーとインキュベートした後の抗４－１ＢＢＬ抗体を用いた４－１ＢＢＬドメインの免疫染色と、続くフローサイトメトリー解析によって決定した。

【図２８－１】図２８Ａ～Ｃは、ＤＳＰ２１４ヘテロダイマーおよびＴＳＰ２１５ヘテロダイマーのそれぞれの対応部位に対する同時結合を表す。図２８Ａ～Ｂは、ＤＳＰ２１４（図２８Ａ）およびＴＳＰ２１５（図２８Ｂ）のＨＬＡ－Ｇおよび４１ＢＢへの結合を表す。図２８Ｃは、ＤＳＰ２１５のＣＤ４７および４１ＢＢへの結合を表す。ヘテロダイマーＴＳＰ２１４を含む上清または対照上清（図２８Ａ）または精製ＴＳＰ２１５ヘテロダイマー（図２８Ｂ～Ｃ）をＨＬＡ－Ｇ、ＣＤ４７またはＢＳＡで予備被覆した９６ウェルプレートでインキュベートした。結合は４１ＢＢ－ビオチンとインキュベートした後、ストレプトアビジン－ＨＲＰおよびＴＭＢ基質を用いた標準ＥＬＩＳＡプロトコルに従い、プレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製のＭｕｌｔｉｓｃａｎ　ＦＣ）を４５０ｎｍ（参照は６２０ｎｍ）で使用して決定した。

【図２８－２】同上

【図２９－１】図２９Ａ～Ｂは、ヘテロダイマーＴＳＰ４０１およびＴＳＰ５０１による４１ＢＢ仲介シグナル伝達の活性化を示す。図２９Ａは、ＴＳＰ４０１含有上清の存在下においてＰＤＬ１およびＣＤ２４被覆プレート内でインキュベートしたＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞によるＩＬ－８分泌を示す。図２９Ｂは、ＴＳＰ５０１含有上清の存在下においてＰＤＬ１およびＣＤ１５５（ＰＶＲ）被覆プレート内でインキュベートしたＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞によるＩＬ－８分泌を示す。

【図２９－２】同上

【図３０－１】図３０Ａ～Ｂは、ヘテロダイマーＴＳＰ１１２、ＴＳＰ２１７およびＤＳＰ２１８によるＣＤ４０仲介シグナル伝達の活性化を示す。図３０Ａは、ＴＳＰ１１２含有上清の存在下においてＰＤＬ１およびＣＤ４７被覆プレート内でインキュベートしたＨＴ１０８０　ＣＤ４０細胞によるＩＬ－８分泌を示す。図３０Ｂは、ＴＳＰ２１７含有またはＤＳＰ２１８含有上清の存在下においてＨＬＡ－ＧおよびＣＤ４７被覆プレート内でインキュベートしたＨＴ１０８０　ＣＤ４０細胞によるＩＬ－８分泌を示す。

【図３０－２】同上

【図３１】図３１はヘテロダイマーＴＳＰ２１５による４１ＢＢ仲介シグナル伝達の活性化を示す。ＴＳＰ２１５含有上清の希釈系列の存在下で、ＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７をＨＴ１０８０－４１ＢＢ細胞と共培養した。

【図３２】図３２は、本発明のいくつかの実施形態で想定されたヘテロダイマーの組成および配置を模式的に表した図である。

【発明を実施するための形態】

【００６６】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、ヘテロダイマーおよびその使用方法に関する。

【００６７】

本発明の少なくとも１つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明の用途が必ずしも以下の説明に示される詳細または実施例によって例示される詳細に限定されるとは限らないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態、または様々な方法で実践もしくは実行することが可能である。

【００６８】

二重シグナル伝達タンパク質（ＤＳＰ）は、シグナル変換タンパク質（ＳＣＰ）としても公知であり、これらはＩ型膜タンパク質の細胞外部分（細胞外アミノ末端）をＩＩ型膜タンパク質の細胞外部分（細胞外カルボキシル末端）に結合させ、２つの活性面を有する融合タンパク質を形成する二機能性融合タンパク質である。

【００６９】
本発明を完成させるに当たり、本発明者らはここでＩ型膜タンパク質の細胞外部分およびＩＩ型膜タンパク質の細胞外部分を含むヘテロダイマーを作製した。
【００７０】
よって、本発明の一態様によると、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な、前記少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列と、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の天然のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な、前記少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列とに結合したダイマー化部分を含む、ヘテロダイマーが提供される。
【００７１】
本明細書で使用するように、「ヘテロダイマー」という用語は、２種の異なるタンパク質（本明細書ではモノマーと称する）を人工的に結合することで作製された、天然には存在しない二量体タンパク質を示す。
【００７２】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーのモノマーは共有結合されていない。
【００７３】
他の特定の実施形態によると、ヘテロダイマーのモノマーは共有結合されている。
【００７４】
他の特定の実施形態によると、ヘテロダイマーのモノマーはジスルフィド結合で結合されている。
【００７５】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーのモノマーは複数のジスルフィド結合で結合されている。
【００７６】
本願明細書において、「ダイマー化部分」という用語は、ヘテロダイマーを形成するために２種の異なるモノマー結合可能な部分を示す。このようなダイマー化部分は当業界で知られており、化学性およびタンパク性の部分が挙げられる。
【００７７】
ダイマー化部分は、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列と、少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列とに結合している。
【００７８】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は、Ｉ型膜タンパク質および／またはＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列に直接結合されている。
【００７９】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は、Ｉ型膜タンパク質および／またはＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列に間接的に結合されている。
【００８０】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は、Ｉ型膜タンパク質および／またはＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列に共有結合されている。
【００８１】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は、Ｉ型膜タンパク質および／またはＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列に非共有結合されている。
【００８２】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は、Ｉ型膜タンパク質および／またはＩＩ型膜タンパク質と異種である。
【００８３】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は、少なくとも２種の異なる分子からなる組成である。

【００８４】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は非タンパク性部分、例えば、架橋剤、有機ポリマー、合成ポリマー、小分子等である。
【００８５】
複数のこのような非タンパク性部分が当業界で知られており、例えば、下記から購入可能である：Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ社、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、Ｐｒｏｔｅｏｃｈｅｍ社等。特定の実施形態によると、非タンパク性部分はヘテロ二機能性架橋剤である。ヘテロ二機能性架橋剤は２つの異なる反応末端を有する。典型的には、第一の工程で、ヘテロ二機能性架橋剤の１つの反応性基でモノマーを修飾し、残存する遊離試薬を除去する。第二の工程において、修飾したモノマーを第２のモノマーと混合し、そして試薬のもう一方の末端の修飾基と反応させる。最も広く使用されているものは、アミン基およびスルフヒドリル基を介してタンパク質をカップリングさせる（最も不安定なアミン反応性ＮＨＳエステルが初めにカップリングし、未結合試薬を除去した後、スルフヒドリル基のカップリングが進行する）。スルフヒドリル反応基は通常、マレイミド、ピリジルジスルフィドおよびアルファ－ハロセチルである。他の架橋剤としては、カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）と一級アミン（－NH_2）の間を繋ぐカルボジイミドが挙げられる。別の手法は、１つのモノマーのリシン残基をチオールに修飾し、第２のモノマーをマレイミド基の付加によって修飾し、続いてモノマー間に安定なチオエステル結合を形成する。モノマーの内の１種が元々チオールを有する場合、これらの基を他のモノマーに結合したマレイミドと直接反応させることができる。ビス［２－（４－アジドサリチルアミド）エチル）］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）等の、１つの光反応性末端を有するヘテロ二機能性架橋剤も存在する。光反応性基は、反応するための特定の基が存在しないときに使用され、これはＵＶ光への暴露によって光反応性基が非特異的に反応するためである。このようなヘテロ二機能性架橋剤の非限定的な具体例としては、下記が挙げられるが、これらに限定されるものではない：アルキン－ＰＥＧ４－マレイミド、アルキン－ＰＥＧ５－Ｎ－ヒドロキシサクシニミジルエステル、マレイミド－ＰＥＧ－サクシニミジルエステル、アジド－ＰＥＧ４－フェニルオキサジアゾールメチルスルホン、ＬＣ－ＳＭＣＣ（サクシニミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロエート））、ＭＰＢＨ（４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド塩化水素＋１／２ジオキサン）、ＰＤＰＨ（３－（２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド）、ＳＩＡＢ（Ｎ－サクシニミジル（４－イオドアセチル）アミノ安息香酸）、ＳＭＰＨ（サクシニミジル－６－（（ｂ－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサン酸）、スルホ－ＫＭＵＳ（Ｎ－（κ－マレイミドウンデカノイルオキシ）スルホサクシニミドエステル）、スルホ－ＳＩＡＢ（スルホサクシニミジル（４－イオドアセチル）アミノベンゾエート）、３－（マレイミド）プロピオン酸　Ｎ－ヒドロキシサクシニミドエステル、塩化メトキシカルボニルスルフェニル、プロパルギル－ＰＥＧ－酸、アミノ－ＰＥＧ－ｔ－ブチルエステル、ＢｏｃＮＨ－ＰＥＧ５－酸、ＢＭＰＨ（Ｎ－（β－マレイミドプロピオン酸）ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩）、ＡＮＢ－ＮＯＳ、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＬＣ－ＳＰＤＰ、ＭＢＳ、ＳＢＡ、ＳＩＡ、スルホ－ＳＩＡ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、ＳＰＤＰ、スルホ－ＬＣ－ＳＰＤＰ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＡＮＰＡＨ、スルホ－ＳＭＣＣ。
【００８６】
他の特定の実施形態によると、ダイマー化部分はタンパク性部分である。
【００８７】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は、２種の異なる親和性相補性タグのための２種の別個の親和性部分を有するポリペプチドの親和性ペアを含む。このような親和性ペアは当業界で知られており、下記が挙げられるが、これらに限定されるものではない：ヘマグルチニン（ＨＡ）、抗ＨＡ、ＡｖｉＴａｇＴＭ、Ｖ５、Ｍｙｃ、Ｔ７、ＦＬＡＧ、ＨＳＶ、ＶＳＶ－Ｇ、Ｈｉｓ、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、リザベジン、金属親和性タグ、レクチン親和性タグ。当業者はどのタグを選択すべきかわかるであろう。

【００８８】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分は任意の抗体（例：ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤまたはＩｇＥ）またはその断片のＦｃドメインである。
【００８９】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分はヒトＩｇＧ４のＦｃドメインである。
【００９０】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分はヒトＩｇＧ１のＦｃドメインである。
【００９１】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分はＦｃドメインモノマーである。
【００９２】
他の特定の実施形態によると、ダイマー化部分はＦｃドメインダイマーである。
【００９３】
抗体のＦｃドメインを用いてヘテロダイマーを作製する際に使用可能な複数の機構が存在し、ノブス・イントゥ・ホールズ（Ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－Ｈｏｌｅｓ）法または電荷ペア法（例えば、Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010)を参照、本参照をもってその全てが本願に組み込まれるものとする）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。
【００９４】
よって、特定の実施形態によると、Ｆｃドメインは保存性および非保存性のアミノ酸置換（本明細書において変異とも称する）を有し得る。
【００９５】
タンパク質に参照して配列同一性のパーセンテージが使用されるとき、同一ではない残基の位置は、多くの場合、保存性アミノ酸置換によって異なり、このとき、アミノ酸残基は類似した化学的性質（例：電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基によって置換され、そのため、分子の機能的性質は変更されない。配列が保存性置換によって異なる場合、置換の保存的性質について修正するためにパーセント配列同一性は上向きに調製され得る。このような保存性置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると考えられる。このような調整を行うための手段は当業者に広く知られている。典型的には、保存性置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコア付けすることを含み、それによってパーセンテージ配列同一性を増やす。よって、例えば、同一アミノ酸のスコアが１で、非保存性置換のスコアが０のとき、保存性置換には０と１との間のスコアが与えられる。保存性置換のスコアを、例えば、Henikoff S and Henikoff JG. [Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992,89(22): 10915-9]のアルゴリズムに従って計算する。
【００９６】
保存性アミノ酸および非保存性アミノ酸置換に関するさらなる説明は後述した。
【００９７】
このようなＦｃドメインの置換は当業界で公知である。
【００９８】
本発明の特定の実施形態と共に使用可能な代表的な例は、「ノブ・イントゥ・ホール（knob-into-hole）」(「ＫＩＨ」）型である。このようなノブ（ｋｎｏｂ）およびホール（ｈｏｌｅ）変異は当業界で広く知られており、例えば、米国特許第８，２１６，８０５号明細書、Shane Atwell et Al. J. Mol. Biol. (1997) 270, 26-35、Cater et al.（Protein Engineering vol.9 no.7 pp.617-621, 1996）、およびA. Margaret Merchant et.al. Nature Biotechnology (1998) 16 Julyに開示されており、これらの内容は本参照をもって本明細書に組み込まれるものとする。さらにMerchant et al., Nature Biotech. 16:677 (1998)に記載されているように、これらの「ノブおよびホール」変異は、ヘテロダイマー化を防ぐためにジスルフィド結合と組み合わせることができる。
【００９９】

よって、特定の実施形態によると、モノマーの内の１つはノブ変異を含むＦｃドメインを含み、他のモノマーはホール変異を含むＦｃドメインを含む。

【０１００】

特定の免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスから特定の免疫グロブリンのＦｃドメインを選択し、ノブ変異用の第１のＦｃバリアントと、ホール変異用の他のバリアントを選択することは、当業者の技術の範囲内である。特定の実施形態と共に使用可能な置換の非限定的な例示には、配列番号１０９、１１０または１１１に示したヒトＩｇＧ４アミノ酸配列に対応するＳ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖおよび／またはＥ３５６Ｃ（ＥＵの番号付け（Kabat, E.A., T.T. Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry and K.S. Gottesman. 1987. Sequences of proteins of Immunological Interest. US. Dept. of Health and Human Services, Bethesda）に基づく）、あるいは配列番号１２、１３または１４に示したヒトＩｇＧ１アミノ酸配列に対応するＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３５４Ｃ、Ｄ３５６Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａおよび／またはＹ４０７Ｖ（ＥＵの番号付け（Kabat, E.A., T.T. Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry and K.S. Gottesman. 1987. Sequences of proteins of Immunological Interest. US. Dept. of Health and Human Services, Bethesda）に基づく）が挙げられる。

【０１０１】

特定の実施形態によると、Ｆｃドメインは配列番号１０９～１１４からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む。

【０１０２】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列を有するモノマーはノブ変異を含む。

【０１０３】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列を有するモノマーはホール変異を含む。

【０１０４】

特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を有するモノマーはノブ変異を含む。

【０１０５】

特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を有するモノマーはホール変異を含む。

【０１０６】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列およびＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含むモノマーはノブ変異を含む。

【０１０７】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列およびＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含むモノマーはホール変異を含む。

【０１０８】

特定の実施形態によると、ダイマー化部分はロイシンジッパーまたはヘリックス－ループ－ヘリックスを含む。

【０１０９】

いくつかの実施形態のヘテロダイマーは、少なくとも１種のＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列および少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種のアミノ酸配列を含む。このようなヘテロダイマーの可能な配置の非限定的な例を模式的に図１に示した。

【０１１０】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーの配置は、図１のパネル１～１３から選ばれ、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０１１１】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーに含まれるモノマーのそれぞれがＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列および／またはＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含む。

【０１１２】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーに含まれるモノマーのそれぞれがＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列およびＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含む。

【０１１３】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含む第１のモノマー、およびＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０１１４】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列とＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列とを含む第１のモノマーを含む。

【０１１５】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列とＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０１１６】

両方のモノマーがＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含む場合、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列は同一であり得るか、配列は異なるが同じＩ型膜タンパク質のものであり得るか、または異なるＩ型膜タンパク質のものであり得る。

【０１１７】

よって、特定の実施形態によると、第１のモノマーのＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は第２のモノマーのＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列と同一である。

【０１１８】

他の特定の実施形態によると、第１のモノマーのＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は第２のモノマーのＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列とは別個である（即ち異なる）。

【０１１９】

特定の実施形態によると、第１のモノマーのＩ型膜タンパク質は第２のモノマーのＩ型膜タンパク質とは別個である（即ち異なる）。

【０１２０】

両方のモノマーがＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含む場合、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は同一であり得るか、配列は異なるが同じＩＩ型膜タンパク質のものであり得るか、または異なるＩＩ型膜タンパク質のものであり得る。

【０１２１】

よって、特定の実施形態によると、第１のモノマーのＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は第２のモノマーのＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列と同一である。

【０１２２】

他の特定の実施形態によると、第１のモノマーのＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は第２のモノマーのＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列とは別個である（即ち異なる）。

【０１２３】

特定の実施形態によると、第１のモノマーのＩＩ型膜タンパク質は第２のモノマーのＩＩ型膜タンパク質とは別個である（即ち異なる）。

【０１２４】

特定の実施形態によると、ダイマー化部分がタンパク性部分のとき、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列はタンパク性ダイマー化部分のＮ末端に結合され、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列はタンパク性ダイマー化部分のＣ末端に結合されている。

【０１２５】

特定の実施形態によると、ダイマー化部分がタンパク性部分のとき、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列はタンパク性ダイマー化部分のＣ末端に結合され、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列はタンパク性ダイマー化部分のＮ末端に結合されている。

【０１２６】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分がタンパク性部分のとき、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列およびＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列の両方が、タンパク性ダイマーのダイマー化部分のＣ末端またはＮ末端に結合されている。
【０１２７】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分がタンパク性部分のとき、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列およびＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列の両方が、タンパク性ダイマーのダイマー化部分のＣ末端に結合されている。
【０１２８】
特定の実施形態によると、ダイマー化部分がタンパク性部分のとき、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列およびＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列の両方が、タンパク性ダイマーのダイマー化部分のＮ末端に結合されている。
【０１２９】
本明細書で使用するように、「Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列」という句は、Ｉ型膜タンパク質の本来のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能な、Ｉ型膜タンパク質の連続したアミノ酸の配列を示す。
【０１３０】
特定の実施形態によると、このアミノ酸配列は、Ｉ型膜タンパク質の細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。
【０１３１】
本明細書で使用するように、「Ｉ型膜タンパク質」という句はＮ－末端細胞外ドメインを有する膜貫通タンパク質を示す。
【０１３２】
Ｉ型膜タンパク質の非限定的な例としては、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＬＡＧ３、ＢＴＮ３Ａ１、ＣＤ２７、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＥＮＧ、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＣＤ８４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ４０、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１６４、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ４、ＢＴＬＡ、ＬＩＬＲＢ１、ＬＩＬＲＢ２、ＴＹＲＯＢＰ、ＩＣＯＳ、ＶＥＧＦＡ、ＣＳＦ１、ＣＳＦ１Ｒ、ＶＥＧＦＢ、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、ＧＤＮＦ、ＰＤＧＦＣ、ＰＤＧＦＤ、ＲＡＥＴ１Ｅ、ＣＤ１５５、ＣＤ１６６、ＭＩＣＡ、ＮＲＧ１、ＨＶＥＭ、ＤＲ３、ＴＥＫ、ＴＧＦＢ１、ＬＹ９６、ＣＤ９６、ＫＩＴ、ＣＤ２４４、ＧＦＥＲおよびＳＩＧＬＥＣが挙げられる。
【０１３３】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質は、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＬＡＧ３、ＢＴＮ３Ａ１、ＣＤ２７、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＥＮＧ、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＣＤ８４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ４０、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＤ１６４、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ４、ＢＴＬＡ、ＬＩＬＲＢ１、ＬＩＬＲＢ２、ＴＹＲＯＢＰ、ＩＣＯＳ、ＶＥＧＦＡ、ＣＳＦ１、ＣＳＦ１Ｒ、ＶＥＧＦＢ、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、ＧＤＮＦ、ＰＤＧＦＣ、ＰＤＧＦＤ、ＲＡＥＴ１Ｅ、ＣＤ１５５、ＣＤ１６６、ＭＩＣＡ、ＮＲＧ１、ＨＶＥＭ、ＤＲ３、ＴＥＫ、ＴＧＦＢ１、ＬＹ９６、ＣＤ９６、ＫＩＴ、ＣＤ２４４、およびＧＦＥＲからなる群より選ばれる。
【０１３４】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＬＩＬＲＢ１、ＬＩＬＲＢ２、ＣＳＦ１、ＣＳＦ１ＲおよびＴＧＦＢ１からなる群より選ばれる。
【０１３５】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質は、ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＴＩＧＩＴ、ＬＩＬＲＢ２およびＳＩＧＬＥＣからなる群より選ばれる。
【０１３６】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質は免疫調節因子である。
【０１３７】

本明細書で使用するように、「免疫調節因子」という用語は、免疫細胞応答（即ち、活性化または機能）を調節するタンパク質を示す。免疫調節因子は、免疫細胞の活性化または機能を正の方向に調節するか、あるいは免疫細胞の活性化または機能を負の方向に調節する。このような免疫調節因子は当業界で知られており、免疫チェックポイントタンパク質、サイトカイン等が挙げられる。

【０１３８】

特定の実施形態によると、免疫調節因子は免疫活性化因子である。

【０１３９】

他の特定の実施形態によると、免疫調節因子は免疫抑制因子または阻害因子である。

【０１４０】

Ｉ型膜タンパク質免疫調節因子の非限定的な例としては以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない：ＰＤ１、ＳＩＲＰα、ＣＤ２８、ＣＳＦ１Ｒ、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＣＴＬＡ４、ＩＣＯＳ、ＣＤ２７、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＳＩＧＬＥＣ１０およびＴＩＧＩＴ。特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質は単一のＩ型膜タンパク質を含む。

【０１４１】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質は少なくとも１種のＩ型膜タンパク質を含む。

【０１４２】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質は少なくとも２種のＩ型膜タンパク質を含む。

【０１４３】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーの組成および配置は、図３２に模式的に示されたヘテロダイマーから選ばれ、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０１４４】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＰＤ１およびＳＩＲＰαからなる群より選ばれる。

【０１４５】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＰＤ１である。

【０１４６】

本明細書において使用する場合、「ＰＤ１（プログラム死１、別名ＣＤ２７９）」という用語は、ＰＤＣＤ１遺伝子（ＧｅｎｅＩＤ：５１３３）のポリペプチドまたはその機能的ホモログ、例えば機能的断片を示す。特定の実施形態によると、「ＰＤ１」という用語は、ＰＤ１ポリペプチドの機能的ホモログを示す。特定の実施形態によると、ＰＤ１は、ヒトＰＤ１である。特定の実施形態によると、ＰＤ１タンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００５００９で提供されるものなどのヒトタンパク質を示す。

【０１４７】

ＰＤ－１のリガンドは、ＰＤＬ１およびＰＤＬ２（別名Ｂ７－ＤＣ）の２つが今日までに同定されている。特定の実施形態によると、ＰＤＬ１タンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１２５４６３５およびＮＰ＿０５４８６２で提供されるものなどのヒトタンパク質を示す。特定の実施形態によると、ＰＤＬ２タンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿０７９５１５で提供されるものなどのヒトタンパク質を示す。

【０１４８】

特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は配列番号１を含む。

【０１４９】

特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は配列番号１からなる。

【０１５０】

本願明細書で使用するように、「ＰＤＣＤ１遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＰＤＣＤ１遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機

能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含むＰＤ１ポリペプチドの一部であって、全長ＰＤ１がＰＤ－Ｌ１および／またはＰＤ－Ｌ２に結合する活性を少なくとも維持するものを示す。

【０１５１】

結合を試験するためのアッセイは、当技術分野で周知であり、フローサイトメトリー、ＢｉａＣｏｒｅ、バイオレイヤー干渉法Ｂｌｉｔｚ（登録商標）アッセイ、ＨＰＬＣを含むが、これらに限定されない。

【０１５２】

特定の実施形態によると、ＰＤ１のＰＤ－Ｌ１に対する結合は、ＳＰＲ分析によって決定したＫｄが１ｎＭ～１００μＭ、１０ｎＭ～１０μＭ、１００ｎＭ～１００μＭ、２００ｎＭ～１０μＭのＫｄであり、それぞれの可能性が本発明の別個の実施形態を表す。

【０１５３】

特定の実施形態によると、ＰＤ１のＰＤＬ１に対する結合は、ＳＰＲ分析によって決定したＫｄが約２７０ｎＭである。

【０１５４】

特定の実施形態によると、ＰＤ１のＰＤＬ１に対する結合は、ＳＰＲ分析によって決定したＫｄが約８～９μＭである。

【０１５５】

特定の実施形態によると、ＰＤ１は、当該ＰＤ１の細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。

【０１５６】

特定の実施形態によると、ＰＤ１のアミノ酸配列は、配列番号５、６、または７のアミノ酸配列を含む。

【０１５７】

特定の実施形態によると、ＰＤ１のアミノ酸配列は、配列番号５、６、または７のアミノ酸配列からなる。

【０１５８】

「ＰＤ１」という用語には、所望の活性（即ち、ＰＤ－Ｌ１および／またはＰＤ－Ｌ２への結合）を示す機能的ホモログ（天然の、または合成／組換えで作製されたもの）も包含される。そのようなホモログは、例えば、配列番号１、５、６または７のポリペプチドと、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一もしくは相同であり得るか、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列（本明細書でさらに後述する）と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一であり得る。

【０１５９】

本明細書で使用するように、「同一性」または「配列同一性」とは、包括的な同一性、即ち、本願で開示する全長アミノ酸配列または核酸配列に対する同一性であって、その部分に対するものではない。

【０１６０】

配列の同一性または相同性は、Ｂｌａｓｔ、ＣｌｕｓｔａｌＷ、およびＭＵＳＣＬＥといった、タンパク質または核酸の配列アライメントアルゴリズムのいずれかを使用して決

定することができる。

【０１６１】

ホモログは、本明細書でさらに後述するように、オルソログ、欠失変異体、挿入変異体、またはアミノ酸置換を含む置換変異体を指す場合もある。

【０１６２】

特定の実施形態によると、ＰＤ１ポリペプチドは保存性および非保存性アミノ酸置換を含み得る。このような置換は当業界で知られており、例えば、Maute et al. PNAS, 2015 Nov 24;112(47):E6506-14、Ju Yeon et al. Nature Communications 2016 volume 7, Article number: 13354 (DOI: 10.1038/ncomms13354)、およびZack KM et al. Structure. 2015 23(12): 2341-2348 (DOI:10.1016/j.str.2015.09.010)に記載されており、これらの内容は本参照をもって本明細書に組み込まれるものとする。

【０１６３】

特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変異は、配列番号６に示したＰＤ１アミノ酸配列に対応するＶ３９、Ｌ４０、Ｎ４１、Ｙ４３、Ｒ４４、Ｍ４５、Ｓ４８、Ｎ４９、Ｑ５０、Ｔ５１、Ｄ５２、Ｋ５３、Ａ５６、Ｑ６３、Ｇ６５、Ｑ６６、Ｖ７２、Ｈ８２、Ｍ８３、Ｒ９０、Ｙ９６、Ｌ９７、Ａ１００、Ｓ１０２、Ｌ１０３、Ａ１０４、Ｐ１０５、Ｋ１０６、およびＡ１０７から選ばれたアミノ酸残基に位置する。特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変異は、配列番号６に示したＰＤ１アミノ酸配列に対応するＶ３９、Ｌ４０、Ｎ４１、Ｙ４３、Ｒ４４、Ｍ４５、Ｓ４８、Ｎ４９、Ｑ５０、Ｔ５１、Ｄ５２、Ｋ５３、Ａ５６、Ｑ６３、Ｇ６５、Ｑ６６、Ｃ６８、Ｖ７２、Ｈ８２、Ｍ８３、Ｒ９０、Ｙ９６、Ｌ９７、Ａ１００、Ｓ１０２、Ｌ１０３、Ａ１０４、Ｐ１０５、Ｋ１０６、およびＡ１０７から選ばれたアミノ酸残基に位置する。

【０１６４】

特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変化は、配列番号６に示すＰＤ１のアミノ酸配列に対応する下記からなる群より選ばれる：（１）Ｖ３９ＨもしくはＶ３９Ｒ、（２）Ｌ４０ＶもしくはＬ４０Ｉ、（３）Ｎ４１ＩもしくはＮ４１Ｖ、（４）Ｙ４３ＦもしくはＹ４３Ｈ、（５）Ｒ４４ＹもしくはＲ４４Ｌ、（６）Ｍ４５Ｑ、Ｍ４５Ｅ、Ｍ４５Ｌ、もしくはＭ４５Ｄ、（７）Ｓ４８Ｄ、Ｓ４８Ｌ、Ｓ４８Ｎ、Ｓ４８Ｇ、もしくはＳ４８Ｖ、（８）Ｎ４９Ｃ、Ｎ４９Ｇ、Ｎ４９Ｙ、もしくはＮ４９Ｓ、（９）Ｑ５０Ｋ、Ｑ５０Ｅ、もしくはＱ５０Ｈ、（１０）Ｔ５１Ｖ、Ｔ５１Ｌ、もしくはＴ５１Ａ、（１１）Ｄ５２Ｆ、Ｄ５２Ｒ、Ｄ５２Ｙ、もしくはＤ５２Ｖ、（１２）Ｋ５３ＴもしくはＫ５３Ｌ、（１３）Ａ５６ＳもしくはＡ５６Ｌ、（１４）Ｑ６３Ｔ、Ｑ６３Ｉ、Ｑ６３Ｅ、Ｑ６３Ｌ、もしくはＱ６３Ｐ、（１５）Ｇ６５Ｎ、Ｇ６５Ｒ、Ｇ６５Ｉ、Ｇ６５Ｌ、Ｇ６５Ｆ、もしくはＧ６５Ｖ、（１６）Ｑ６６Ｐ、（１７）Ｖ７２Ｉ、（１８）Ｈ８２Ｑ、（１９）Ｍ８３ＬもしくはＭ８３Ｆ、（２０）Ｒ９０Ｋ、（２１）Ｙ９６Ｆ、（２２）Ｌ９７Ｙ、Ｌ９７Ｖ、もしくはＬ９７Ｉ、（２３）Ａ１００ＩもしくはＡ１００Ｖ、（２４）Ｓ１０２ＴもしくはＳ１０２Ａ、（２５）Ｌ１０３Ｉ、Ｌ１０３Ｙ、もしくはＬ１０３Ｆ、（２６）Ａ１０４Ｓ、Ａ１０４Ｈ、もしくはＡ１０４Ｄ、（２７）Ｐ１０５Ａ、（２８）Ｋ１０６Ｇ、Ｋ１０６Ｅ、Ｋ１０６Ｉ、Ｋ１０６Ｖ、Ｋ１０６Ｒ、もしくはＫ１０６Ｔ、および（２９）Ａ１０７Ｐ、Ａ１０７Ｉ、もしくはＡ１０７Ｖ。

【０１６５】

特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変化は、配列番号６に示すＰＤ１のアミノ酸配列に対応する下記からなる群より選ばれる：（１）Ｖ３９ＨもしくはＶ３９Ｒ、（２）Ｌ４０ＶもしくはＬ４０Ｉ、（３）Ｎ４１ＩもしくはＮ４１Ｖ、（４）Ｙ４３ＦもしくはＹ４３Ｈ、（５）Ｒ４４ＹもしくはＲ４４Ｌ、（６）Ｍ４５Ｑ、Ｍ４５Ｅ、Ｍ４５Ｌ、もしくはＭ４５Ｄ、（７）Ｓ４８Ｄ、Ｓ４８Ｌ、Ｓ４８Ｎ、Ｓ４８Ｇ、もしくはＳ４８Ｖ、（８）Ｎ４９Ｃ、Ｎ４９Ｇ、Ｎ４９Ｙ、もしくはＮ４９Ｓ、（９）Ｑ５０Ｋ、Ｑ５０Ｅ、もしくはＱ５０Ｈ、（１０）Ｔ５１Ｖ、Ｔ５１Ｌ、もしくはＴ５１Ａ、（１１）Ｄ５２Ｆ、Ｄ５２Ｒ、Ｄ５２Ｙ、もしくはＤ５２Ｖ、（１２）Ｋ５３ＴもしくはＫ５３

Ｌ、（１３）Ａ５６ＳもしくはＡ５６Ｌ、（１４）Ｑ６３Ｔ、Ｑ６３Ｉ、Ｑ６３Ｅ、Ｑ６３Ｌ、もしくはＱ６３Ｐ、（１５）Ｇ６５Ｎ、Ｇ６５Ｒ、Ｇ６５Ｉ、Ｇ６５Ｌ、Ｇ６５Ｆ、もしくはＧ６５Ｖ、（１６）Ｑ６６Ｐ、（１７）Ｃ６８Ｓ（１８）、Ｖ７２Ｉ、（１９）Ｈ８２Ｑ、（２０）Ｍ８３ＬもしくはＭ８３Ｆ、（２１）Ｒ９０Ｋ、（２２）Ｙ９６Ｆ、（２３）Ｌ９７Ｙ、Ｌ９７Ｖ、もしくはＬ９７Ｉ、（２４）Ａ１００ＩもしくはＡ１００Ｖ、（２５）Ｓ１０２ＴもしくはＳ１０２Ａ、（２６）Ｌ１０３Ｉ、Ｌ１０３Ｙ、もしくはＬ１０３Ｆ、（２７）Ａ１０４Ｓ、Ａ１０４Ｈ、もしくはＡ１０４Ｄ、（２８）Ｐ１０５Ａ、（２９）Ｋ１０６Ｇ、Ｋ１０６Ｅ、Ｋ１０６Ｉ、Ｋ１０６Ｖ、Ｋ１０６Ｒ、もしくはＫ１０６Ｔ、および（３０）Ａ１０７Ｐ、Ａ１０７Ｉ、もしくはＡ１０７Ｖ。

【０１６６】

特定の実施形態によると、アミノ酸変異は、配列番号１に示すＰＤ１アミノ酸配列のアミノ酸残基Ｃ９３に対応する場所（例えば、配列番号６に示すＰＤ１アミノ酸配列のアミノ酸残基Ｃ６８と同等）に位置する。

【０１６７】

特定の実施形態によると、ＰＤ１ポリペプチドは、配列番号１に示すＰＤ１アミノ酸配列のアミノ酸残基９３に対応する位置（例えば、配列番号６に示すＰＤ１アミノ酸配列のアミノ酸残基Ｃ６８と同等）にＣからＳへのアミノ酸修飾を含み得る。

【０１６８】

よって、特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は、配列番号３を含む。

【０１６９】

特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は配列番号３からなる。

【０１７０】

本明細書で使用するように、「配列番号１に示したＰＤ１アミノ酸配列に対応する」、「配列番号１に対応する」、「配列番号６に示したＰＤ１アミノ酸配列に対応する」、または「配列番号６に対応する」という句は、任意の他のＰＤ１アミノ酸配列の対応するアミノ酸残基を含めることを意図する。

【０１７１】

保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換に関するさらなる説明は、本明細書で前述および後述した。

【０１７２】

本発明のいくつかの実施形態のＰＤ１は、配列番号３、５、６、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３または４５のポリペプチドに対して少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一または相同である、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一または相同であり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０１７３】

特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は、配列番号７のＰ１～Ｌ５および／またはＦ１４６～Ｖ１５０に対応するアミノ酸セグメントを含まない。

【０１７４】

特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は配列番号７のＰ１～Ｌ５および／またはＦ１４６～Ｖ１５０に対応するいずれのアミノ酸残基も含まない。

【０１７５】
特定の実施形態によると、ＰＤ１のアミノ酸配列は、１００～２８８アミノ酸、１００～２００アミノ酸、１２０～１８０アミノ酸、１２０～１６０、１３０～１７０アミノ酸、１３０～１６０、１３０～１５０、１４０～１６０アミノ酸、１４５～１５５アミノ酸、１２３～１６６アミノ酸、１３８～１４５アミノ酸、１２３～１４８アミノ酸、１２６～１４８アミノ酸、１２３～１４０アミノ酸、１２６～１４０アミノ酸、１２７～１４０アミノ酸、１３０～１４０アミノ酸を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０１７６】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は、配列番号３、５、６、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３および４５からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む。
【０１７７】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は、配列番号３、５、６、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３および４５からなる群より選ばれるアミノ酸配列からなる。
【０１７８】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は、配列番号１３および７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む。
【０１７９】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列は、配列番号１３および７からなる群より選ばれるアミノ酸配列からなる。
【０１８０】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列をコードするＰＤ１核酸配列は、配列番号２、４、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４または４６に対して少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一であり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０１８１】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列をコードするＰＤ１核酸配列は、配列番号１４または８と少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一である。
【０１８２】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列をコードするＰＤ１核酸配列は、配列番号２、４、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４および４６からなる群より選ばれる核酸配列を含む。
【０１８３】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列をコードするＰＤ１核酸配列は、配列番号２、４、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４および４６からなる群より選ばれる核酸配列からなる。

【０１８４】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列をコードするＰＤ１核酸配列は、配列番号１４または８を含む。
【０１８５】
特定の実施形態によると、ＰＤ１アミノ酸配列をコードするＰＤ１核酸配列は、配列番号１４または８からなる。
【０１８６】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＳＩＲＰαである。
【０１８７】
本明細書において使用する場合、「ＳＩＲＰα（シグナル調節タンパク質アルファ、別名ＣＤ１７２ａ）」という用語は、ＳＩＲＰＡ遺伝子（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　１４０８８５）のポリペプチドまたはその機能的ホモログ、例えば機能的断片を示す。特定の実施形態によると、「ＳＩＲＰα」という用語は、ＳＩＲＰαポリペプチドの機能的ホモログを示す。特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαは、ヒトＳＩＲＰαである。特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαタンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１０３５１１１、ＮＰ＿００１０３５１１２、ＮＰ＿００１３１７６５７、またはＮＰ＿５４２９７０で提供されているものなどのヒトタンパク質を示す。
【０１８８】
特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号６９を含む。
【０１８９】
特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号６９からなる。
【０１９０】
本願明細書で使用するように、「ＳＩＲＰＡ遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＳＩＲＰ１遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含むＳＩＲＰαポリペプチドの一部であって、全長ＳＩＲＰαがＣＤ４７に結合する活性を少なくとも維持するものを示す。結合を試験するためのアッセイは当業界で知られており、さらに前述および後述した。
【０１９１】
特定の実施形態によると、ＣＤ４７タンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１７６８またはＮＰ＿９４２０８８で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０１９２】
特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαのＣＤ４７に対する結合は、ＳＰＲによって決定したＫｄが、０．１～１００μＭ、０．１～１０μＭ、１～１０μＭ、０．１～５μＭ、または１～２μＭであり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０１９３】
特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαは、当該ＳＩＲＰαの細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。
【０１９４】
特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号７１を含む。
【０１９５】
特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号７１からなる。
【０１９６】
「ＳＩＲＰα」という用語には、所望の活性（即ち、ＣＤ４７への結合）を示す機能的ホモログ（天然の、または合成／組換えで作製されたもの）も包含される。そのようなホモログは、例えば、配列番号６９または７１のポリペプチドと、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、

少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一もしくは相同であり得るか、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列（本明細書でさらに後述する）と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一であり得る。

【０１９７】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαポリペプチドは保存性および非保存性アミノ酸置換を含み得る。このような置換は公知であり、例えば、Weiskopf K et al. Science. (2013); 341(6141):88-91に開示されており、その内容は本参照をもって本願に完全に組み込まれるものとする。

【０１９８】

特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変異は、配列番号７１に示したＳＩＲＰαアミノ酸配列に対応するＬ４、Ｖ６、Ａ２１、Ａ２７、Ｉ３１、Ｅ４７、Ｋ５３、Ｅ５４、Ｈ５６、Ｖ６３、Ｌ６６、Ｋ６８、Ｖ９２およびＦ９６から選ばれたアミノ酸残基に位置する。

【０１９９】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は、配列番号７１に示したＳＩＲＰαアミノ酸配列に対応するＬ４、Ａ２７、Ｅ４７およびＶ９２からなる群より選ばれるアミノ酸残基に変異を有する。

【０２００】

特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変異は、配列番号７１に示したＳＩＲＰαアミノ酸配列に対応するＬ４ＶもしくはＬ４Ｉ、Ｖ６ＩもしくはＶ６Ｌ、Ａ２１Ｖ、Ａ２７ＩもしくはＡ２７Ｌ、Ｉ３１ＦもしくはＩ３１Ｔ、Ｅ４７ＶもしくはＥ４７Ｌ、Ｋ５３Ｒ、Ｅ５４Ｑ、Ｈ５６ＰもしくはＨ５６Ｒ、Ｖ６３Ｉ、Ｌ６６ＴもしくはＬ６６Ｇ、Ｋ６８Ｒ、Ｖ９２ＩおよびＦ９４ＬもしくはＦ９４Ｖからなる群より選ばれる。

【０２０１】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は、配列番号７１に示したＳＩＲＰαアミノ酸配列に対応するＬ４Ｉ、Ａ２７Ｉ、Ｅ４７ＶおよびＶ９２Ｉからなる群より選ばれる変異を含む。

【０２０２】

本明細書で使用するように、「配列番号７１に示すＳＩＲＰαアミノ酸配列に対応」、「配列番号７１に対応」という句は、任意の他のＳＩＲＰαアミノ酸配列の対応するアミノ酸残基を含むことを意図する。

【０２０３】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は、配列番号７５を含む。

【０２０４】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号７５からなる。

【０２０５】

保存性アミノ酸および非保存性アミノ酸置換に関するさらなる記載は前述および後述した。

【０２０６】

本発明のいくつかの実施形態のＳＩＲＰアミノ酸配列は、配列番号７１、７３、７５または７７のポリペプチドと、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同

一または相同である、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一であり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０２０７】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号７１のＫ１１７～Ｙ３４３に対応するアミノ酸セグメントを含まない。

【０２０８】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号７１のＫ１１７～Ｙ３４３に対応するアミノ酸残基のいずれも含まない。

【０２０９】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は、１００～５０４アミノ酸、１００～５００アミノ酸、１５０～４５０アミノ酸、２００～４００アミノ酸、２５０～４００アミノ酸、３００～４００アミノ酸、３２０～４２０アミノ酸、３４０～３５０アミノ酸、３００～４００アミノ酸、３４０～４５０アミノ酸、１００～２００アミノ酸、１００～１５０アミノ酸、１００～１２５アミノ酸、１００～１２０アミノ酸、１００～１１９アミノ酸、１０５～１１９アミノ酸、１１０～１１９アミノ酸、１１５～１１９アミノ酸、１０５～１１８アミノ酸、１１０～１１８アミノ酸、１１５～１１８アミノ酸、１０５～１１７アミノ酸、１１０～１１７アミノ酸、１１５～１１７アミノ酸を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０２１０】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号７１、７３、７５および７７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む。

【０２１１】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は、配列番号７１を含む。

【０２１２】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列は配列番号７１からなる。

【０２１３】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号７２、７４、７６または７８と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有し、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０２１４】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号７２と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有し、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０２１５】

特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号

７２を含む。
【０２１６】
特定の実施形態によると、ＳＩＲＰαアミノ酸配列をコードする核酸配列は配列番号７２からなる。
【０２１７】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴである。
【０２１８】
本願明細書において、「ＴＩＧＩＴ（ＩｇドメインおよびＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体）」という用語は、ＴＩＧＩＴ遺伝子（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　２０１６３３）またはその機能的ホモログ、例えば、その機能的断片、のポリペプチドを示す。特定の実施形態によると、「ＴＩＧＩＴ」という用語は、ＴＩＧＩＴポリペプチドの機能的ホモログを示す。特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴはヒトＴＩＧＩＴである。特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴタンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿７７６１６０またはＸＰ＿０２４３０９１５６で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０２１９】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は、配列番号１６０を含む。
【０２２０】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は、配列番号１６０からなる。
【０２２１】
本願明細書で使用するように、「ＴＩＧＩＴ遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＴＩＧＩＴ遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含むＴＩＧＩＴポリペプチドの一部であって、全長ＴＩＧＩＴがＣＤ１５５（ＰＶＲ）に結合する活性を少なくとも維持するものを示す。
【０２２２】
結合を試験するためのアッセイは当業界で知られており、さらに前述および後述した。
【０２２３】
特定の実施形態によると、ＣＤ１５５タンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１１２９２４０、ＮＰ＿００１１２９２４１、ＮＰ＿００１１２９２４２、ＮＰ＿００６４９６で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０２２４】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴのＣＤ１５５に対する結合は、ＳＰＲ分析によって決定したＫｄが０．０１～１００μＭ、０．１～１００μＭ、０．１～１０μＭまたは０．１～５μＭであり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０２２５】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴは、ＴＩＧＩＴの細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。
【０２２６】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は、配列番号１６４を含む。
【０２２７】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は配列番号１６４からなる。
【０２２８】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は、配列番号１３０を含む。
【０２２９】
特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は配列番号１３０からなる。
【０２３０】
「ＴＩＧＩＴ」という用語には、所望の活性（即ち、ＣＤ１５５と結合）を示す機能的ホモログ（天然の、または合成／組換えで作製されたもの）も包含される。そのようなホモログは、例えば、配列番号１６０、１６４、または１３０のポリペプチドと、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％

、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一もしくは相同であり得るか、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列（本明細書でさらに後述する）と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一であり得る。

【０２３１】

特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴポリペプチドは保存性および非保存性アミノ酸置換を含み得る。

【０２３２】

特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変異は、配列番号１６０に示したＴＩＧＩＴアミノ酸配列に対応するＩ４２およびＣ６９から選ばれたアミノ酸残基に位置する。

【０２３３】

特定の実施形態によると、１つまたは複数のアミノ酸変異は、配列番号１６０に示したＴＩＧＩＴアミノ酸配列に対応するＩ４２ＡおよびＣ６９Ｓからなる群より選ばれる。

【０２３４】

本明細書で使用するように、「配列番号１６０に示すＴＩＧＩＴアミノ酸配列に対応」、「配列番号１６０に対応」という句は、任意の他のＴＩＧＩＴアミノ酸配列の対応するアミノ酸残基を含むことを意図する。

【０２３５】

特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は配列番号１３２を含む。

【０２３６】

特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は配列番号１３２からなる。

【０２３７】

保存性アミノ酸および非保存性アミノ酸置換に関するさらなる記載は前述および後述した。

【０２３８】

特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列は、１００～２４４アミノ酸、１００～２００アミノ酸、１００～１５０アミノ酸、１２０～１４０アミノ酸を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０２３９】

特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１３１または１３３と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有する。

【０２４０】

特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１３３を含む。

【０２４１】

特定の実施形態によると、ＴＩＧＩＴアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１３３からなる。

【０２４２】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２である。
【０２４３】
本願明細書において、「ＬＩＬＲＢ２（白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーＢメンバー２）」という用語は、ＬＩＬＲＢ２遺伝子（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　１０２８８）のポリペプチドまたはその機能的ホモログ、例えば、その機能的断片を示す。特定の実施形態によると、「ＬＩＬＲＢ２」という用語は、ＬＩＲＢ２ポリペプチドの機能的ホモログを示す。特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２はヒトＬＩＬＲＢ２である。特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２タンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１０７４４４７、ＮＰ＿００１２６５３３２、ＮＰ＿００１２６５３３３、ＮＰ＿００１２６５３３４、ＮＰ＿００１２６５３３５で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０２４４】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列は、配列番号１６１を含む。
【０２４５】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列は配列番号１６１からなる。
【０２４６】
本願明細書で使用するように、「ＬＩＬＲＢ２遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＬＩＬＲＢ２遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含むＬＩＬＲＢ２ポリペプチドの一部であって、全長ＬＩＬＲＢ２が主要組織適合性分子（ＭＨＣ、例：ＨＬＡ－Ｇ）に結合する活性を少なくとも維持するものを示す。
【０２４７】
結合を試験するためのアッセイは当業界で知られており、さらに前述および後述した。
【０２４８】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２のＭＨＣ（例：ＨＬＡ－Ｇ）に対する結合は、ＳＰＲ分析によって決定したＫｄが０．１ｎＭ～１００μＭ、０．１ｎＭ～１０μＭ、１ｎＭ～１μＭ、１～１００ｎＭ、または１～１０ｎＭであり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０２４９】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２は前記ＬＩＬＲＢ２の細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。
【０２５０】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列は、配列番号１６５を含む。
【０２５１】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列は配列番号１６５からなる。
【０２５２】
ＬＩＬＲＢ２の細胞外ドメインは、Ｄ１～Ｄ４として知られる４個のＩｇ様ドメインを含む。
【０２５３】
よって、特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列は少なくとも１個のＩｇ様ドメインを含む。
【０２５４】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列は少なくとも２個のＩｇ様ドメイン、少なくとも３個のＩｇ様ドメイン、または少なくとも４個のＩｇ様ドメインを含む。
【０２５５】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列は、ＬＩＬＲＢ２のドメインＤ１およびＤ２、ＬＩＬＲＢ２のドメインＤ１、Ｄ２およびＤ３、ＬＩＬＲＢ２のドメインＤ１、Ｄ２およびＤ４、またはＬＩＬＲＢ２のドメインＤ１、Ｄ２、Ｄ３およびＤ４を含

む。
【０２５６】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列は、配列番号１１５または１１７を含む。
【０２５７】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列は、配列番号１１５または１１７からなる。
【０２５８】
「ＬＩＬＲＢ２」という用語は、所望の活性（即ち、ＭＨＣ、例えば、ＨＬＡ－Ｇとの結合）を示す機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）も包含する。このようなホモログは、例えば、配列番号１６１、１６５、１１５または１１７のポリペプチドと、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一または相同であり得るか、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列（本明細書でさらに後述する）と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一であり得る。
【０２５９】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２ポリペプチドは保存性および非保存性アミノ酸置換を含み得る。
【０２６０】
保存性アミノ酸および非保存性アミノ酸置換に関するさらなる記載は前述および後述した。
【０２６１】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列は、１００～５９７アミノ酸、１００～５００アミノ酸、１００～４００アミノ酸、１５０～４００アミノ酸、３００～４００アミノ酸、３５０～４００アミノ酸、１５０～２５０アミノ酸を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０２６２】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列をコードする核酸配列は配列番号１１６または１１８と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有する。
【０２６３】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列をコードする核酸配列は配列番号１１６を含む。
【０２６４】
特定の実施形態によると、ＬＩＬＲＢ２アミノ酸配列をコードする核酸配列は配列番号１１８からなる。
【０２６５】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＳＩＧＬＥＣである。

【０２６６】
本願明細書において、「ＳＩＧＬＥＣ（シアル酸結合免疫グロブリン型レクチン）」という用語は、ＳＩＧＬＥＣ遺伝子または機能的ホモログ、例えば、その機能的断片によってコードされるポリペプチドを示す。特定の実施形態によると、「ＳＩＧＬＥＣ」という用語は、ＳＩＧＬＥＣポリペプチドの機能的ホモログを示す。
【０２６７】
本願明細書で使用するように、「ＳＩＧＬＥＣ遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＳＩＧＬＥＣ遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含むＳＩＧＬＥＣポリペプチドの一部であって、全長ＳＩＧＬＥＣがシアル酸、より具体的には炭水化物含有シアル酸（シアログリカン類）に結合する活性を少なくとも維持するものを意味する。
【０２６８】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣはＳＩＧＬＥＣの細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。
【０２６９】
ＳＩＧＬＥＣの細胞外ドメインはＩｇ様ドメインを含む。
【０２７０】
従って、特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣのアミノ酸配列は少なくとも１つのＩｇ様ドメインを含む。
【０２７１】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣはヒトＳＩＧＬＥＣである。
【０２７２】
ＳＩＧＬＥＣの非限定的な例としては、ＳＩＧＬＥＣ－１、ＳＩＧＬＥＣ－２、ＳＩＧＬＥＣ－３、ＳＩＧＬＥＣ－４、ＳＩＧＬＥＣ－５、ＳＩＧＬＥＣ－６、ＳＩＧＬＥＣ－７、ＳＩＧＬＥＣ－８、ＳＩＧＬＥＣ－９、ＳＩＧＬＥＣ－１０、ＳＩＧＬＥＣ－１１、ＳＩＧＬＥＣ－１２、ＳＩＧＬＥＣ－１３、ＳＩＧＬＥＣ－１４、ＳＩＧＬＥＣ－１５、ＳＩＧＬＥＣ－１６、ＳＩＧＬＥＣ－１７が挙げられる。特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣは、ＳＩＧＬＥＣ－２、ＳＩＧＬＥＣ－３、ＳＩＧＬＥＣ－４、ＳＩＧＬＥＣ－７、ＳＩＧＬＥＣ－９、ＳＩＧＬＥＣ－１０、ＳＩＧＬＥＣ－１２およびＳＩＧＬＥＣ－１５からなる群より選ばれ、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０２７３】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣはＳＩＧＬＥＣ－１０である。
【０２７４】
本願明細書において、「ＳＩＧＬＥＣ－１０（シアル酸結合免疫グロブリン型レクチン１０）」という用語は、ＳＩＧＬＥＣ１０遺伝子（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　８９７９０）のポリペプチドまたはその機能的ホモログ、例えば、機能的断片を示す。特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ１０タンパク質はヒトタンパク質、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１１６４６２７、ＮＰ＿００１１６４６２８、ＮＰ＿００１１６４６２９、ＮＰ＿００１１６４６３０、ＮＰ＿００１１６４６３２で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０２７５】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ１０アミノ酸配列は、配列番号１６２を含む。
【０２７６】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣアミノ酸配列は配列番号１６２からなる。
【０２７７】
本願明細書で使用するように、「ＳＩＧＬＥＣ１０遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＳＩＧＬＥＣ１０遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含むＳＩＧＬＥＣ－１０ポリペプチ

ドの一部であって、全長ＳＩＧＬＥＣ－１０がＣＤ２４および／またはＣＤ５２上に発現されているシアル酸に結合する活性を少なくとも維持するものを示す。

【０２７８】

結合を試験するためのアッセイは当業界で知られており、さらに前述および後述した。

【０２７９】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ１０のＣＤ２４またはＣＤ５２に対する結合は、ＳＰＲによって決定したＫｄが、１ｎＭ～１００μＭ、０．０１～１００μＭ、０．０１～１０μＭ、０．１～１０μＭ、０．１～５μＭ、または０．１～１μＭであり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０２８０】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０は前記ＳＩＧＬＥＣ－１０の細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。

【０２８１】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０のアミノ酸配列は少なくとも１つのＩｇ様ドメインを含む。

【０２８２】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０のアミノ酸配列は少なくとも２つのＩｇ様ドメインを含む。

【０２８３】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列は、配列番号１２９を含む。

【０２８４】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列は、配列番号１２５を含む。

【０２８５】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列は、配列番号１２５からなる。

【０２８６】

「ＳＩＧＬＥＣ－１０」という用語には、所望の活性（即ち、ＣＤ２４および／またはＣＤ５２上に発現されているシアル酸への結合）を示す機能的ホモログ（天然の、または合成／組換えで作製されたもの）も包含される。そのようなホモログは、例えば、配列番号１６２、１２９または１２５のポリペプチドと、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一または相同であり得るか、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列（本明細書でさらに後述する）と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一であり得る。

【０２８７】

特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０ポリペプチドは保存性および非保存性アミノ酸置換を含み得る。

【０２８８】

特定の実施形態によると、１つの変異は、配列番号１６２に示したＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列に対応するアミノ酸残基Ｃ３６に位置する。

【０２８９】
特定の実施形態によると、１つのアミノ酸変異は、配列番号１６２に示したＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列に対応するＣ３６Ｓである。
【０２９０】
「配列番号１６２に示すＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列に対応」、「配列番号１６２に対応」という句は、任意の他のＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列の対応するアミノ酸残基を含むことを意図する。
【０２９１】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列は、配列番号１２７を含む。
【０２９２】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列は、配列番号１２７からなる。
【０２９３】
保存性アミノ酸および非保存性アミノ酸置換に関するさらなる記載は前述および後述した。
【０２９４】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列は、１００～６３９アミノ酸、１００～６００アミノ酸、１００～５５０アミノ酸、１００～３００アミノ酸、１００～２００アミノ酸、１００～１５０アミノ酸含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０２９５】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１２６または１２８と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有する。
【０２９６】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１２８を含む。
【０２９７】
特定の実施形態によると、ＳＩＧＬＥＣ－１０アミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１２８からなる。
【０２９８】
本明細書で使用するように、「ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列」という句は、ＩＩ型膜タンパク質の本来のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能なＩＩ型膜タンパク質の連続したアミノ酸配列を示す。
【０２９９】
特定の実施形態によると、このようなアミノ酸配列は、ＩＩ型膜タンパク質の細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。
【０３００】
本明細書で使用するように、「ＩＩ型膜タンパク質」という句は、Ｃ末端細胞外ドメインを有する膜貫通タンパク質を示す。
【０３０１】
このようなＩＩ型膜タンパク質の非限定的な例には、４－１ＢＢＬ、ＦａｓＬ、ＴＲＡＩＬ、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ２７Ｌ、ＣＤ３０Ｌ、ＲＡＮＫＬ、ＴＷＥＡＫ、ＡＰＲＩＬ、ＢＡＦＦ、ＬＩＧＨＴ、ＶＥＧＩ、ＧＩＴＲＬ、ＥＤＡｌ／２、リンホトキシン・アルファおよびリンホトキシン・ベータが含ま

れる。
【０３０２】
特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質は、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＬＩＧＨＴおよびＧＩＴＲＬからなる群より選ばれる。
【０３０３】
特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質は免疫調節因子である。
【０３０４】
このような免疫調節因子としては、４－１ＢＢＬ、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ２７ＬおよびＣＤ３０Ｌが挙げられるが、これらに限定されるものではない。
【０３０５】
特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質は単一のＩＩ型膜タンパク質を含む。
【０３０６】
特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質は少なくとも１種のＩＩ型膜タンパク質を含む。
【０３０７】
特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質は少なくとも２種のＩＩ型膜タンパク質を含む。
【０３０８】
特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬである。
【０３０９】
本明細書において使用する場合、「４－１ＢＢＬ（別名ＣＤ１３７ＬおよびＴＮＦＳＦ９）」という用語は、ＴＮＦＳＦ９遺伝子（ＧｅｎｅＩＤ：８７４４）のポリペプチドまたはその機能的ホモログ、例えば機能的断片を示す。特定の実施形態によると、「４－１ＢＢＬ」という用語は、４－１ＢＢＬポリペプチドの機能的ホモログを示す。特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬは、ヒト４－１ＢＢＬである。特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬタンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００３８０２で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０３１０】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は配列番号４７を含む。
【０３１１】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は配列番号４７からなる。
【０３１２】
本願明細書で使用するように、「ＴＮＦＳＦ９遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＴＮＦＳＦ９遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含む４－１ＢＢＬポリペプチドの一部であって、全長４－１ＢＢＬの活性の内の少なくとも１種、例えば、（ｉ）４－１ＢＢの結合、（ｉｉ）４－１ＢＢシグナル経路の活性化、（ｉｉｉ）４－１ＢＢを発現する免疫細胞の活性化、（ｉｖ）ホモ三量体の形成、を維持するものを示す。
【０３１３】
特定の実施形態によると、機能的４－１ＢＢＬホモログまたは断片は少なくとも（ｉ）が可能である。
【０３１４】
特定の実施形態によると、機能的４－１ＢＢＬホモログまたは断片は、（ｉ）＋（ｉｉ）、（ｉ）＋（ｉｉｉ）、（ｉ）＋（ｉｖ）、（ｉ）＋（ｉｉ）＋（ｉｉｉ）、（ｉ）＋（ｉｉ）＋（ｉｖ）、（ｉ）＋（ｉｉｉ）＋（ｉｖ）、（ｉｉ）＋（ｉｉｉ）＋（ｉｖ）または（ｉ）＋（ｉｉ）＋（ｉｉｉ）＋（ｉｖ）が可能である。
【０３１５】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢタンパク質は、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１

５５２で提供されるようなヒトタンパク質を示す。

【０３１６】

結合を試験するためのアッセイは、当技術分野で周知であり、本明細書においてさらに前述および後述されている。

【０３１７】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬの４－１ＢＢに対する結合は、ＳＰＲによって決定したＫｄが、約０．１～１０００ｎＭ、０．１～１００ｎＭ、１～１００ｎＭ、または５５．２ｎＭであり、それぞれの可能な態様が特許請求される本発明の別個の実施形態を表す。

【０３１８】

三量体化を決定するための方法は当業界で知られており、ＮＡＴＩＶＥ－ＰＡＧＥ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ　２Ｄゲル、ゲルろ過、ＳＥＣ－ＭＡＬＳ、超遠心分析（ＡＵＣ）、質量分析（ＭＳ）、キャピラリーゲル電気泳動（ＣＧＥ）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０３１９】

本明細書において使用する場合、「活性化する」または「活性化」という用語は、細胞の増殖、成熟化、サイトカインの産生、食作用および／または調節機能もしくはエフェクター機能の誘導をもたらす、免疫細胞（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、貪食細胞）を刺激するプロセスを示す。

【０３２０】

特定の実施形態によると、活性化することは、共刺激することを含む。

【０３２１】

本明細書において使用する場合、「共刺激する」または「共刺激」という用語は、二次抗原非依存性刺激シグナル（例えば４－１ＢＢシグナル）を伝達し、免疫細胞の活性化をもたらすことを示す。

【０３２２】

特定の実施形態によると、活性化することは、阻害シグナル（例えばＰＤＬ１シグナル）を抑制し、免疫細胞の活性化をもたらすことを含む。

【０３２３】

刺激シグナルまたは阻害シグナルのシグナル伝達を決定する方法は、当技術分野で周知であり、続く実施例の項にも開示されている。例えば、ＢｉａＣｏｒｅ、ＨＰＬＣ、またはフローサイトメトリーを使用した結合アッセイ、キナーゼ活性アッセイなどの酵素活性アッセイ、ならびに、シグナル伝達カスケードに関与する分子の、例えば、ＰＣＲ、ウエスタンブロット、免疫沈降、および免疫組織化学的検査を使用した発現の検出を含むが、これらに限定されない。これに加えて、またはこの代わりに、（共刺激性または阻害性の）シグナルの伝達を決定することで、免疫細胞の活性化または機能を評価することができる。免疫細胞の活性化または機能を評価する方法は、当技術分野で周知であり、ＣＦＳＥ染色、ＭＴＳ、アラマーブルー（Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ）、ＢＲＤＵおよびチミジンの組み込みなどの増殖アッセイ、ＣＦＳＥ染色、クロム遊離、カルセインＡＭ（Ｃａｌｃｉｎ　ＡＭ）などの細胞傷害性アッセイ、細胞内サイトカイン染色、ＥＬＩＳＰＯＴおよびＥＬＩＳＡなどのサイトカイン分泌アッセイ、フローサイトメトリーを使用したＣＤ２５、ＣＤ６９、ＣＤ１３７、ＣＤ１０７ａ、ＰＤ１、およびＣＤ６２Ｌなどの活性化マーカーの発現を含むが、これらに限定されない。

【０３２４】

特定の実施形態によると、シグナル伝達活性またはその活性化の決定は、本明細書でさらに後述するように、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏで、例えば混合リンパ球反応（ＭＬＲ）によって実施することができる。

【０３２５】

同じ培養条件の場合、シグナル伝達活性または免疫細胞の活性化もしくは機能は、概して、同じ種の細胞であって、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードするポリヌクレオ

チド、もしくはヘテロダイマーをコードする宿主細胞と接触させていない細胞、または対照とも呼ばれる、ビヒクル対照と接触させた細胞におけるシグナル伝達、活性化、または機能との比較として表される。

【０３２６】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬは、前記４－１ＢＢＬの細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。

【０３２７】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９を含む。

【０３２８】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９からなる。

【０３２９】

「４－１ＢＢＬ」という用語には、（上記で定義した）所望の活性を示す機能的ホモログ（天然の、または合成／組換えで作製されたもの）も包含される。そのようなホモログは、例えば、配列番号４７または４９のポリペプチドと、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一もしくは相同であり得るか、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列（本明細書でさらに後述する）と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一であり得る。

【０３３０】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬポリペプチドは、本明細書でさらに前述および後述するように、保存的アミノ酸置換を含み得る。

【０３３１】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９に対応するアミノ酸セグメントＡ１～Ｖ６、Ａ１～Ｇ１４またはＡ１～Ｅ２３を含まない。

【０３３２】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９に対応するＡ１～Ｖ６、Ａ１～Ｇ１４またはＡ１～Ｅ２３のアミノ酸残基のいずれも含まない。

【０３３３】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９に対応するアミノ酸セグメントＧ１９８～Ｅ２０５を含まない。

【０３３４】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９に対応するＧ１９８～Ｅ２０５のアミノ酸残基のいずれも含まない。

【０３３５】

本明細書で使用するように、「配列番号４９に対応」という句は、任意の他の４－１ＢＢＬアミノ酸配列の対応するアミノ酸残基を含むことを意図する。

【０３３６】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、１００～２５４アミノ酸、１５０～２５０アミノ酸、１００～２５０アミノ酸、１５０～２２０アミノ酸、１８０～２２０アミノ酸、１８０～２１０アミノ酸、１８５～２０５アミノ酸、１８５～２００アミノ酸、１８５～１９９アミノ酸、１７０～１９７アミノ酸、１７０～１８２アミノ酸、１９０～２１０アミノ酸を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０３３７】
本発明のいくつかの実施形態の４－１ＢＢＬは、配列番号４９、５１、５３、５５８、５７、５９、６１、６３または６５のポリペプチドと、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一または相同である、あるいはそれをコードするポリヌクレオチド配列と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有し、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０３３８】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３および６５からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む。
【０３３９】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３および６５からなる群より選ばれるアミノ酸配列からなる。
【０３４０】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４および６６と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一であり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０３４１】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４および６６からなる群より選ばれる核酸配列を含む。
【０３４２】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４および６６からなる群より選ばれる核酸配列からなる。
【０３４３】
特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌである。
【０３４４】
本願明細書において、「ＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４としても知られる）」という用語は、ＣＤ４０ＬＧ遺伝子（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　９５９）のポリペプチドまたはその機能的ホモログ、例えば機能的断片を示す。特定の実施形態によると、「ＣＤ４０Ｌ」という用語は、ＣＤ４０Ｌポリペプチドの機能的ホモログを指す。特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌは、ヒトＣＤ４０Ｌである。特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌタンパク質はヒトタンパク質を示し、ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿０００００６５で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０３４５】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１６３を含む。

【０３４６】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１６３からなる。
【０３４７】
本願明細書で使用するように、「ＣＤ４０ＬＧ遺伝子のポリペプチドの機能的ホモログ」または「ＣＤ４０ＬＧ遺伝子のポリペプチドの機能的断片」という句は、ポリペプチド、機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）および／または保存性および非保存性アミノ酸置換を含むＣＤ４０Ｌポリペプチドの一部であって、全長ＣＤ４０Ｌの活性の内の少なくとも１種、例えば、（ｉ）ＣＤ４０の結合、（ｉｉ）ＣＤ４０シグナル経路の活性化、（ｉｉｉ）ＣＤ４０を発現する免疫細胞の活性化、（ｉｖ）ホモ三量体の形成、を維持するものを示す。
【０３４８】
特定の実施形態によると、機能的ＣＤ４０Ｌホモログまたは断片は少なくとも（ｉ）が可能である。
【０３４９】
特定の実施形態によると機能的ＣＤ４０Ｌホモログまたは断片は、（ｉ）＋（ｉｉ）、（ｉ）＋（ｉｉｉ）、（ｉ）＋（ｉｖ）、（ｉ）＋（ｉｉ）＋（ｉｉｉ）、（ｉ）＋（ｉｉ）＋（ｉｖ）、（ｉ）＋（ｉｉｉ）＋（ｉｖ）、（ｉｉ）＋（ｉｉｉ）＋（ｉｖ）または（ｉ）＋（ｉｉ）＋（ｉｉｉ）＋（ｉｖ）が可能である。
【０３５０】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０タンパク質はＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿００１２４１、ＮＰ＿００１２８９６８２、ＮＰ＿００１３０９３５０、ＮＰ＿００１３０９３５１、ＮＰ＿６９０５９３で提供されるようなヒトタンパク質を示す。
【０３５１】
結合、三量体化、活性化、共刺激およびシグナル伝達を試験するためのアッセイは、当技術分野で周知であり、本明細書においてさらに前述および後述されている。
【０３５２】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０ＬのＣＤ４０に対する結合は、ＳＰＲによって決定したＫｄが、約０．１～１０００ｎＭ、０．１～１００ｎＭ、１～１００ｎＭ、または１～５ｎＭであり、それぞれの可能な態様が、特許請求される本発明の別個の実施形態を表す。
【０３５３】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌは、前記ＣＤ４０Ｌの細胞外ドメインまたはその機能的断片を含む。
【０３５４】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１２２を含む。
【０３５５】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１２２からなる。
【０３５６】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１２３を含む。
【０３５７】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１２３からなる。
【０３５８】
「ＣＤ４０Ｌ」という用語は、（上で定義した）所望の活性を示す機能的ホモログ（天然に存在するものまたは合成／組換えで作製されたもの）を包含する。このようなホモログは、例えば、配列番号１６３、１２２または１２３のポリペプチドと、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一ま

たは相同であり得るか、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列（さらに後述する）と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一であり得る。

【０３５９】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌポリペプチドは、さらに前述および後述する、保存性アミノ酸置換を含み得る。

【０３６０】

特定の実施形態によると、１つの変異は配列番号１６３に示したＣＤ４０Ｌアミノ酸配列に対応するアミノ酸残基Ｃ１９４に位置する。

【０３６１】

特定の実施形態によると、１つの変異は、配列番号１６３に示したＣＤ４０Ｌアミノ酸配列に対応するＣ１９４Ｓである。

【０３６２】

本明細書で使用するように、「配列番号１６３に示したＣＤ４０Ｌアミノ酸配列に対応」または「配列番号１６３に対応」という句は、任意の他のＣＤ４０Ｌアミノ酸配列の対応するアミノ酸残基を含むことを意図する。

【０３６３】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１１９を含む。

【０３６４】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は配列番号１１９からなる。

【０３６５】

保存性アミノ酸および非保存性アミノ酸置換に関するさらなる記載は前述および後述した。

【０３６６】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、１００～２６１アミノ酸、１００～２２０アミノ酸、１００～２００アミノ酸、１２０～１６０アミノ酸を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０３６７】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１２０または１２４と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有する。

【０３６８】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列をコードする核酸配列は配列番号１２０を含む。

【０３６９】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列をコードする核酸配列は配列番号１２０からなる。

【０３７０】

特定の実施形態によると、本願で開示したヘテロダイマーに含まれるＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は、ＩＩ型膜タンパク質（例えば、４－１ＢＢＬ、ＣＤ４０Ｌ）のアミノ酸配列の３つの繰り返し配列を含む。

【０３７１】

特定の実施形態によると、３つの繰り返し配列のそれぞれがＩＩ型膜タンパク質の本来のリガンドまたは受容体に少なくとも結合可能である。

【０３７２】

特定の実施形態によると、３つの繰り返し配列は同一のＩＩ型膜タンパク質（例えば、４－１ＢＢＬ、ＣＤ４０Ｌ）のアミノ酸配列を有する。

【０３７３】

他の特定の実施形態によると、３つの繰り返し配列は別個である、即ち、異なるＩＩ型膜タンパク質（例えば、４－１ＢＢＬ、ＣＤ４０Ｌ）のアミノ酸配列を有する。

【０３７４】

他の特定の実施形態によると、３つの繰り返し配列の内の２つが同一のＩＩ型膜タンパク質（例えば、４－１ＢＢＬ、ＣＤ４０Ｌ）のアミノ酸配列を有する。

【０３７５】

特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は、前記ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列の前記３つの繰り返し配列のそれぞれの間にリンカーを含まない。

【０３７６】

他の特定の実施形態によると、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列は、前記ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列の前記３つの繰り返し配列のそれぞれの間にリンカーを含む。当業界で公知の任意のリンカーを本発明の特定の実施形態と共に使用することができる。使用可能なリンカーの非限定的な例の詳細は後述した。

【０３７７】

特定の実施形態によると、リンカーは（ＧＧＧＧＳ）×２＋ＧＧＧＧ（配列番号９６）リンカーである。

【０３７８】

特定の実施形態によると、リンカーは、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号９７）リンカーである。

【０３７９】

特定の実施形態によると、リンカーはＧＧＧＧＳ×３（配列番号１３４）リンカーである。

【０３８０】

従って、例えば、特定の実施形態によると、ヘテロダイマーに含まれる４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、４－１ＢＢＬアミノ酸配列の３つの繰り返しを含む。

【０３８１】

特定の実施形態によると、３つの繰り返し配列のそれぞれが以下の少なくとも１つを実施可能である（ｉ）４－１ＢＢの結合、（ｉｉ）４－１ＢＢシグナル伝達経路の活性化、（ｉｉｉ）４－１ＢＢを発現する免疫細胞の活性化、（ｉｖ）ホモ三量体の形成。

【０３８２】

特定の実施形態によると、繰り返される配列は、本明細書で定義した４－１ＢＢＬのいずれでもよい。

【０３８３】

特定の実施形態によると、少なくとも１つの繰り返し配列は、本明細書に開示した４－１ＢＢＬアミノ酸配列を含む。

【０３８４】

特定の実施形態によると、少なくとも１つの繰り返し配列は、本明細書に開示した４－１ＢＢＬアミノ酸配列からなる。

【０３８５】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号５１を含むアミノ酸配列の３つの繰り返しを含む。

【０３８６】

特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号５１からなるアミノ酸配列の３つの繰り返しを含む。

【０３８７】
よって、特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号６７と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０３８８】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号６７を含む。
【０３８９】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列は、配列番号６７からなる。
【０３９０】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号６８と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有する。
【０３９１】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬ核酸配列は配列番号６８を含む。
【０３９２】
特定の実施形態によると、４－１ＢＢＬ核酸配列は配列番号６８からなる。
【０３９３】
他の例として、特定の実施形態によると、本願で開示したヘテロダイマーに含まれるＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列の３つの繰り返し配列を含む。
【０３９４】
特定の実施形態によると、３つの繰り返し配列のそれぞれが以下の少なくとも１つを実施可能である：（ｉ）ＣＤ４０の結合、（ｉｉ）ＣＤ４０シグナル伝達経路の活性化、（ｉｉｉ）ＣＤ４０を発現する免疫細胞の活性化、（ｉｖ）ホモ三量体の形成。
【０３９５】
特定の実施形態によると、繰り返される配列は、本明細書で定義したＣＤ４０Ｌのいずれでもよい。
【０３９６】
特定の実施形態によると、少なくとも１つの繰り返し配列は、本明細書に開示したＣＤ４０Ｌアミノ酸配列を含む。
【０３９７】
特定の実施形態によると、少なくとも１つの繰り返し配列は、本明細書に開示したＣＤ４０Ｌアミノ酸配列からなる。
【０３９８】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１１９を含むアミノ酸配列の３つの繰り返しを含む。
【０３９９】
特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１１９からなるアミノ酸配列の３つの繰り返しを含む。
【０４００】
よって、特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１２１と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少

なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４０１】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１２１を含む。

【０４０２】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列は、配列番号１２１からなる。

【０４０３】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号１６６と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有する。

【０４０４】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌ核酸配列は配列番号１６６を含む。

【０４０５】

特定の実施形態によると、ＣＤ４０Ｌ核酸配列は配列番号１６６からなる。

【０４０６】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＰＤ１であり、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４０７】

特定の実施形態によると、第１のモノマーのＰＤ１のアミノ酸と、第２のモノマーのＰＤ１のアミノ酸とは同一である。

【０４０８】

特定の実施形態によると、第１のモノマーのＰＤ１のアミノ酸と、第２のモノマーのＰＤ１のアミノ酸とは別個である（即ち、異なる）。

【０４０９】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および８１、または配列番号７９および８３と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４１０】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および８１または配列番号７９および８３を含む。

【０４１１】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および８１または配列番号７９および８３からなる。

【０４１２】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２であり、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４１３】
特定の実施形態によると、第１のモノマーのＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列と、第２のモノマーのＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列とは同一である。
【０４１４】
特定の実施形態によると、第１のモノマーのＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列と、第２のモノマーのＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列とは別個である（即ち、異なる）。
【０４１５】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４２および１３８、または配列番号１４４および１４０と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０４１６】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４２および１３８、または配列番号１４４および１４０を含む。
【０４１７】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４２および１３８、または配列番号１４４および１４０からなる。
【０４１８】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２であり、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、そしてヘテロダイマーは、ＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【０４１９】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４８および１３８と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０４２０】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４８および１３８を含む。
【０４２１】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４８および１３８からなる。
【０４２２】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＰＤ１およびＳＩＲＰαからなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【０４２３】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号８５および８１、配列番号８９および９１、または配列番号８５および８３と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４２４】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号８５および８１、配列番号８９および９１、または配列番号８５および８３を含む。
【０４２５】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号８５および８１、配列番号８９および９１、または配列番号８５および８３からなる。
【０４２６】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＰＤ１およびＳＩＲＰαからなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、そしてヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列を含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【０４２７】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４６および８１と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０４２８】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４６および８１を含む。
【０４２９】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４６および８１からなる。
【０４３０】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＳＩＲＰαからなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【０４３１】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号８５および１３８、または配列番号８５および１４０と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０４３２】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号８５および１３８、または配列番号８５および１４０を含む。
【０４３３】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号８５および１３８、または配列番号８５および１４０からなる。
【０４３４】
特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＳＩＲＰαからなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、そしてヘテロダイマーは、ＳＩＲＰαのアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。
【０４３５】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４６および１３８と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少な

くとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４３６】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４６および１３８を含む。

【０４３７】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１４６および１３８からなる。

【０４３８】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４３９】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１３８と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４４０】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１３８を含む。

【０４４１】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１３８からなる。

【０４４２】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＬＩＬＲＢ２およびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、そしてヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＬＩＬＲＢ２のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４４３】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１３８と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４４４】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１３８を含む。

【０４４５】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１３８からなる。

【０４４６】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＳＩＧＬＥＣおよびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＳＩＧＬＥＣのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４４７】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１５０と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なく

とも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４４８】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１５０を含む。

【０４４９】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１５０からなる。

【０４５０】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＳＩＧＬＥＣおよびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、そしてヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＳＩＧＬＥＣのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４５１】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１５０と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４５２】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１５０を含む。

【０４５３】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１５０からなる。

【０４５４】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質は、ＴＩＧＩＴおよびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＴＩＧＩＴのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４５５】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１５２と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４５６】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１５２を含む。

【０４５７】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号７９および１５２からなる。

【０４５８】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴおよびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、そしてヘテロダイマーは、ＰＤ１のアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＴＩＧＩＴのアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４５９】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１５２と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９

３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４６０】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１５２を含む。

【０４６１】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５４および１５２からなる。

【０４６２】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴおよびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質は４－１ＢＢＬであり、そしてヘテロダイマーは、ＴＩＧＩＴのアミノ酸配列と４－１ＢＢＬのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４６３】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５６および８１と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４６４】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５６および８１を含む。

【０４６５】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５６および８１からなる。

【０４６６】

特定の実施形態によると、Ｉ型膜タンパク質はＴＩＧＩＴおよびＰＤ１からなる群より選ばれ、ＩＩ型膜タンパク質はＣＤ４０Ｌであり、そしてヘテロダイマーは、ＴＩＧＩＴのアミノ酸配列とＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列とを含む第１のモノマー、およびＰＤ１のアミノ酸配列を含む第２のモノマーを含む。

【０４６７】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、配列番号１５８および８１と、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０４６８】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは配列番号１５８および８１を含む。

【０４６９】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマー配列番号１５８および８１からなる。

【０４７０】

特定の実施形態によると、本願で開示するヘテロダイマーは、可溶性である（即ち、合成または天然の表面に固定化されていない）。

【０４７１】

特定の実施形態によると、本願で開示するヘテロダイマーは、合成または天然の表面に固定化されている。

【０４７２】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーに含まれる部分のそれぞれは、部分同士を隔てるように、例えば、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列とダイマー化部分との間、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列とダイマー化部分との間、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列の３つの繰り返しの間に、リンカーを含んでもよい。

【０４７３】
他の特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列とダイマー化部分との間にリンカーを含まない。
【０４７４】
他の特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、ＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列とダイマー化部分との間にリンカーを含まない。
【０４７５】
当技術分野で公知の任意のリンカーを、本発明の特定の実施形態と共に使用することができる。
【０４７６】
特定の実施形態によると、リンカーは、天然のマルチドメインタンパク質に由来し得る、または、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれているChichili et al., (2013), Protein Sci. 22 (2): 153-167や、Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357-1369に記載されている実験的リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、全内容が参照により本明細書に組み込まれているChen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357-1369およびCrasto et al (2000), Protein Eng. 13 (5):309-312に記載されているものといった、リンカー設計データベースおよびコンピュータプログラムを使用して設計され得る。
【０４７７】
特定の実施形態によると、リンカーは、ＰＥＧなどの合成リンカーである。
【０４７８】
特定の実施形態によると、リンカーは、機能的であり得る。例えば、限定されるものではないが、リンカーは、ＰＤ１－４－１ＢＢＬ融合タンパク質のフォールディングおよび／または安定性を改善し、発現を改善し、薬物動態を改善し、さらに／あるいは生理活性を改善するように機能し得る。別の例において、リンカーは、ＰＤ１－４－１ＢＢＬ融合タンパク質の標的を特定の細胞型または位置に定めるように機能し得る。
【０４７９】
特定の実施形態によると、リンカーは、ポリペプチドである。
【０４８０】
ポリペプチドリンカーの非限定的な例としては、次の配列を有するリンカーが挙げられる：ＬＥ、ＧＧＧＧＳ（配列番号９９）、$(GGGGS)_n$（ｎ＝１～４）（配列番号９８）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号９７）、（ＧＧＧＧＳ）×２（配列番号１００）、（ＧＧＧＧＳ）×２＋ＧＧＧＧ（配列番号９６）、（ＧＧＧＧＳ）×３（配列番号１３４）、（ＧＧＧＧＳ）×４（配列番号１３５）、$(Gly)_8$（配列番号１３６）、$(Gly)_6$（配列番号１３７）、$(EAAAK)_n$（ｎ＝１～３）（配列番号１０１）、Ａ$(EAAAK)_n$Ａ（ｎ＝２～５（配列番号１０２）、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡ（配列番号１０３）、Ａ$(EAAAK)_4$ＡＬＥＡ（ＥＡＡＡＫ）４Ａ（配列番号１０４）、ＰＡＰＡＰ（配列番号１０５）、ＫＥＳＧＳＶＳＳＥＱＬＡＱＦＲＳＬＤ（配列番号１０６）、ＥＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳＴ（配列番号１０７）、ＧＳＡＧＳＡＡＧＳＧＥＦ（配列番号１０８）、および$(XP)_n$、Ｘは任意のアミノ酸、例えば、Ａｌａ、Ｌｙｓ、またはＧｌｕである。
【０４８１】
特定の実施形態によると、リンカーは下記からなる群より選ばれる：ＧＧＧＳ（配列番号９９）、$(GGGGS)_n$（ｎ＝１～４）（配列番号９８）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号９７）、（ＧＧＧＧＳ）×２（配列番号１００）、（ＧＧＧＧＳ）×２＋ＧＧＧＧ（配列番号９６）、（ＧＧＧＧＳ）×２（配列番号１００）、（ＧＧＧＧＳ）×３（配列番号１３４）および（ＧＧＧＧＳ）×４（配列番号１３５）。
【０４８２】
特定の実施形態によると、リンカーは下記からなる群より選ばれる：ＧＧＧＧＳ（配列番号９９）、$(GGGGS)_n$（ｎ＝１～４）（配列番号９８）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（

配列番号９７）、（ＧＧＧＧＳ）×２（配列番号１００）、（ＧＧＧＧＳ）×２＋ＧＧＧＧ（配列番号９６）。

【０４８３】

特定の実施形態によると、リンカーは（ＧＧＧＧＳ）×２＋ＧＧＧＧ（配列番号９６）である。

【０４８４】

特定の実施形態によると、リンカーは（ＧＧＧＧＳ）×２（配列番号１００）である。

【０４８５】

特定の実施形態によると、リンカーは（ＧＧＧＧＳ）×３（配列番号１３４）である。

【０４８６】

特定の実施形態によると、リンカーは（ＧＧＧＧＳ）×４（配列番号１３５）である。

【０４８７】

特定の実施形態によると、リンカーは１～６アミノ酸長である。

【０４８８】

特定の実施形態によると、リンカーは、グリシンおよび／または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１００％がグリシンおよびセリンである）。

【０４８９】

特定の実施形態によると、リンカーは１アミノ酸リンカーである。

【０４９０】

本発明のいくつかの実施形態では、１アミノ酸リンカーはグリシンである。

【０４９１】

他の特定の実施形態によると、リンカーは、抗体またはその断片のＦｃドメインもしくはヒンジ領域ではない。

【０４９２】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーの産生率は、Ｉ型膜タンパク質およびＩＩ型膜タンパク質の同じアミノ酸配列を有するホモダイマーまたは同じアミノ酸配列を有する単離モノマーと比べて、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも３倍、少なくとも５倍である。

【０４９３】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーの凝集体の量は、Ｉ型膜タンパク質およびＩＩ型膜タンパク質の同じアミノ酸配列を有するホモダイマーまたは同じアミノ酸配列を有する単離モノマーの凝集体の量と比べて、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または少なくとも９５％少ない。

【０４９４】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーの安定性は、Ｉ型膜タンパク質およびＩＩ型膜タンパク質の同じアミノ酸配列を有するホモダイマーまたは同じアミノ酸配列を有する単離モノマーと比べて、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも３倍、少なくとも５倍高い。

【０４９５】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーの活性は、Ｉ型膜タンパク質およびＩＩ型膜タンパク質の同じアミノ酸配列を有するホモダイマーまたは同じアミノ酸配列を有する単離モノマーの活性と比べて、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも３倍、少なくとも５倍高い。

【０４９６】

特定の実施形態によると、ヘテロダイマーの安全性は、Ｉ型膜タンパク質およびＩＩ型膜タンパク質の同じアミノ酸配列を有するホモダイマーまたは同じアミノ酸配列を有する単離モノマーの安定性と比べて、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも２．

５倍、少なくとも３倍、少なくとも５倍高い。

【０４９７】

本発明のいくつかの実施形態のヘテロダイマーは、免疫調節因子であるＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列および／またはＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列を含むことから、ヘテロダイマーは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｅｘ ｖｉｖｏおよび／またはｉｎ ｖｉｖｏで、免疫細胞を調節する方法に使用してもよい。

【０４９８】

よって、本発明の一態様によると、免疫細胞の活性を調節する方法であって、ヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、またはそれを含む宿主細胞の存在下、ｉｎ ｖｉｔｒｏで免疫細胞を活性化することを含む方法が提供される。

【０４９９】

他の特定の実施形態によると、調節は阻害である。

【０５００】

特定の実施形態によると、調節は活性化である。

【０５０１】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、当該Ｉ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体（例えば、４－１ＢＢ）を発現する。

【０５０２】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む。

【０５０３】

本明細書において使用する場合、「末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）」という用語は、単核の血液細胞を指し、リンパ球、単球、および樹状細胞（ＤＣ）を含む。

【０５０４】

特定の実施形態によると、ＰＢＭＣは、樹状細胞（ＤＣ）、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫＴ細胞からなる群より選ばれる。

【０５０５】

特定の実施形態によると、ＰＢＭＣは、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、およびＮＫＴ細胞を含む。

【０５０６】

ＰＢＭＣを得る方法は、対象から全血を採血し、抗凝固薬（例えば、ヘパリンまたはクエン酸塩）を含む容器に収集すること、およびアフェレーシスなど、当技術分野で周知である。続いて、特定の実施形態によると、少なくとも１種類のＰＢＭＣを末梢血から精製する。全血からＰＢＭＣを精製するためには、白血球アフェレーシス、沈降、密度勾配遠心分離（例えば、ｆｉｃｏｌｌ）、遠心溶出法、分画、例えば赤血球の化学的溶解（例えば、ＡＣＫによるもの）、細胞表面マーカーを使用した特定の細胞型の選択（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、Ｃｅｌｌｐｒｏ社、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｍａｇｎｅｔｉｃｓ社、またはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社等から市販されている、ＦＡＣＳソーターまたは磁気細胞分離技術の使用）、および特定の細胞型を除去する方法であって、特異的な抗体を用いる根絶（例えば死滅）に基づく方法や、（例えば、磁気細胞分離技術、ＦＡＣＳソーターおよび／または捕捉ＥＬＩＳＡ標識化を使用する）負の選択による親和性に基づく精製といった、当業者に公知のいくつかの方法および試薬がある。そのような方法は、例えば、THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor)、およびFLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)に記載されている。

【０５０７】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、腫瘍浸潤リンパ球を含む。

【０５０８】

本明細書において使用する場合、「腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）」という用語は、血流から離れて腫瘍中に遊走した単核白血球を示す。

【０５０９】
特定の実施形態によると、ＴＩＬは、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、および単球からなる群より選ばれる。
【０５１０】
ＴＩＬを得るための方法は、例えば生検または剖検によって対象から腫瘍試料を得て、その単細胞懸濁液を調製する方法のように、当技術分野で周知である。単細胞懸濁液は、任意の好適な様式、例えば、機械的に（例えば、ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ（商標）Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｏｒ（カリフォルニア州、オーバーンのＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社製）を使用した、腫瘍の脱凝集）または酵素的に（例えば、コラゲナーゼまたはＤＮａｓｅで）得ることができる。続いて、この細胞懸濁液から、少なくとも１種類のＴＩＬが精製され得る。所望の種類のＴＩＬを精製するためには、細胞表面マーカーを使用した特定の細胞型の選択（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、Ｃｅｌｌｐｒｏ社、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｍａｇｎｅｔｉｃｓ社、またはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社等から市販されている、ＦＡＣＳソーターまたは磁気細胞分離技術の使用）、および、特定の細胞型を除去する方法であって、特異的な抗体を用いる根絶（例えば死滅）に基づく方法や、（例えば、磁気細胞分離技術、ＦＡＣＳソーターおよび／または捕捉ＥＬＩＳＡ標識化を使用する）負の選択による親和性に基づく精製といった、当業者に公知のいくつかの方法および試薬がある。そのような方法は、例えば、THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D.N. Weir, editor)、およびFLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000)に記載されている。
【０５１１】
特定の実施形態によると、免疫細胞は、食細胞を含む。
【０５１２】
本明細書において使用する場合、「食細胞」という用語は、食作用を実行可能である細胞を指し、プロフェッショナル食細胞およびノンプロフェッショナル食細胞の両方を含む。食作用を分析する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、殺滅アッセイ、フローサイトメトリーおよび／または顕微評価（生細胞の画像化、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、電子顕微鏡）を含む。
【０５１３】
特定の実施形態によると、貪食細胞は、単球、樹状細胞（ＤＣ）、および顆粒球からなる群より選ばれる。
【０５１４】
特定の実施形態によると、食細胞は、顆粒球を含む。
【０５１５】
特定の実施形態によると、食細胞は、単球を含む。
【０５１６】
特定の実施形態によると、免疫細胞は、単球を含む。
【０５１７】
特定の実施形態によると、「単球」という用語は、組織内に存在する循環単球およびマクロファージ（別称、単核食細胞）の両方を示す。
【０５１８】
特定の実施形態によると、単球は、マクロファージを含む。典型的には、マクロファージの細胞表面表現型は、ＣＤ１４、ＣＤ４０、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ６４、Ｆ４／８０（マウス）／ＥＭＲ１（ヒト）、リゾチームＭ、ＭＡＣ－１／ＭＡＣ－３、およびＣＤ６８を含む。
【０５１９】
特定の実施形態によると、単球は、循環単球を含む。典型的には、循環単球の細胞表面表現型は、ＣＤ１４およびＣＤ１６（例えばＣＤ１４＋＋ＣＤ１６－、ＣＤ１４＋ＣＤ１６＋＋、ＣＤ１４＋＋ＣＤ１６＋）を含む。

【０５２０】
特定の実施形態によると、免疫細胞は、ＤＣを含む。
【０５２１】
本明細書において使用する場合、「樹状細胞（ＤＣ）」という用語は、リンパ様または非リンパ様の組織内に見出される、形態学的に同様な細胞型の多様な集団のうちの任意のメンバーを示す。ＤＣは、プロフェッショナル抗原提示細胞のクラスであり、ＨＬＡ制限Ｔ細胞を感作する能力が高い。ＤＣとしては、例えば、形質細胞様樹状細胞、骨髄樹状細胞（未成熟型および成熟型の樹状細胞を含む）、ランゲルハンス細胞、指状嵌入細胞、濾胞樹状細胞が挙げられる。樹状細胞は、機能によって、または表現型によって、特に細胞表面表現型によって認識され得る。これらの細胞は、ベール様の突起を細胞表面に有する特徴的な形態、中レベルから高レベルの表面ＨＬＡクラスＩＩの発現、およびＴ細胞（特にナイーブＴ細胞）に対して抗原提示する能力を特徴とする（Steinman R, et al., Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-196を参照されたい）。典型的には、ＤＣの細胞表面表現型としては、ＣＤｌａ＋、ＣＤ４＋、ＣＤ８６＋、またはＨＬＡ－ＤＲが挙げられる。ＤＣという用語には、未成熟型ＤＣおよび成熟型ＤＣの両方が包含される。
【０５２２】
特定の実施形態によると、免疫細胞は、顆粒球を含む。
【０５２３】
本明細書において使用する場合、「顆粒球」という用語は、細胞質内の顆粒の存在を特徴とする、多形核白血球を示す。
【０５２４】
特定の実施形態によると、顆粒球は、好中球を含む。
【０５２５】
特定の実施形態によると、顆粒球は、マスト細胞を含む。
【０５２６】
特定の実施形態によると、免疫細胞は、Ｔ細胞を含む。
【０５２７】
本明細書において使用する場合、「Ｔ細胞」という用語は、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋のいずれかの表現型を有する、ＣＤ３＋、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）＋の分化型リンパ球を示す。Ｔ細胞は、エフェクターＴ細胞または調節性Ｔ細胞のいずれであってもよい。
【０５２８】
本明細書において使用する場合、「エフェクターＴ細胞」という用語は、例えばサイトカインを生成することによって他の免疫細胞を活性化するもしくは方向付けるＴ細胞、または細胞傷害活性を有するＴ細胞であり、例えば、ＣＤ４＋、Ｔｈ１／Ｔｈ２、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球を示す。
【０５２９】
本明細書において使用する場合、「調節性Ｔ細胞」または「Ｔｒｅｇ」という用語は、エフェクターＴ細胞を含む他のＴ細胞、ならびに自然免疫系細胞の活性化を負に調節するＴ細胞を示す。Ｔｒｅｇ細胞は、エフェクターＴ細胞応答の持続的抑制を特徴とする。特定の実施形態によると、Ｔｒｅｇは、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３＋Ｔ細胞である。
【０５３０】
特定の実施形態によると、Ｔ細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞である。
【０５３１】
他の特定の実施形態によると、Ｔ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞である。
【０５３２】
特定の実施形態によると、Ｔ細胞は、メモリーＴ細胞である。メモリーＴ細胞の非限定的な例としては、ＣＤ３＋／ＣＤ４＋／ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７－の表現型を有するエフェクターメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ３＋／ＣＤ４＋／ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７＋の表現型を有するセントラルメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ３＋／ＣＤ８＋ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７－の表現型を有するエフェクターメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞、およびＣＤ３＋

／ＣＤ８＋ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＣＲ７＋の表現型を有するセントラルメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞が挙げられる。

【０５３３】

特定の実施形態によると、Ｔ細胞は、目的の発現産物をコードする核酸配列が形質導入された、工学的に操作されたＴ細胞を含む。

【０５３４】

特定の実施形態によると、目的の発現産物は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）またはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。

【０５３５】

本明細書において使用する場合、「ＴＣＲをコードする核酸配列が形質導入された」または「ＴＣＲをコードする核酸配列を形質導入する」という表現は、ＭＨＣとの関連で提示される所望の抗原に対して特異性を有するＴ細胞から、可変α－鎖およびβ－鎖をクローニングすることを示す。ＴＣＲを形質導入する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、Nicholson et al. Adv Hematol. 2012; 2012:404081、Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22 (2):85-94)、およびLamers et al, Cancer Gene Therapy (2002) 9, 613-623に開示されている。

【０５３６】

本明細書において使用する場合、「ＣＡＲをコードする核酸配列が形質導入された」または「ＣＡＲをコードする核酸配列を形質導入する」という表現は、抗原認識部分およびＴ細胞活性化部分を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸配列のクローニングを示す。キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、Ｔ細胞シグナル伝達ドメインまたはＴ細胞活性化ドメインに結合した抗体の抗原結合ドメイン（例えば、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ））を含有する、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドである。ＣＡＲを形質導入する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、Davila et al. Oncoimmunology. 2012 Dec 1;1 (9):1577-1583、Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22 (2):85-94)、Maus et al. Blood. 2014 Apr 24;123 (17):2625-35、Porter DL The New England journal of medicine. 2011, 365 (8):725-733、Jackson HJ, Nat Rev Clin Oncol. 2016;13 (6):370-383、およびGloberson-Levin et al. Mol Ther. 2014;22 (5):1029-1038に開示されている。

【０５３７】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、Ｂ細胞を含む。

【０５３８】

本明細書において使用する場合、「Ｂ細胞」という用語は、Ｂ細胞受容体（ＢＣＲ）＋、ＣＤ１９＋、および／またはＢ２２０＋の表現型を有するリンパ球を示す。Ｂ細胞は、特異的抗原に結合し、液性応答を引き起こす能力を特徴とする。

【０５３９】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、ＮＫ細胞を含む。

【０５４０】

本明細書において使用する場合、「ＮＫ細胞」という用語は、ＣＤ１６＋ＣＤ５６＋および／またはＣＤ５７＋ＴＣＲ－の表現型を有する分化型リンパ球を示す。ＮＫは、「自己」ＭＨＣ／ＨＬＡ抗原を発現できない細胞に結合し、特異的な細胞溶解性酵素の活性化によってこの細胞を死滅させる能力、ＮＫ活性化受容体のリガンドを発現する腫瘍細胞または他の罹患細胞を死滅させる能力、および免疫応答を刺激もしくは阻害するサイトカインと呼ばれるタンパク質分子を放出する能力を特徴とする。

【０５４１】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、ＮＫＴ細胞を含む。

【０５４２】

本明細書において使用する場合、「ＮＫＴ細胞」という用語は、セミインバリアントなαβＴ細胞受容体を発現するが、典型的にはＮＫ細胞に関連する種々の分子マーカー（例

えばＮＫ１．１）も発現する、特殊化したＴ細胞集団を示す。ＮＫＴ細胞としては、ＮＫ１．１＋およびＮＫ１．１－、ならびにＣＤ４＋、ＣＤ４－、ＣＤ８＋およびＣＤ８－の細胞が挙げられる。ＮＫＴ細胞のＴＣＲは、ＭＨＣ－Ｉ様分子ＣＤ１ｄによって提示される糖脂質抗原を認識するという点で独特である。ＮＫＴ細胞は、炎症または免疫寛容のいずれかを促進するサイトカインを生成する能力があるため、保護効果を有する場合もあれば、有害効果を有する場合もある。

【０５４３】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、健康な対象から得る。

【０５４４】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、病気（例えば、癌）を患う対象から得る。

【０５４５】

特定の実施形態によると、調節はＩ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する細胞、あるいは外因性の、Ｉ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体（例：ＰＤ－Ｌ１）の存在下で行う。

【０５４６】

特定の実施形態によると、外因性のリガンドまたは受容体活は、可溶性である。

【０５４７】

他の特定の実施形態によると、外因性リガンドまたは受容体は、固体支持体に固定化されている。

【０５４８】

特定の実施形態によると、リガンドまたは受容体を発現する細胞は、病的（罹患）細胞、例えば、癌細胞を含む。

【０５４９】

特定の実施形態によると、調節は、細胞の増殖、成熟化、サイトカインの生成、食作用、および／または免疫細胞の調節機能もしくはエフェクター機能の誘導をもたらす、少なくとも一次活性化シグナル［例えば、抗原提示細胞（ＡＰＣ）における主要組織適合抗原（ＭＨＣ）／ペプチド複合体とＴ細胞受容体（ＴＣＲ）のライゲーション］を伝達することが可能な刺激剤の存在下で行う。特定の実施形態によると、刺激因子剤は、二次共刺激シグナルを伝達することもできる。

【０５５０】

刺激剤の量および刺激剤と免疫細胞との間の比を決定する方法は、十分に当業者の能力の範疇にあるため、本明細書では特定しない。

【０５５１】

刺激剤は、抗原依存的様式または抗原非依存的（即ちポリクローナル）様式で免疫細胞を活性化することができる。

【０５５２】

特定の実施形態によると、刺激剤は、抗原非特異的な刺激因子を含む。

【０５５３】

非特異的な刺激因子は、当業者に公知である。よって、免疫細胞がＴ細胞を含む場合、抗原非特異的な刺激因子の非限定的な例は、これらに限定されるものではないが、抗ＣＤ２８抗体などの共刺激タンパク質と組み合わせた抗ＣＤ３抗体といった、Ｔ細胞表面構造に結合し、Ｔ細胞のポリクローナル刺激を誘導することが可能な薬剤であり得る。他の非限定的な例としては、単独、または抗ＣＤ３との様々な組み合わせにおける、抗ＣＤ２、抗ＣＤ１３７、抗ＣＤ１３４、Ｎｏｔｃｈリガンド（例えばＤｅｌｔａ様１／４）、Ｊａｇｇｅｄ１／２が挙げられる。Ｔ細胞のポリクローナル刺激を誘導し得る他の薬剤としては、マイトジェン、ＰＨＡ、ＰＭＡ－イオノマイシン、ＣＥＢ、およびＣｙｔｏＳｔｉｍ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態によると、抗原非特異的な刺激因子は、抗ＣＤ３抗体および抗ＣＤ２８抗体を含む。特定の実施形態によると、Ｔ細胞刺激因子は、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社から得られる、ＣＤ３ＣＤ２８　ＭＡＣＳｉＢｅａｄｓなどの抗ＣＤ３および抗ＣＤ２

８被覆ビーズを含む。
【０５５４】
特定の実施形態によると、刺激剤は、抗原特異的な刺激因子を含む。
【０５５５】
抗原特異的なＴ細胞刺激因子の非限定的な例としては、抗原を担持した抗原提示細胞［ＡＰＣ、例えば樹状細胞］、およびペプチドを担持した組換えＭＨＣが挙げられる。よって、例えば、Ｔ細胞刺激因子は、所望の抗原（例えば腫瘍抗原）を予め担持しておいた樹状細胞、または所望の抗原をコードするｍＲＮＡをトランスフェクトした樹状細胞であり得る。
【０５５６】
特定の実施形態によると、抗原は、癌抗原である。
【０５５７】
本明細書において使用する場合、「癌抗原」という用語は、非癌性細胞と比較して、癌性細胞によって過剰発現される、または癌性細胞のみによって発現される抗原を示す。癌抗原は、公知の癌抗原、または癌細胞において発生する新たな特異的抗原（即ちネオ抗原）であり得る。
【０５５８】
公知の癌抗原の非限定的な例としては、ＭＡＧＥ－ＡＩ、ＭＡＧＥ－Ａ２、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－ＡＳ、ＭＡＧＥ－Ａ６、ＭＡＧＥ－Ａ７、ＭＡＧＥ－ＡＳ、ＭＡＧＥ－Ａ９、ＭＡＧＥ－ＡＩＯ、ＭＡＧＥ－Ａｌｌ、ＭＡＧＥ－Ａ１２、ＧＡＧＥ－Ｉ、ＧＡＧＥ－２、ＧＡＧＥ－３、ＧＡＧＥ－４、ＧＡＧＥ－５、ＧＡＧＥ－６、ＧＡＧＥ－７、ＧＡＧＥ－８、ＢＡＧＥ－ｌ、ＲＡＧＥ－１、ＬＢ３３／ＭＵＭ－１、ＰＲＡＭＥ、ＮＡＧ、ＭＡＧＥ－Ｘｐ２（ＭＡＧＥ－Ｂ２）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ３（ＭＡＧＥ－Ｂ３）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ４（ＭＡＧＥ－Ｂ４）、ＭＡＧＥ－Ｃｌ／ＣＴ７、ＭＡＧＥ－Ｃ２、ＮＹ－ＥＳ０－１、ＬＡＧＥ－１、ＳＳＸ－１、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－３、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－１およびＸＡＧＥ、メラノサイト分化抗原、ｐ５３、ｒａｓ、ＣＥＡ、ＭＵＣＩ、ＰＭＳＡ、ＰＳＡ、チロシナーゼ、メランＡ、ＭＡＲＴ－Ｉ、ｇｐｌＯＯ、ｇｐ７５、アルファアクチニン－４、Ｂｃｒ－Ａｂｌ融合タンパク質、Ｃａｓｐ－８、ベーターカテニン、ｃｄｃ２７、ｃｄｋ４、ｃｄｋｎ２ａ、ｃｏａ－１、ｄｅｋ－ｃａｎ融合タンパク質、ＥＦ２、ＥＴＶ６－ＡＭＬ１融合タンパク質、ＬＤＬＲ－フコシルトランスフェラーゼＡＳ融合タンパク質、ＨＬＡ－Ａ２、ＨＬＡ－Ａｌｌ、ｈｓｐ７０－２、ＫＩＡＡ０２０５、Ｍａｒｔ２、Ｍｕｍ－２および３、ｎｅｏ－ＰＡＰ、ミオシンクラスＩ、ＯＳ－９、ｐｍｌ－ＲＡＲアルファ融合タンパク質、ＰＴＰＲＫ、Ｋ－ｒａｓ、Ｎ－ｒａｓ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ＧｎＴＶ、Ｈｅｒｖ－Ｋ－ｍｅｌ、ＮＡ－８８、ＳＰ１７、およびＴＲＰ２－Ｉｎｔ２、（ＭＡＲＴ－Ｉ）、Ｅ２Ａ－ＰＲＬ、Ｈ４－ＲＥＴ、ＩＧＨ－ＩＧＫ、ＭＹＬ－ＲＡＲ、エプスタイン・バーウイルス抗原、ＥＢＮＡ、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）抗原Ｅ６およびＥ７、ＴＳＰ－１８０、ＭＡＧＥ－４、ＭＡＧＥ－５、ＭＡＧＥ－６、ｐ１８５ｅｒｂＢ２、ｐｌＳＯｅｒｂＢ－３、ｃ－ｍｅｔ、ｎｍ－２３Ｈｌ、ＰＳＡ、ＴＡＧ－７２－４、ＣＡ１９－９、ＣＡ７２－４、ＣＡＭ１７．１、ＮｕＭａ、Ｋ－ｒａｓ、アルファ－フェトプロテイン、１３ＨＣＧ、ＢＣＡ２２５、ＢＴＡＡ、ＣＡ１２５、ＣＡ１５－３（ＣＡ２７．２９／ＢＣＡＡ）、ＣＡ１９５、ＣＡ２４２、ＣＡ－５０、ＣＡＭ４３、ＣＤ６８／ＫＰ１、Ｃ０－０２９、ＦＧＦ－５、０２５０、Ｇａ７３３（ＥｐＣＡＭ）、ＨＴｇｐ－１７５、Ｍ３４４、ＭＡ－５０、ＭＧ７－Ａｇ、ＭＯＶ１８、ＮＢ／１７０Ｋ、ＮＹＣＯ－Ｉ、ＲＣＡＳＩ、ＳＤＣＣＡＧ１６、ＴＡ－９０（Ｍａｃ－２結合タンパク質／シクロフィリンＣ関連タンパク質）、ＴＡＡＬ６、ＴＡＧ７２、ＴＬＰ、ＴＰＳ、チロシナーゼ関連タンパク質、ＴＲＰ－１、またはＴＲＰ－２が挙げられる。
【０５５９】
発現させることができる他の腫瘍抗原は、当技術分野で周知である（例えば、国際公開第００／２０５８１号、Cancer Vaccines and Immunotherapy (2000) Eds Ste

rn, Beverley and Carroll, Cambridge University Press, Cambridgeを参照されたい）。これらの腫瘍抗原の配列は、公知データベースから容易に入手可能であるが、国際公開第１９９２／０２０３５６号Ａ１、国際公開第１９９４／００５３０４号Ａ１、国際公開第１９９４／０２３０３１号Ａ１、国際公開第１９９５／０２０９７４号Ａ１、国際公開第１９９５／０２３８７４号Ａ１、および国際公開第１９９６／０２６２１４号Ａ１でも確認することができる。

【０５６０】

上記の代わりに、または上記に加えて、腫瘍抗原は、例えば生検によって対象から得られた癌細胞を使用して識別することもできる。

【０５６１】

よって、特定の実施形態によると、刺激剤は、癌細胞を含む。

【０５６２】

特定の実施形態によると、調節は抗癌剤の存在下で行われる。

【０５６３】

特定の実施形態によると、免疫細胞は、調節後に精製する。

【０５６４】

よって、本発明は、本発明の方法によって得ることができる単離された免疫細胞も企図する。

【０５６５】

特定の実施形態によると、本発明において使用するおよび／または得られる免疫細胞は、単離したばかりの、例えば液体窒素温度において、任意の段階で、将来使用するために長期間（例えば、数か月、数年）にわたって保存（例えば凍結保存）（即ち冷凍）されたもの、および細胞株であり得る。

【０５６６】

凍結保存の方法は、当業者に広く公知であり、例えば、国際公開第２００７／０５４１６０号および同第２００１／０３９５９４号、ならびに米国特許出願公開第２０１２／０１４９１０８号明細書に開示されている。

【０５６７】

特定の実施形態によると、本発明によって得られる細胞は、細胞バンクまたは保管所または保存施設において保存されてもよい。

【０５６８】

結果として、本教示は、免疫細胞の調節、例えば、免疫細胞の活性化が有効に作用し得る疾患（例えば過剰増殖性疾患）や、免疫抑制および感染症に関連する疾患のための養子免疫細胞療法の原料としての、本発明の単離された免疫細胞の使用および方法をさらに示唆するが、これに限定されるものではない。

【０５６９】

よって、特定の実施形態によると、本発明の方法は、免疫細胞の養子移入を必要とする対象に対して、活性化の後に免疫細胞を養子移入することを含む。

【０５７０】

特定の実施形態によると、養子細胞療法において使用するための、本発明の方法によって得ることができる免疫細胞を提供する。

【０５７１】

本発明の特定の実施形態において使用する細胞は、自家性であっても非自家性であってもよく、同系であっても非同系であってもよく、対象に対して同種であっても異種であってもよい。それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０５７２】

本教示はまた、ヘテロダイマーによる治療が有効に作用し得る疾患を治療する方法における、本発明の組成物（例えば、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、またはヘテロダイマーを発現する宿主細胞）の使用を企図する。

【０５７３】

従って、本発明の一態様によると、ヘテロダイマーによる治療が有効に作用し得る疾患を治療するための方法であって、必要とする対象にヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、あるいはそれを含む宿主細胞を投与し、対象の疾患を治療する方法が提供される。

【０５７４】

本発明の追加のまたは代替の態様によると、ヘテロダイマーによる治療が有効に作用し得る疾患を治療するために使用する、ヘテロダイマー、それをコードする核酸構築物またはシステム、あるいはそれを含む宿主細胞が提供される。

【０５７５】

よって、本発明の追加のまたは代わりの態様によると、免疫細胞の調節が有効に作用し得る疾患を治療する方法であって、疾患の治療を必要とする対象に対して、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、またはヘテロダイマーを含む宿主細胞を投与することを含み、それによって対象の疾患を治療する方法を提供する。

【０５７６】

本発明の追加のまたは代わりの態様によると、免疫細胞の調節が有効に作用し得る疾患の治療に使用するための、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、またはヘテロダイマーを含む宿主細胞を提供する。

【０５７７】

「治療すること」または「治療」という用語は、病気（疾患、障害、または医学的状態）の発症を阻害、防止、もしくは抑止すること、および／または病気もしくは病気の症状の低減、軽快、もしくは軽減をもたらすことを示す。当業者は、病気の発症を評価するために様々な方法論およびアッセイを使用することができ、同様に、病気の低減、軽快、または軽減を評価するために様々な方法論およびアッセイが使用可能であることが理解されよう。

【０５７８】

本明細書において使用する場合、「対象」という用語には、任意の年齢および任意の性別の哺乳動物、例えば、ヒトが含まれる。特定の実施形態によると、「対象」という用語は、病気（疾患、障害、または医学的状態）を患う対象を示す。特定の実施形態によると、この用語には、病気を発症するリスクを有する個体が包含される。

【０５７９】

特定の実施形態によると、対象は、Ｉ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する細胞に関連する疾患に罹患している。

【０５８０】

特定の実施形態によると、対象は、ＩＩ型膜タンパク質（例えば、４－１ＢＢ、ＣＤ４０）のリガンドまたは受容体を発現する細胞と関連する疾患に罹患している。

【０５８１】

特定の実施形態によると、対象の疾患細胞は、Ｉ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する。

【０５８２】

特定の実施形態によると、対象の疾患細胞は、Ｉ型膜タンパク質（例えば、ＰＤＬ１、シアル酸、ＣＤ１５５）のリガンドまたは受容体を発現する。

【０５８３】

特定の実施形態によると、対象の疾患細胞は、ＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体を発現する。

【０５８４】

本発明の特定の実施形態によって治療可能な疾患に対する非限定的な用例としては、血管新生の誘導が有効に作用し得る疾患用（例えば、Ｉ型膜タンパク質がＶＥＧＦＡであり、ＩＩ型膜タンパク質がＴＷＥＡＫまたはＡＰＲＩＬであるとき）、血管新生の阻害が有効に作用し得る疾患用（例えば、Ｉ型膜タンパク質がＥＮＧであり、ＩＩ型膜タンパク質がＦａｓＬ、ＴＲＡＩＬまたはＶＥＧＩであるとき）、骨形成の誘導用（例えば、Ｉ型膜

タンパク質がＢＭＰ２であり、ＩＩ型膜タンパク質がＴＷＥＡＫまたはＡＰＲＩＬであるとき）、骨形成の阻害用（例えば、Ｉ型膜タンパク質がＢＭＰ３であり、ＩＩ型膜タンパク質がＲＮＡＫＬ、ＦａｓＬ、ＴＲＡＩＬ、ＶＥＧＩであるとき）、肝臓再生用（例えば、Ｉ型膜タンパク質がＧＦＥＲであり、ＩＩ型膜タンパク質がＴＷＥＡＫまたはＡＰＲＩＬであるとき）、および免疫細胞の調節が有効に作用し得る疾患用（例えば、Ｉ型膜タンパク質およびＩＩ型膜タンパク質の少なくとも１種が免疫調節因子であるとき）が挙げられる。

【０５８５】

本明細書において使用する場合、「免疫細胞の調節が有効に作用し得る疾患」という表現は、対象の免疫応答活性が、少なくとも疾患の症状を寛解させるまたは症状の発症を遅延させるには十分であり得るが、これを行う対象の免疫応答の活性が何らかの理由で最適未満である疾患を示す。

【０５８６】

特定の実施形態によると、疾患は、免疫細胞の調節が有効に作用し得る。

【０５８７】

免疫細胞の活性化が有効に作用し得る疾患の非限定的な例としては、過剰増殖性疾患、免疫抑制に関連する疾患、薬物（例えば、ｍＴＯＲ阻害剤、カルシニューリン阻害剤、ステロイド）により引き起こされる免疫抑制、および感染症が挙げられる。

【０５８８】

特定の実施形態によると、疾患は、過剰増殖性疾患を含む。

【０５８９】

特定の実施形態によると、過剰増殖性疾患は、硬化症、線維症、特発性肺線維症、乾癬、全身性硬化症／強皮症、原発性胆汁性胆管炎、原発性硬化性胆管炎、肝線維症、放射線誘発肺線維症の防止、骨髄線維症または後腹膜線維症を含む。

【０５９０】

他の特定の実施形態によると、過剰増殖性疾患は、癌を含む。

【０５９１】

よって、本発明の別の態様によると、癌の治療を必要とする対象に、本願で開示したＰＤ１－４－１ＢＢＬ融合タンパク質、ＰＤ１アミノ酸配列を含む単離したポリペプチドおよび／または４－１ＢＢＬアミノ酸配列を含む単離したポリペプチドを投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。

【０５９２】

本明細書において使用する場合、癌という用語には、悪性癌および前悪性癌の両方が包含される。

【０５９３】

前悪性または良性形態の癌に関しては、任意選択で、前悪性癌が悪性形態に進行することを停止するために、本組成物およびその方法を適用することができる。

【０５９４】

本発明のいくつかの実施形態の方法によって治療され得る癌は、任意の固形癌もしくは非固形癌、および／または転移癌であり得る。

【０５９５】

特定の実施形態によると、癌は、悪性癌を含む。

【０５９６】

本発明のいくつかの実施形態の方法によって治療することのできる癌は任意の固形または非固形癌および／または転移癌である。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のより具体的な例としては、扁平上皮癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、肝細胞癌、（胃腸癌を含む）胃癌（ｇａｓｔｒｉｃ　ｃａｎｃｅｒまたはｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）、膵癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、

腎臓癌または腎癌、肝癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌および様々な種類の頭頸部癌、ならびにＢ細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非切れ込み核細胞性ＮＨＬ、巨大腫瘤病変ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む）、Ｔ細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）、ヘアリーセル白血病、慢性骨髄芽球性白血病（ＣＭＬ）、および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、浮腫（例えば脳腫瘍に関連するもの）、およびメイグス症候群が挙げられる。好ましくは、癌は、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、腎細胞癌、前立腺癌、肝癌、膵癌、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、および多発性骨髄腫からなる群より選ばれる。本発明の治療に適した癌性状態としては、転移性癌が挙げられる。

【０５９７】

特定の実施形態によると、癌は、前悪性癌を含む。

【０５９８】

前悪性癌（または前癌）は、十分に特徴付けられ、当技術分野で公知である（例えば、Berman JJ. and Henson DE., 2003. Classifying the precancers: a metadata approach. BMC Med Inform Decis Mak. 3:8を参照されたい）。本発明の方法による治療に適した前悪性癌のクラスとしては、後天的な小型または顕微鏡的前悪性癌、核異型を伴う後天的な大型病変、癌へと進行する遺伝性過形成症候群と共に起こる前駆病変、ならびに後天的なびまん性過形成およびびまん性異形成が挙げられる。小型または顕微鏡的前悪性癌の例としては、ＨＧＳＩＬ（子宮頸部の高悪性度扁平上皮内病変）、ＡＩＮ（肛門上皮内腫瘍）、声帯の形成異常、（結腸の）異常腺窩巣、ＰＩＮ（前立腺上皮内腫瘍）が挙げられる。核異型を伴う後天的な大型病変の例としては、管状腺腫、ＡＩＬＤ（タンパク異常血症を伴う血管免疫芽球性リンパ節症）、非定型髄膜腫、胃ポリープ、大斑型の類乾癬、骨髄形成異常、乳頭状移行上皮内癌、過剰な芽細胞を伴う難治性貧血、およびシュナイダー乳頭腫が挙げられる。癌へと進行する遺伝性過形成症候群と共に起こる前駆病変の例としては、異常なほくろ症候群（ａｔｙｐｉｃａｌ ｍｏｌｅ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、Ｃ細胞腺腫症（Ｃ ｃｅｌｌ ａｄｅｎｏｍａｔｏｓｉｓ）、およびＭＥＡが挙げられる。後天的なびまん性過形成およびびまん性異形成の例としては、ＡＩＤＳ、非定型リンパ増殖、骨パジェット病、移植後リンパ増殖性疾患、および潰瘍性大腸炎が挙げられる。

【０５９９】

特定の実施形態によると、癌は、急性骨髄性白血病、肛門癌、基底細胞癌腫、Ｂ細胞性非ホジキンリンパ腫、胆管癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、結腸直腸癌、皮膚Ｔ－細胞性リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫、子宮内膜癌、食道癌、卵管癌、濾胞性リンパ腫、胃癌、食道胃（ＧＥ）接合部癌腫、胚細胞腫瘍、胚細胞腫（精上皮腫）、胚細胞腫瘍、多形神経膠芽腫（ＧＢＭ）、膠肉腫、頭部および頸部癌、肝細胞性癌腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、喉頭癌、平滑筋肉腫、外套細胞リンパ腫、黒色腫、メルケル細胞癌腫、多発性黒色腫、神経内分泌腫瘍、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、口腔（口）癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、末梢神経鞘腫瘍（神経線維肉腫）、末梢Ｔ－細胞リンパ腫（ＰＴＣＬ）、腹膜癌、前立腺癌、腎細胞癌腫、唾液腺癌、皮膚癌、小細胞肺癌、軟組織肉腫、扁平上皮細胞癌腫、滑膜肉腫、精巣癌、胸腺癌腫、甲状腺癌、尿管癌、尿道癌、子宮癌、膣癌または外陰癌である。

【０６００】

特定の実施形態によると、癌は、急性骨髄性白血病、膀胱癌、乳癌、慢性リンパ球性白

血病、慢性骨髄性白血病、結腸直腸癌、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、卵巣上皮癌、上皮性腫瘍、卵管癌、濾胞性リンパ腫、多形神経膠芽腫、肝細胞癌、頭頸部癌、白血病、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、腎細胞癌である。

【０６０１】

特定の実施形態によると、癌はリンパ腫、白血病、および癌腫からなる群より選ばれる。

【０６０２】

特定の実施形態によると、癌は、リンパ腫、白血病、結腸癌、膵癌、卵巣癌、肺癌、および扁平上皮癌からなる群より選ばれる。

【０６０３】

特定の実施形態によると、癌は、結腸癌である。

【０６０４】

特定の実施形態によると、癌は、卵巣癌である。

【０６０５】

特定の実施形態によると、癌は、肺癌である。

【０６０６】

特定の実施形態によると、癌は、頭頸部癌である。

【０６０７】

特定の実施形態によると、癌は、白血病である。

【０６０８】

特定の実施形態によると、白血病は、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球白血病、慢性顆粒球白血病、急性前骨髄球性白血病、成人Ｔ細胞白血病、非白血性白血病、白血球性（ｌｅｕｋｏｃｙｔｈｅｍｉｃ）白血病、好塩基球性白血病、芽細胞白血病、ウシ白血病、慢性骨髄球性白血病、皮膚白血病、胎生細胞性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、ヘアリーセル白血病、血球母細胞性（ｈｅｍｏｂｌａｓｔｉｃ）白血病、血球芽細胞性（ｈｅｍｏｃｙｔｏｂｌａｓｔｉｃ）白血病、組織球白血病、幹細胞白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ向性白血病、リンパ様白血病、リンパ肉腫細胞白血病、マスト細胞白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄球性白血病、骨髄顆粒球白血病、骨髄単球性白血病、ネーゲリ白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髄球性白血病、Ｒｉｅｄｅｒ細胞白血病、Ｓｃｈｉｌｌｉｎｇ白血病、幹細胞白血病、亜白血性白血病、および未分化細胞白血病からなる群より選ばれる。

【０６０９】

特定の実施形態によると、白血病は、前骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病、または慢性骨髄性白血病である。

【０６１０】

特定の実施形態によると、癌は、リンパ腫である。

【０６１１】

特定の実施形態によると、リンパ腫は、Ｂ細胞リンパ腫である。

【０６１２】

特定の実施形態によると、リンパ腫は、Ｔ細胞リンパ腫である。

【０６１３】

他の特定の実施形態によると、リンパ腫は、ホジキンリンパ腫である。

【０６１４】

特定の実施形態によると、リンパ腫は、非ホジキンリンパ腫である。

【０６１５】

特定の実施形態によると、非ホジキンリンパ腫は、侵襲性ＮＨＬ、形質転換ＮＨＬ、緩徐進行性ＮＨＬ、再発性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、低悪性度非ホジキンリンパ腫、濾胞性リ

ンパ腫、大細胞型リンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、ＮＫ細胞リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性リンパ腫、および菌状息肉症／Ｓｅｚｒｙ症候群を含む皮膚Ｔ細胞癌からなる群より選ばれる。

【０６１６】

特定の実施形態によると、癌は、多発性骨髄腫である。

【０６１７】

少なくともいくつかの実施形態によると、多発性骨髄腫は、カッパ型の軽鎖および／またはラムダ型の軽鎖を生成する多発性骨髄腫癌、原発性形質細胞白血病（ＰＣＬ）を含む侵襲性多発性骨髄腫、多発性骨髄腫へと進行し得るＭＧＵＳ（良性単クローン性ガンマグロブリン血症）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ、別名、リンパ形質細胞性リンパ腫）などの良性形質細胞障害、くすぶり型多発性骨髄腫（ＳＭＭ）、緩徐進行性多発性骨髄腫、同様に多発性骨髄腫へと進行し得る前悪性形態の多発性骨髄腫、原発性アミロイドーシスからなる群より選ばれる。

【０６１８】

特定の実施形態によると、癌は、腫瘍微小環境内に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を有する腫瘍および／または腫瘍微小環境内でＩ型膜タンパク質またはＩＩ型膜タンパク質のリガンドまたは受容体（例：ＰＤＬ１またはＣＤ４７）が比較的高発現する腫瘍の存在によって定義される。

【０６１９】

特定の実施形態によると、疾患は、免疫抑制に関連する疾患、または薬物（例えばｍＴＯＲ阻害剤、カルシニューリン阻害剤、ステロイド）により引き起こされる免疫抑制を含む。

【０６２０】

特定の実施形態によると、疾患は、ＨＩＶ、麻疹、インフルエンザ、ＬＣＣＭ、ＲＳＶ、ヒトライノウイルス、ＥＢＶ、ＣＭＶ、またはパルボウイルスによるものを含む。

【０６２１】

特定の実施形態によると、疾患は、感染症を含む。

【０６２２】

本明細書において使用する場合、「感染症」または「感染性疾患」という用語は、病原体によって引き起こされる疾患を示す。病原体の特定例としては、ウイルス病原体、細菌病原体、例えば、細胞内マイコバクテリア病原体（例えば、Mycobacterium tuberculosisなど）、細胞内細菌病原体（例えば、Listeria monocytogenesなど）、または細胞内原虫病原体（例えば、LeishmaniaおよびTrypanosomaなど）が挙げられる。

【０６２３】

本発明の教示に従って治療可能な感染性疾患を引き起こす特定の種類のウイルス病原体としては、レトロウイルス、サーコウイルス、パルボウイルス、パポーバウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、イリドウイルス、ポックスウイルス、ヘパドナウイルス、ピコルナウイルス、カリシウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、ブニヤウイルス、コロナウイルス、アレナウイルス、およびフィロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【０６２４】

本発明の教示に従って治療され得るウイルス感染症の特定例としては、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）誘導性後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）、インフルエンザ、ライノウイルス感染症、ウイルス性髄膜炎、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）感染症、Ａ型、Ｂ型、またはＣ型肝炎ウイルス感染症、麻疹、パピローマウイルス感染症／疣贅、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）感染症、単純ヘルペスウイルス感染症、黄熱、エボラウイルス感染症、狂犬病などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０６２５】

特定の実施形態によると、疾患は免疫細胞の阻害が有効に働くものである。

【０６２６】

特定の実施形態によると、疾患は自己免疫疾患である。このような自己免疫疾患としては、心血管疾患、腺疾患、胃腸疾患、皮膚疾患、肝疾患、神経疾患、筋肉疾患、腎疾患、生殖関連疾患、結合組織疾患および全身疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６２７】

自己免疫心血管疾患の例としては、アテローム性動脈硬化症（Matsuura E. et al., Lupus. 1998;7 Suppl 2:S135）、心筋梗塞（Vaarala O. Lupus. 1998;7 Suppl 2:S132）、血栓症（Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9）、ヴェグナー肉芽腫症、高安動脈炎、川崎病（Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochens chr 2000 Aug 25;112 (15-16):660）、抗ＶＩＩＩ因子自己免疫疾患（Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost.2000;26 (2):157）、壊死性小血管血管炎、顕微性多発性血管炎、Ｃｈｕｒｇ－Ｓｔｒａｕｓｓ症候群、微量免疫型巣状壊死性半月体性糸球体腎炎（Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May;151 (3):178）、抗リン脂質症候群（Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999;14 (4):171）、抗体誘導性心不全（Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83 (12A):75H）、血小板減少性紫斑病（Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14 (2):114; Semple JW. et al., Blood 1996 May 15;87 (10):4245）、自己免疫溶血性貧血（Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma 1998 Jan;28 (3-4):285; Sallah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar;74 (3):139）、シャーガス病の心臓自己免疫(Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 1996 Oct 15;98 (8):1709）および抗ヘルパーＴリンパ球自己免疫（Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998;11 (1):9）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６２８】

自己免疫性リウマチ疾患の例としては、関節リウマチ（Krenn V. et al., Histol Histopathol 2000 Jul;15 (3):791、Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A 1994 Jan 18;91 (2):437）および強直性脊椎炎（Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６２９】

自己免疫性腺疾患としては、膵臓疾患、Ｉ型糖尿病、甲状腺疾患、グレーブス病、甲状腺炎、突発性自己免疫性甲状腺炎、橋本病、特発性粘液水腫、卵巣性自己免疫、自己免疫性抗精子性不妊、自己免疫性前立腺炎およびＩ型自己免疫多腺性症候群が挙げられるが、これらに限定されるものではない。疾患には、膵臓の自己免疫疾患、１型糖尿病（Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647、Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl:S125）、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病（Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29 (2):339、Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92 (1):77）、突発性自己免疫性甲状腺炎（Braley-Mullen H. and Yu S, J Immunol 2000 Dec 15;165 (12):7262）、橋本病（Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Aug;57 (8):1810）、特発性粘液水腫（Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57 (8):1759）、卵巣性自己免疫（Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb;37 (2):87）、自己免疫性抗精子性不妊（Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43 (3):134）、自己免疫性前立腺炎（Alexander RB. et al., Urology 1997 Dec;50 (6):893）およびＩ型自己免疫多腺性症候群（Hara T. et al., Blood. 1991 Mar 1;77 (5):1127）が含まれる。

【０６３０】

自己免疫性胃腸疾患の例としては、慢性炎症性腸疾患（Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;23 (1):16）、腹腔疾患（Landau YE. and Sh

oenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138 (2):122)、大腸炎、回腸炎およびクーロン病が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３１】

自己免疫性皮膚疾患の例としては、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および落葉状天疱瘡等の自己免疫性水疱性皮膚症疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３２】

自己免疫性肝疾患の例としては、肝炎、自己免疫性慢性活動性肝炎（Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54 (3):382）、原発性胆汁性肝硬変（Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov;91 (5):551、Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun;11 (6):595）および自己免疫性肝炎（Manns MP. J Hepatol 2000 Aug;33 (2):326）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３３】

自己免疫性神経疾患の例としては、多発性硬化症（Cross AH. et al., J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1）、アルツハイマー氏病（Oron L. et al., J Neural Transm Suppl. 1997;49:77）、重症筋無力症（Infante AJ. and Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83、Oshima M. et al., Eur J Immunol 1990 Dec;20 (12):2563）、神経障害、運動神経障害（Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7 (3):191）、ギランバレー症候群および自己免疫性神経障害（Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):234）、筋無力症、ランバート－イートン筋無力症候群（Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):204）、傍腫瘍性神経症、皮質性小脳萎縮症、腫瘍随伴性小脳変性症および全身硬直症候群（Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27;98 (7):3988）、非傍腫瘍性全身硬直症候群、進行性小脳萎縮症、脳炎、ラスムッセン脳炎、筋萎縮性側索硬化症、シデナム舞踏病、ジル・ドゥ・ラ・トゥレット症候群および自己免疫多腺性内分泌障害（Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan;156 (1):23）、免疫性神経疾患（Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419）、後天性神経性筋強直症、先天性多発性関節拘縮症（Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482）、神経炎、視神経炎（Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57 (5):544）および神経変性疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３４】

自己免疫性筋肉疾患の例としては、筋炎、自己免疫性筋炎および初期シェーグレン症候群（Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123 (1):92）および平滑筋自己免疫疾患（Zauli D. et al., Biomed Pharmacother 1999 Jun;53 (5-6):234）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３５】

自己免疫性腎疾患の例としては、腎炎および自己免疫性間質性腎炎（Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1 (2):140）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３６】

生殖に関連した自己免疫疾患としては、習慣性流産（Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３７】

自己免疫性接合組織疾患としては、耳疾患、自己免疫性耳疾患（Yoo TJ. et al., Cell Immunol 1994 Aug;157 (1):249）および内耳の自己免疫疾患（Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３８】

自己免疫全身性疾患の例としては、全身性エリテマトーデス（Erikson J. et al., Immunol Res 1998;17 (1-2):49）および全身性強皮症（Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6 (2):156、Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun;169:107）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６３９】

特定の実施形態によると、疾患は移植片拒絶病である。

【０６４０】

臓器移植に関連した疾患のれいとしては、移植片拒絶反応、慢性移植片拒絶反応、亜急性移植片拒絶反応、超急性移植片拒絶反応、急性移植片拒絶反応および移植片対宿主病が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６４１】

特定の実施形態によると、疾患はアレルギー性疾患である。

【０６４２】

アレルギー性疾患の例としては、喘息、皮疹、蕁麻疹、花粉アレルギー、ダニアレルギー、毒液アレルギー、化粧品アレルギー、ラテックスアレルギー、化学アレルギー、薬物アレルギー、昆虫アレルギー、動物のフケアレルギー、棘性植物アレルギー、ツタウルシアレルギーおよび食物アレルギーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０６４３】

特定の実施形態によると、本願で開示する組成物（例えば、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、および／またはヘテロダイマーを発現する宿主細胞）は、鎮痛薬、化学療法剤、放射線治療剤、細胞傷害性療法（コンディショニング）、ホルモン療法、抗体、および当技術分野で周知の他の治療レジメン（例えば、手術）を含むが、これらに限定されない、疾患を治療するための他の確立された治療レジメンまたは実験的な治療レジメンと組み合わせて、対象に投与することができる。

【０６４４】

特定の実施形態によると、本発明のいくつかの実施形態の組成物と組み合わせて投与される治療剤は抗体を含む。

【０６４５】

特定の実施形態によると、本願で開示する組成物（例えば、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物、および／またはヘテロダイマーを発現する宿主細胞）は、骨髄細胞、造血幹細胞、ＰＢＭＣ、臍帯血幹細胞、および／または誘導多能性幹細胞の移植などの養子細胞移植と組み合わせて、対象に投与することができるが、これに限定されるものではない。

【０６４６】

特定の実施形態によると、いくつかの実施形態の組成物と組み合わせて投与される治療剤は、抗癌剤を含む。

【０６４７】

本発明の特定の実施形態と共に使用することができる抗癌剤としては、抗癌薬であるアシビシン、アクラルビシン、アコダゾール塩酸塩、アクロニン、アドリアマイシン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アンボマイシン、酢酸アメタントロン、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アントラマイシン、アスパラギナーゼ、アスペルリン、アザシチジン、アゼテパ、アゾトマイシン、バチマスタット、ベンゾデパ、ビカルタミド、ビサントレン塩酸塩、メシル酸ビスナフィド、ビセレシン、ブレオマイシン硫酸塩、ブレキナルナトリウム、ブロピリミン、ブスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド、カルベチマー、カルボプラチン、カルムスチン、カルビシン塩酸塩、カルゼレシン、セデフィンゴール、クロラムブシル、シロレマイシン、シスプラチン、クラドリビン、メシル酸クリスナトール、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン塩酸塩、デシタビン、デキソルマプラチン、デザグアニン、メシル酸デザグアニン、ジアジコン、ドセタキセル、ドキソルビシン、ドキソルビシン塩酸塩、ドロロキシフェン、ドロロキシフェンクエン酸塩、プロ

ピオン酸ドロモスタノロン、デュアゾマイシン、エダトレキサート、塩酸エフロルニチン、エルサミトルシン、エンロプラチン、エンプロマート、エピプロピジン、エピルビシン塩酸塩、エルブロゾール、エソルビシン塩酸塩、エストラムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウム、エタニダゾール、エトポシド、リン酸エトポシド、エトプリン、塩酸ファドロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フロクスウリジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、フルロシタビン、ホスキドン、ホストリエシンナトリウム、ゲムシタビン、ゲムシタビン塩酸塩、ヒドロキシ尿素、イダルビシン塩酸塩、イホスファミド、イルモホシン、インターフェロンアルファ－２ａ、インターフェロンアルファ－２ｂ、インターフェロンアルファ－ｎ１、インターフェロンアルファ－ｎ３、インターフェロンベータ－Ｉａ、インターフェロンガンマ－Ｉｂ、イプロプラチン、イリノテカン塩酸塩、ランレオチド酢酸塩、レトロゾール、リュープロリド酢酸塩、リアロゾール塩酸塩、ロメトレキソールナトリウム、ロムスチン、ロソキサントロン塩酸塩、マソプロコール、マイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリル、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メトプリン、メツレデパ、ミチンドミド、ミトカルシン、ミトクロミン、ミトギリン、ミトマルシン、マイトマイシン、ミトスペル、ミトタン、ミトキサントロン塩酸塩、ミコフェノール酸、ノコダゾール、ノガラマイシン、オルマプラチン、オキシスラン、パクリタキセル、ペグアスパラガーゼ、ペリオマイシン、ペンタムスチン、ペプロマイシン硫酸塩、ペルホスファミド、ピポブロマン、ピポスルファン、ピロキサントロン塩酸塩、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン、プロカルバジン塩酸塩、ピューロマイシン、ピューロマイシン塩酸塩、ピラゾフリン、リボプリン、ログレチミド、サフィンゴール、サフィンゴール塩酸塩、セムスチン、シムトラゼン、スパルフォセートニナトリウム、スパルソマイシン、スピロゲルマニウム塩酸塩、スピロムスチン、スピロプラチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌル、タリソマイシン、タキソール、テコガランナトリウム、テガフール、テロキサントロン塩酸塩、テモポルフィン、テニポシド、テロキシロン、テストラクトン、チアミプリン、チオグアニン、チオテパ、チアゾフリン、チラパザミン、トポテカン塩酸塩、トレミフェンクエン酸塩、酢酸トレストロン、リン酸トリシリビン、トリメトレキサート、グルクロン酸トリメトレキサート、トリプトレリン、ツブロゾール塩酸塩、ウラシルマスタード、ウレデパ、バプレオチド、ベルテポルフィン、ビンブラスチン硫酸塩、ビンクリスチン硫酸塩、ビンデシン、ビンデシン硫酸塩、硫酸ビネピジン、硫酸ビングリシナート、硫酸ビンロイロシン、ビノレルビン酒石酸塩、硫酸ビンロシジン、硫酸ビンゾリジン、ボロゾール、ゼニプラチン、ジノスタチン、ゾルビシン塩酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる抗悪性腫瘍剤としては、Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division)の第５２章のAntineoplastic Agents（Paul Calabresi and Bruce A. Chabner）、およびその序章である、１２０２～１２６３頁に開示されているものが挙げられる。

【０６４８】

特定の実施形態によると、抗癌剤は抗体を含む。

【０６４９】

特定の実施形態によると、抗体は、リツキシマブ、セツキシマブ、トラスツズマブ、エドレコロマブ、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、イブリツモマブ、パニツムマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ビバツズマブメルタンシン、ブリナツモマブ、ブロンツベトマブ、ブレンツキシマブベドチン、カツマキソマブ、シズツムマブ、ダクリズマブ、アダリムマブ、ベズロトクスマブ、セルトリズマブペゴール、シタツズマブボガトクス、ダラツムマブ、ジヌツキシマブ、エロツズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ギレンツキシマブ、ネシツムマブ、オビヌツズマブ、オファツムマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、シルツキシマブ、トシツモマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ヅルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、トラスツズマブ、およびイピリム

マブからなる群より選ばれる。
【０６５０】
特定の実施形態によると、抗体は、リツキシマブおよびセツキシマブからなる群より選ばれる。
【０６５１】
特定の実施形態によると、治療剤または抗癌剤は、ＩＭｉＤ（例えば、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド）を含む。
【０６５２】
特定の実施形態によると、ＩＭｉＤはサリドマイド、レナリドミド、ポマリドミドからなる群より選ばれる。
【０６５３】
特定の実施形態によると、いくつかの実施形態の組成物と組み合わせて投与される治療剤は、抗感染症剤（例えば、抗生物質および抗ウイルス剤）を含む。
【０６５４】
特定の実施形態によると、いくつかの実施形態の組成物と組み合わせて投与される治療剤は、免疫抑制剤（例えば、ＧＣＳＦおよび他の骨髄刺激因子、ステロイド）を含む。
【０６５５】
特定の実施形態によると、併用療法には、相加効果がある。
【０６５６】
特定の実施形態によると、併用療法には、相乗効果がある。
【０６５７】
本発明の別の態様によると、疾患を治療するための治療剤をパッケージングするパッケージング材料と、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、またはヘテロダイマーを含む宿主細胞とを含む、製品を提供する。
【０６５８】
特定の実施形態によると、製品は、ヘテロダイマーによる治療が有効となり得る疾患、例えば、免疫細胞の調節が有効となり得る疾患の治療用と特定されている。
【０６５９】
特定の実施形態によると、疾患を治療するための治療剤と、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、またはヘテロダイマーを発現する宿主細胞とは、別々の容器に収容されている。
【０６６０】
特定の実施形態によると、当該疾患を治療するための治療剤と、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、またはヘテロダイマーを発現する宿主細胞とは、合剤として収容されている。
【０６６１】
特定の実施形態によると、ヘテロダイマーは、異種性の治療用部分に結合されているまたは異種性の治療用部分を含む。治療用部分は任意の分子でよく、小分子化学化合物やポリペプチドが挙げられる。
【０６６２】
本発明の特定の実施形態と共に使用することのできる治療用部分の非限定的な例としては、細胞毒性部分、毒性部分、サイトカイン部分、免疫調節性部分、ポリペプチド、抗体、薬剤、化学および／または放射性同位元素が挙げられる。
【０６６３】
本発明のいくつかの実施形態によると、治療用部分は、本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、治療用部分をコードする核酸配列に翻訳的に融合させることで結合されている。
【０６６４】
これに加えて、または代わりに、治療用部分は、当業者に公知の任意の結合方法を使用して、本発明のいくつかの実施形態のヘテロダイマーに化学的に結合（カップリング）さ

せることもできる。例えば、下記を用いてペプチドを所望の薬剤に結合させることができる：３－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシサクシニミドエステル（Ｎ－サクシニミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸とも呼ばれる）（「ＳＤＰＤ」）（Ｓｉｇｍａ、Ｃａｔ．　Ｎｏ．Ｐ－３４１５、例えば、Cumber et al. 1985, Methods of Enzymology 112: 207-224を参照）、グルタルアルデヒド結合法（例えば、G.T. Hermanson 1996, Antibody Modification and Conjugation, in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diegoを参照）、またはカルボジイミド結合法［例えば、J. March, Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure, pp. 349-50 & 372-74 (3d ed.), 1985、B. Neises et al. 1978, Angew Chem., Int. Ed. Engl. 17:522、A. Hassner et al. 1978, Tetrahedron Lett. 4475、E.P. Boden et al. 1986, J. Org. Chem. 50:2394およびL.J. Mathias 1979, Synthesis 561を参照］。

【０６６５】

治療用部分は、例えば、当業界で広く実施されている標準的な化学合成技術を使用して、本発明のいくつかの実施形態のヘテロダイマーに結合することが可能であり［例えば、hypertexttransferprotocol://worldwideweb (dot) chemistry (dot) org/portal/Chemistry)を参照］、直接的または間接的な、任意の適切な化学結合、（官能部分がポリペプチドのときの）ペプチド結合、あるいはリンカーペプチドや他の化学部分（有機ポリマー等）といった内部リンカーエレメントへの共有結合を使用する。キメラペプチドは、ペプチドのカルボキシ（Ｃ）またはアミノ（Ｎ）末端の結合、あるいは内部化学基（直鎖、分岐または環状の側鎖等）、内部の炭素または窒素原子、等への結合によって連結され得る。

【０６６６】

本明細書において使用されるように、「アミノ酸配列」、「タンパク質」、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク性部分」という用語は、本明細書において代替的に使用され、本来のペプチド（分解生成物、人工的に合成されたペプチドまたは組換えペプチドのいずれか）およびペプチドミメティック（一般には人工的に合成されたペプチド）、ならびに例えば、ペプチドを体内でより安定性にするか、または細胞内にさらに浸透することができるようにする修飾を有し得るペプチド類似体である、ペプトイドおよびセミペプトイドを包含する。

【０６６７】

かかる修飾としては、限定されないが、Ｎ末端修飾、Ｃ末端修飾、ペプチド結合修飾、主鎖修飾、および残基修飾などが挙げられる。ペプチド模倣化合物を調製するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)において特定されている。この文献は、本明細書に完全に記載されているかのように、参照により組み込まれている。これに関するさらなる詳細を本明細書で後述した。

【０６６８】

ペプチド内のペプチド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）は、例えば、Ｎ－メチル化結合（－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＯ－）、エステル結合（－Ｃ（Ｒ）Ｈ－Ｃ－Ｏ－Ｏ－Ｃ（Ｒ）－Ｎ－）、ケトメチレン結合（－ＣＯ－ＣＨ$_2$－）、スルフィニルメチレン結合（－Ｓ（＝Ｏ）－ＣＨ$_2$－）、α－アザ結合（－ＮＨ－Ｎ（Ｒ）－ＣＯ－）（式中、Ｒは任意のアルキル、例えばメチルである）、アミン結合（－ＣＨ$_2$－ＮＨ－）、スルフィド結合（－ＣＨ$_2$－Ｓ－）、エチレン結合（－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－）、ヒドロキシエチレン結合（－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_2$－）、チオアミド結合（－ＣＳ－ＮＨ－）、オレフィン二重結合（－ＣＨ＝ＣＨ－）、フッ化オレフィン二重結合（－ＣＦ＝ＣＨ－）、レトロアミド結合（－ＮＨ－ＣＯ－）、ペプチド誘導体（－Ｎ（Ｒ）－ＣＨ$_2$－ＣＯ－）（式中、Ｒは、炭素原子に天然で生じる「正常な」側鎖である）によって置換され得る。

【０６６９】

これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合のうちのいずれかにおいて起こればよく、さ

らには、いくつか（２～３）の結合において同時に起こってもよい。

【０６７０】

天然の芳香族アミノ酸であるＴｒｐ、Ｔｙｒ、およびＰｈｅは、１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸（ＴＩＣ）、ナフチルアミン（Ｎｏｌ）、Ｐｈｅの環メチル化誘導体、Ｐｈｅまたは０－メチル－Ｔｙｒのハロゲン化誘導体などの合成の非天然酸に置換され得る。

【０６７１】

本発明のいくつかの実施形態における ペプチドは、１つまたは複数の修飾アミノ酸または１つまたは複数の非アミノ酸モノマー（例えば、脂肪酸、複合炭水化物等）も含み得る。

【０６７２】

「アミノ酸（単数）１つまたは複数）」または「アミノ酸（複数）」という用語は、２０の天然アミノ酸、ｉｎ　ｖｉｖｏで翻訳後に修飾されることが多いアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンなど、および他の珍しいアミノ酸、限定されないが、２－アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンなどを包含すると理解される。さらに、「アミノ酸」という用語は、Ｄ－アミノ酸とＬ－アミノ酸の両方を含む。

【０６７３】

以下の表１および表２には、本発明のいくつかの実施形態で使用することができる、天然アミノ酸（表１）および非慣例的または修飾アミノ酸（例：合成、表２）を列挙する。

【０６７４】

【表１】

表１

アミノ酸	三文字略語	一文字記号
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Iie	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V
任意の上記アミノ酸	Xaa	X

【０６７５】

【表２－１】

表２

非慣例的なアミノ酸	記号	非慣例的なアミノ酸	記号
オルニチン	Orn	ヒドロキシプロリン	Hyp
α－アミノ酪酸	Abu	アミノノルボニル－カルボン酸塩	Norb
Ｄ－アラニン	Dala	アミノシクロプロパン－カルボン酸塩	Cpro
Ｄ－アルギニン	Darg	Ｎ－（３－グアニジノプロピル）グリシン	Narg
Ｄ－アスパラギン	Dasn	Ｎ－（カルバミルメチル）グリシン	Nasn
Ｄ－アスパラギン酸	Dasp	Ｎ－（カルボキシメチル）グリシン	Nasp
Ｄ－システイン	Dcys	Ｎ－（チオメチル）グリシン	Ncys
Ｄ－グルタミン	Dgln	Ｎ－（２－カルバミルエチル）グリシン	Ngln
Ｄ－グルタミン酸	Dglu	Ｎ－（２－カルボキシエチル）グリシン	Nglu
Ｄ－ヒスチジン	Dhis	Ｎ－（イミダゾリルエチル）グリシン	Nhis
Ｄ－イソロイシン	Dile	Ｎ－（１－メチルプロピル）グリシン	Nile
Ｄ－ロイシン	Dleu	Ｎ－（２－メチルプロピル）グリシン	Nleu
Ｄ－リシン	Dlys	Ｎ－（４－アミノブチル）グリシン	Nlys
Ｄ－メチオニン	Dmet	Ｎ－（２－メチルチオエチル）グリシン	Nmet
Ｄ－オルニチン	Dorn	Ｎ－（３－アミノプロピル）グリシン	Norn
Ｄ－フェニルアラニン	Dphe	Ｎ－ベンジルグリシン	Nphe
Ｄ－プロリン	Dpro	Ｎ－（ヒドロキシメチル）グリシン	Nser
Ｄ－セリン	Dser	Ｎ－（１－ヒドロキシエチル）グリシン	Nthr
Ｄ－スレオニン	Dthr	Ｎ－（３－インドリルエチル）グリシン	Nhtrp
Ｄ－トリプトファン	Dtrp	Ｎ－（ｐ－ヒドロキシフェニル）グリシン	Ntyr
Ｄ－チロシン	Dtyr	Ｎ－（１－メチルエチル）グリシン	Nval
Ｄ－バリン	Dval	Ｎ－メチルグリシン	Nmgly
Ｄ－Ｎ－メチルアラニン	Dnmala	Ｌ－Ｎ－メチルアラニン	Nmala

【０６７６】

【表２－２】

Ｄ－Ｎ－メチルアルギニン	Dnmarg	Ｌ－Ｎ－メチルアルギニン	Nmarg
Ｄ－Ｎ－メチルアスパラギン	Dnmasn	Ｌ－Ｎ－メチルアスパラギン	Nmasn
Ｄ－Ｎ－メチルアスパラギン酸	Dnmasp	Ｌ－Ｎ－メチルアスパラギン酸	Nmasp
Ｄ－Ｎ－メチルシステイン	Dnmcys	Ｌ－Ｎ－メチルシステイン	Nmcys
Ｄ－Ｎ－メチルグルタミン	Dnmgln	Ｌ－Ｎ－メチルグルタミン	Nmgln
Ｄ－Ｎ－メチルグルタミン酸	Dnmglu	Ｌ－Ｎ－メチルグルタミン酸	Nmglu
Ｄ－Ｎ－メチルヒスチジン	Dnmhis	Ｌ－Ｎ－メチルヒスチジン	Nmhis
Ｄ－Ｎ－メチルイソロイシン	Dnmile	Ｌ－Ｎ－メチルイソロイシン	Nmile
Ｄ－Ｎ－メチルロイシン	Dnmleu	Ｌ－Ｎ－メチルロイシン	Nmleu
Ｄ－Ｎ－メチルリシン	Dnmlys	Ｌ－Ｎ－メチルリシン	Nmlys
Ｄ－Ｎ－メチルメチオニン	Dnmmet	Ｌ－Ｎ－メチルメチオニン	Nmmet
Ｄ－Ｎ－メチルオルニチン	Dnmorn	Ｌ－Ｎ－メチルオルニチン	Nmorn
Ｄ－Ｎ－メチルフェニルアラニン	Dnmphe	Ｌ－Ｎ－メチルフェニルアラニン	Nmphe
Ｄ－Ｎ－メチルプロリン	Dnmpro	Ｌ－Ｎ－メチルプロリン	Nmpro
Ｄ－Ｎ－メチルセリン	Dnmser	Ｌ－Ｎ－メチルセリン	Nmser
Ｄ－Ｎ－メチルスレオニン	Dnmthr	Ｌ－Ｎ－メチルスレオニン	Nmthr
Ｄ－Ｎ－メチルトリプトファン	Dnmtrp	Ｌ－Ｎ－メチルトリプトファン	Nmtrp
Ｄ－Ｎ－メチルチロシン	Dnmtyr	Ｌ－Ｎ－メチルチロシン	Nmtyr
Ｄ－Ｎ－メチルバリン	Dnmval	Ｌ－Ｎ－メチルバリン	Nmval
Ｌ－ノルロイシン	Nle	Ｌ－Ｎ－メチルノルロイシン	Nmnle
Ｌ－ノルバリン	Nva	Ｌ－Ｎ－メチルノルバリン	Nmnva
Ｌ－エチルグリシン	Etg	Ｌ－Ｎ－メチル－エチルグリシン	Nmetg
Ｌ－ｔ－ブチルグリシン	Tbug	Ｌ－Ｎ－メチル－ｔ－ブチルグリシン	Nmtbug
Ｌ－ホモフェニルアラニン	Hphe	Ｌ－Ｎ－メチル－ホモフェニルアラニン	Nmhphe
α－ナフチルアラニン	Anap	Ｎ－メチル－α－ナフチルアラニン	Nmanap
ペニシラミン	Pen	Ｎ－メチルペニシラミン	Nmpen
γ－アミノ酪酸	Gabu	Ｎ－メチル－γ－アミノ酪酸	Nmgabu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	Ｎ－メチル－シクロヘキシルアラニン	Nmchexa
シクロペンチルアラニン	Cpen	Ｎ－メチル－シクロペンチルアラニン	Nmcpen
α－アミノ－α－メチル酪酸	Aabu	Ｎ－メチル－α－アミノ－α－メチル酪酸	Nmaabu
α－アミノイソ酪酸	Aib	Ｎ－メチル－α－アミノイソ酪酸	Nmaib
Ｄ－α－メチルアルギニン	Dmarg	Ｌ－α－メチルアルギニン	Marg
Ｄ－α－メチルアスパラギン	Dmasn	Ｌ－α－メチルアスパラギン	Masn
Ｄ－α－メチルアスパラギン酸	Dmasp	Ｌ－α－メチルアスパラギン酸	Masp
Ｄ－α－メチルシステイン	Dmcys	Ｌ－α－メチルシステイン	Mcys

【０６７７】

【表２－３】

Ｄ－α－メチルグルタミン	Dmgln	Ｌ－α－メチルグルタミン	Mgln
Ｄ－α－メチルグルタミン酸	Dmglu	Ｌ－α－メチルグルタミン酸	Mglu
Ｄ－α－メチルヒスチジン	Dmhis	Ｌ－α－メチルヒスチジン	Mhis
Ｄ－α－メチルイソロイシン	Dmile	Ｌ－α－メチルイソロイシン	Mile
Ｄ－α－メチルロイシン	Dmleu	Ｌ－α－メチルロイシン	Mleu
Ｄ－α－メチルリシン	Dmlys	Ｌ－α－メチルリシン	Mlys
Ｄ－α－メチルメチオニン	Dmmet	Ｌ－α－メチルメチオニン	Mmet
Ｄ－α－メチルオルニチン	Dmorn	Ｌ－α－メチルオルニチン	Morn
Ｄ－α－メチルフェニルアラニン	Dmphe	Ｌ－α－メチルフェニルアラニン	Mphe
Ｄ－α－メチルプロリン	Dmpro	Ｌ－α－メチルプロリン	Mpro
Ｄ－α－メチルセリン	Dmser	Ｌ－α－メチルセリン	Mser
Ｄ－α－メチルスレオニン	Dmthr	Ｌ－α－メチルスレオニン	Mthr
Ｄ－α－メチルトリプトファン	Dmtrp	Ｌ－α－メチルトリプトファン	Mtrp
Ｄ－α－メチルチロシン	Dmtyr	Ｌ－α－メチルチロシン	Mtyr
Ｄ－α－メチルバリン	Dmval	Ｌ－α－メチルバリン	Mval
Ｎ－シクロブチルグリシン	Ncbut	Ｌ－α－メチルノルバリン	Mnva
Ｎ－シクロヘプチルグリシン	Nchep	Ｌ－α－メチルエチルグリシン	Metg
Ｎ－シクロヘキシルグリシン	Nchex	Ｌ－α－メチル－ｔ－ブチルグリシン	Mtbug
Ｎ－シクロデシルグリシン	Ncdec	Ｌ－α－メチル－ホモフェニルアラニン	Mhphe
Ｎ－シクロドデシルグリシン	Ncdod	α－メチル－α－ナフチルアラニン	Manap
Ｎ－シクロオクチルグリシン	Ncoct	α－メチルペニシラミン	Mpen
Ｎ－シクロプロピルグリシン	Ncpro	α－メチル－γ－アミノ酪酸	Mgabu
Ｎ－シクロウンデシルグリシン	Ncund	α－メチル－シクロヘキシルアラニン	Mchexa
Ｎ－（２－アミノエチル）グリシン	Naeg	α－メチル－シクロペンチルアラニン	Mcpen
Ｎ－（２，２－ジフェニルエチル）グリシン	Nbhm	Ｎ－（Ｎ－（２，２－ジフェニルエチル）カルバミルメチル－グリシン	Nnbhm
Ｎ－（３，３－ジフェニルプロピル）グリシン	Nbhe	Ｎ－（Ｎ－（３，３－ジフェニルプロピル）カルバミルメチル－グリシン	Nnbhe
１－カルボキシ－１－（２，２－ジフェニルエチルアミノ）シクロプロパン	Nmbc	１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸	Tic
ホスホセリン	pSer	ホスホスレオニン	pThr
ホスホチロシン	pTyr	Ｏ－メチル－チロシン	
２－アミノアジピン酸		ヒドロキシリシン	

【０６７８】

本発明のいくつかの実施形態のペプチドは、好ましくは線状形態で用いられるが、環化がペプチドの特徴に著しく干渉しない場合は環状形態のペプチドを用いてもよいことが理解されよう。

【０６７９】

本発明のヘテロダイマーは、ヘテロダイマーが可溶型であることが要求される療法に使用されることが好ましいため、本発明のいくつかの実施形態におけるペプチドは、１種または複数の非天然または天然の極性アミノ酸（ヒドロキシル含有側鎖によってペプチドの可溶性を上げることのできるセリンおよびスレオニンが挙げられるが、これらに限定され

ない）を含む。
【０６８０】
本発明のペプチドのアミノ酸は、保存的に、または非保存的に置換されていてもよい。
【０６８１】
本明細書に記載の「保存的置換」という用語は、ペプチドにおける天然配列に存在するアミノ酸を、天然または非天然のアミノまたは同様な立体特性を有するペプチドミメティックで置換することを示す。置換されるべき天然アミノ酸の側鎖が極性または疎水性である場合には、保存的置換は、（置換されたアミノ酸の側鎖と同じ立体特性を有することに加えて）同様に極性または疎水性である天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはペプチドミメティック部位との置換であるべきである。
【０６８２】
天然アミノ酸は一般にその特性に従って分類され、本発明によれば、立体的に類似した非荷電アミノ酸による荷電アミノ酸の置換は、保存的置換であるとみなされることから、天然アミノ酸による保存的置換を容易に決定することができる。
【０６８３】
非天然アミノ酸による保存的置換を行うために、当技術分野でよく知られているアミノ酸類似体（合成アミノ酸）を使用することも可能である。天然アミノ酸のペプチドミメティックは、当業者に公知の文献に十分に記述されている。
【０６８４】
保存的置換を起こす場合、置換するアミノ酸は、側鎖に元のアミノ酸と同じまたは類似の置換基を有さなければならない。
【０６８５】
機能的に同様なアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野で周知である。どのアミノ酸変化が表現型的にサイレントである可能性が高いかに関する指針は、Bowie et al., 1990, Science 247: 1306 1310においても確認することができる。このような保存的に修飾された変異体は、多型変異体、種間ホモログ、および対立遺伝子に追加されるものであり、これらを除外するものではない。典型的な保存的置換としては、１）アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）、２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）、４）アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）、５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）、６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）、７）セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）、および８）システイン（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照されたい）。アミノ酸は、側鎖に関連する特性に基づいて置換することができる。例えば、極性側鎖を有するアミノ酸、例えばセリン（Ｓ）およびスレオニン（Ｔ）、側鎖の電荷に基づくアミノ酸、例えば、アルギニン（Ｒ）およびヒスチジン（Ｈ）、ならびに疎水性側鎖を有するアミノ酸、例えばバリン（Ｖ）およびロイシン（Ｌ）の置換が可能である。示されるように、典型的に変化はわずかな性質のものであり、例えば、タンパク質のフォールディングまたは活性に著しく影響しない保存的アミノ酸置換などである。
【０６８６】
本明細書で使用される「非保存的置換」という語句は、異なる電気化学特性および／または立体特性を有する、他の天然アミノ酸または非天然アミノ酸によって、親配列に存在するアミノ酸が置換されることを示す。したがって、置換するアミノ酸の側鎖は、置換される天然アミノ酸の側鎖より著しく大きい（または小さい）および／または置換されるアミノ酸と比べて著しく異なる電子特性を有する官能基を有し得る。このタイプの非保存的置換の例としては、アラニンをフェニルアラニンまたはシクロヘキシルメチルグリシンで置換、グリシンをイソロイシンで置換、またはアスパラギン酸を－ＮＨ－ＣＨ［（－ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯＯＨ］－ＣＯ－で置換することが挙げられる。本発明の範囲内であるこれらの非保存的置換は、抗細菌特性を有するペプチドを依然として構成する置換である。
【０６８７】

本発明のペプチドのＮおよびＣ末端は、官能基によって保護され得る。適切な官能基は、その教示が参照により本明細書に援用される、Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991に記述されている。好ましい保護基は、例えば、化合物の親水性を低減し、化合物の親油性を高めることによって、それに結合した化合物の細胞内への輸送を促進する基である。

【０６８８】

特定の実施形態において、官能基の付加によって１つまたは複数のアミノ酸を修飾してもよく、例えば、概念的には「化学修飾」してもよい。例えば、天然の配列に存在する側鎖アミノ酸残基は、任意選択で修飾されてもよく、しかし代替的には、後述するように、タンパク質の他の部分が、側鎖アミノ酸残基に加えて、またはその代わりに、任意選択で修飾されてもよい。化学合成プロセスが続く場合、修飾は、任意選択で、分子の合成中に、例えば、化学修飾されたアミノ酸を付加することによって行ってもよい。しかしながら、分子中に既に存在するアミノ酸の化学修飾（「ｉｎ　ｓｉｔｕ」修飾）も可能である。ペプチドまたはタンパク質に対する修飾は、例えば、遺伝子合成、エキソヌクレアーゼ欠失による部位指向性（例えば、ＰＣＲベースの）突然変異誘発もしくはランダム突然変異誘発（例えば、ＥＭＳ）によって、化学修飾によって、または異種ドメインもしくは結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の融合によって導入することができる。

【０６８９】

本明細書において使用する場合、「化学修飾」という用語は、ペプチドに言及している場合、そのアミノ酸残基のうちの少なくとも１つが、プロセシングもしくは他の翻訳後修飾などの天然プロセス、または当技術分野で周知の化学修飾技術のいずれかによって修飾されているペプチドを示す。非限定的な代表的な修飾としては、カルボキシメチル化、アセチル化、アシル化、リン酸化、グリコシル化、アミド化、ＡＤＰ－リボシル化、脂肪酸のアシル化、ファルネシル基、イソファルネシル基、炭化水素基、脂肪酸基、結合用のリンカーの付加、官能化、ＧＰＩアンカー形成、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、メチル化、ミリスチル化、ＰＥＧ化、プレニル化、リン酸化、ユビキチン化、または任意の同様のプロセス、ならびに公知の保護基／ブロッキング基が挙げられる。エーテル結合を任意選択で使用して、セリンまたはスレオニンのヒドロキシルを糖のヒドロキシルに結合させてもよい。アミド結合を任意選択で使用して、グルタメートまたはアスパルテートのカルボキシル基を糖のアミノ基に結合させてもよい（Garg and Jeanloz, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 43, Academic Press (1985)、Kunz, Ang. Chem. Int. Ed. English 26:294-308 (1987)）。アミノ酸と炭水化物との間にアセタール結合およびケタール結合を任意選択で形成してもよい。例えば、遊離アミノ基（例えば、リジン）のアシル化により、脂肪酸アシル誘導体を任意選択で作ってもよい（Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)）。

【０６９０】

特定の実施形態によると、修飾には、本明細書に完全に記載かのように参照により本明細書に組み込まれている国際出願第２００６／０５０２６２号に記載のように、ペプチドへのシクロアルカン部分の付加が含まれる。これらの部分は、生体分子と共に使用されるように設計され、任意選択で、様々な特性をタンパク質に与えるために使用され得る。

【０６９１】

さらに、任意選択で、ペプチドのいずれの部分を修飾してもよい。例えば、本明細書に完全に記載かのように参照により本明細書に組み込まれている国際出願第２００６／０５０２４７号に記載のように、タンパク質のグリコシル化部分のＰＥＧ化を任意選択で行ってもよい。１つまたは複数のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）基を、Ｏ－結合型および／またはＮ－結合型グリコシル化に任意選択で付加してもよい。ＰＥＧ基は、任意選択で、分枝状であっても直鎖状であってもよい。任意選択で、任意の種類の水溶性ポリマーを、グリコシルリンカーを介してタンパク質のグリコシル化部位に結合させてもよい。

【０６９２】
「ＰＥＧ化されたタンパク質」とは、タンパク質のアミノ酸残基にポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分が共有結合した、生物学的活性を有するタンパク質またはその断片を示す。
【０６９３】
「ポリエチレングリコール」または「ＰＥＧ」とは、ポリアルキレングリコール化合物またはその誘導体を意味し、カップリング剤、またはカップリング部分もしくは活性化部分での（例えば、チオール、トリフレート、トレシレート、アジリジン、オキシランでの、または好ましくはマレイミド部分での）誘導体化の有無を問わない。マレイミドモノメトキシＰＥＧなどの化合物が、例示的な、または活性化された本発明のＰＥＧ化合物である。本発明では、他のポリアルキレングリコール化合物、例えばポリプロピレングリコールを使用してもよい。他の適切なポリアルキレングリコール化合物としては、次の種類の荷電ポリマーまたは中性ポリマー：デキストラン、コロミン酸、または他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー、およびビオチン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。
【０６９４】
特定の実施形態によると、ペプチドは、改変された（即ち、元のまたは本来のグリコシル化パターンから改変された）グリコシル化パターンを有するように修飾され得る。本明細書において使用する場合、「改変された」とは、１つまたは複数の炭水化物部分が欠失していること、および／または少なくとも１つのグリコシル化部位が元のタンパク質に付加されていることを示す。
【０６９５】
タンパク質のグリコシル化は、典型的には、Ｎ－結合型またはＯ－結合型のいずれかである。Ｎ－結合型とは、炭水化物部分がアスパラギン残基の側鎖に結合していることを示す。アスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－スレオニンのトリペプチド配列（ここで、Ｘは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への酵素的な炭水化物部分の結合のための認識配列である。よって、ポリペプチド内にこれらのトリペプチド配列のうちのいずれかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が生じる。Ｏ－結合型グリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸（５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリジンも使用され得るが、最も一般的にはセリンまたはスレオニン）に対する、Ｎ－アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの糖類のうちの１つの結合を示す。
【０６９６】
ペプチドへのグリコシル化部位の付加は、ペプチドのアミノ酸配列が前述のトリペプチド配列のうちの１つまたは複数を含有するようにこれを改変することによって、簡便に遂行される（Ｎ－結合型グリコシル化部位の場合）。改変は、本来のペプチドの配列における１つまたは複数のセリンまたはスレオニン残基の付加、またはこれらによる置換によって作製することもできる（Ｏ－結合型グリコシル化部位の場合）。ペプチドのアミノ酸配列は、ＤＮＡレベルで変化を導入することによって改変することもできる。
【０６９７】
ペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ペプチドのアミノ酸残基にグリコシドを化学的または酵素的にカップリングする方法である。使用するカップリング様式に応じて、（ａ）アルギニンおよびヒスチジン、（ｂ）遊離カルボキシル基、（ｃ）遊離スルフヒドリル基、例えばシステインのもの、（ｄ）遊離ヒドロキシル基、例えばセリン、スレオニン、もしくはヒドロキシプロリンのもの、（ｅ）芳香族残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンのもの、または（ｆ）グルタミンのアミド基に糖類を結合させてもよい。これらの方法は、国際公開第８７／０５３３０号、およびAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 259-306 (1981)に記載されている。
【０６９８】

ペプチドに存在する任意の炭水化物部分の除去は、化学的に、酵素的に、またはＤＮＡレベルで変化を導入することにより遂行されてもよい。化学的脱グリコシル化は、トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物にタンパク質を曝露させることを必要とする。この治療は、結合糖（ｌｉｎｋｉｎｇ　ｓｕｇａｒ）（Ｎ－アセチルグルコサミンまたはＮ－アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたはすべての糖の切断をもたらし、アミノ酸配列を未変化のままにする。

【０６９９】

化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987)、およびEdge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981)に記載されている。タンパク質にある炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987)に記載されているように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用することによって達成することができる。

【０７００】

特定の実施形態において、ペプチドは検出可能なタグを含む。本明細書において使用する場合、一実施形態において、「検出可能なタグ」という用語は、当業者が当技術分野で公知の技術を使用することにより検出することができる任意の部分を示す。検出可能なタグは、ペプチド配列であり得る。任意選択で、検出可能なタグは、化学薬品によって、またはタンパク質分解などの酵素的手段によって除去可能であってもよい。本発明のいくつかの実施形態において、検出可能なタグはペプチドの精製に使用することができる。例えば、「検出可能なタグ」という用語は、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）タグ、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグ、ポリ（Ｈｉｓ）タグ、ＦＬＡＧタグ、エピトープタグ、例えばＶ５タグ、ｃ－ｍｙｃタグ、およびＨＡタグ、ならびに蛍光タグ、例えば緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）、およびシアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、ならびにこれらのタグの誘導体、または当技術分野で公知の任意のタグを含む。「検出可能なタグ」という用語は、「検出可能なマーカー」という用語も含む。

【０７０１】

特定の実施形態によると、ペプチドはそのＮ末端に結合した検出可能なタグ（例：ポリ（Ｈｉｓ）タグ）を含む。

【０７０２】

特定の実施形態によると、ペプチドはそのＣ末端に結合した検出可能なタグ（例：ポリ（Ｈｉｓ）タグ）を含む。

【０７０３】

特定の実施形態によると、ペプチドはそのＮ末端に結合した検出可能なタグ（例：ポリ（Ｈｉｓ）タグ）を含まない。

【０７０４】

特定の実施形態によると、ペプチドはそのＣ末端に結合した検出可能なタグ（例：ポリ（Ｈｉｓ）タグ）を含まない。

【０７０５】

特定の実施形態によると、ペプチドは切断可能部分に融合される。よって、例えば、回収を容易にするために、発現されるコード配列は、本発明のいくつかの実施形態のペプチドをコードし、切断可能部分と融合するように、工学的に操作することができる。一実施形態において、融合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーにより、例えば、切断可能部分に対して特異的なカラムに固定化することにより、ペプチドが容易に単離され得るように設計することができる。一実施形態では、ペプチドと切断可能部分との間に切断部位を工学的操作で設け、この部位で融合タンパク質を特異的に切断する適切な酵素または薬剤を用いて治療することにより、クロマトグラフィーカラムからペプチドを遊離させることができる［例えば、Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988)、およびGardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)を参照された

い］。特定の実施形態において、ペプチドは単離したペプチドである。
【０７０６】
本発明のいくつかの実施形態のペプチドおよびそれを含むヘテロダイマーは、ペプチド合成の当業者に知られた任意の技術、これらに限定されるものではないが、例えば固相合成や組換え技術、で合成および精製され得る。
【０７０７】
固相ペプチド合成については、多くの技術の概要を、J. M. Stewart and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963、およびJ. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1973において確認することができる。従来型の溶液合成については、G. Schroder and K. Lupke, The Peptides, vol. 1, Academic Press (New York), 1965を参照されたい。
【０７０８】
一般的に、これらの方法は、成長中のペプチド鎖に１つまたは複数のアミノ酸または適宜保護されたアミノ酸を連続的に付加することを含む。通常、第１のアミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基を適切な保護基で保護する。保護または誘導化されたアミノ酸は、次に、アミド結合の形成に適した条件下で、不活性な固体支持体に取り付けるか、溶液中で使用されて、適切に保護された相補的な（アミノまたはカルボキシル）基を有する配列中の次のアミノ酸に付加される。次にこの新たに付加したアミノ酸残基から保護基が取り除かれて、次の（適切に保護された）アミノ酸が付加され、このように続いていく。所望のアミノ酸の全てが正しい順番に結合したら、残存する保護基（および固体支持体）を順次または同時に除去し、最終ペプチド化合物を得る。この一般的な方法の単純な改変、例えば、脱保護後にペンタペプチド等が形成されるように、保護されたトリペプチドを正しく保護されたジペプチドと（キラル中心をラセミ化しない条件下で）カップリングすることによって、成長する鎖に一度に複数のアミノ酸を付加することも可能である。ペプチド合成のさらなる説明は米国特許第６，４７２，５０５号明細書に開示されている。
【０７０９】
本発明のいくつかの実施形態におけるペプチド化合物を調製するための好ましい方法には固相ペプチド合成が含まれる。
【０７１０】
大規模ペプチド合成はAndersson Biopolymers 2000;55(3):227-50に記載されている。
【０７１１】
特定の実施形態において、ペプチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現系を使用して合成することもできる。このようなｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成法は当技術分野で周知であり、システムの構成要素は市販されている。
【０７１２】
特定の実施形態において、ペプチドまたはそれを含むヘテロダイマーは、組換えＤＮＡ技術で作製される。「組換え」ペプチドまたはタンパク質とは、組換えＤＮＡ技術によって作製された、即ち、所望のペプチドまたはタンパク質をコードする外因性ＤＮＡ構築物によって形質転換された細胞によって生成された、ペプチドまたはタンパク質を示す。
【０７１３】
従って、本発明の別の態様によると、ヘテロダイマーをコードする少なくとも１種のポリヌクレオチドと、宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドの発現を指示する制御因子とを含む核酸構築物またはシステムが提供される。
【０７１４】
特定の実施形態によると、ポリヌクレオチドは、配列番号８０および８２もしくは配列番号８０および８４に示す核酸配列と少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％相同であり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。

【０７１５】
特定の実施形態によると、ポリヌクレオチドは、配列番号８６および８２、配列番号９０および９２、もしくは配列番号８６および８４に示す核酸配列と少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％相同であり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０７１６】
特定の実施形態によると、ポリヌクレオチドは、配列番号８０および８２、もしくは配列番号８０および８４を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０７１７】
特定の実施形態によると、ポリヌクレオチドは、配列番号８６および８２、配列番号９０および９２、もしくは配列番号８６および８４を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０７１８】
特定の実施形態によると、ポリヌクレオチドは、配列番号１４７および８２、配列番号１４３および１３９、配列番号１４５および１４１、配列番号８６および１３９、配列番号８６および１４１、配列番号１４７および１３９、配列番号１４９および１３９、配列番号８０および１３９、配列番号１５５および１３９、配列番号８０および１５１、配列番号１５５および１５１、配列番号８０および１５３、配列番号１５７および８２、配列番号１５５および１５３、もしくは配列番号１５９および８２に示す核酸配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％相同であり、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０７１９】
特定の実施形態によると、ポリヌクレオチドは配列番号１４７および８２、配列番号１４３および１３９、配列番号１４５および１４１、配列番号８６および１３９、配列番号８６および１４１、配列番号１４７および１３９、配列番号１４９および１３９、配列番号８０および１３９、配列番号１５５および１３９、配列番号８０および１５１、配列番号１５５および１５１、配列番号８０および１５３、配列番号１５７および８２、配列番号１５５および１５３、もしくは配列番号１５９および８２を含み、それぞれの可能な態様が本発明の別個の実施形態を表す。
【０７２０】
本明細書において使用する場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、単離され、ＲＮＡ配列、相補的ポリヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ）、ゲノムポリヌクレオチド配列、および／または複合ポリヌクレオチド配列（例えば、上記の組み合わせ）の形態で提供される、一本鎖または二本鎖の核酸配列を示す。
【０７２１】
特定の実施形態によると、本願で開示する任意のポリヌクレオチドおよび核酸配列は、保存性核酸置換を有してもよい。保存的に修飾されたポリヌクレオチドとは、同一または実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指すか、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、実質的に同一の、または関連した（例えば、天然に連続した）配列を示す。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸がほとんどのタンパク質をコードする。例えば、コドンＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧ、およびＧＣＵはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。よって、アラニンがコドンによって特定されるすべての位置において、このコドンは、コードされるポリペプチドを改変することなく、記載した対応するコドンを別のものに改変することができる。このような核酸変異は「サイレント変異」であり、保存的に修飾された変異の一種である。本明細書における、ポリペプチドをコードするすべてのポリヌクレオチドおよび核酸配列は、その核酸のサイレント変異のことも表す。ある特定の文脈において、機能的に同一な分子をもたらすように核酸内の各コドン（通常はメチオニンの唯一のコドンであるＡＵＧ、および通常はトリプトファンの唯一のコドンであるＴＧＧを除く）が修飾され得ることは、当業者には認識されよう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のサイレント変異は、発現産物に関して記載される配列に

黙示されている。

【０７２２】

哺乳動物細胞において外因性ポリペプチドを発現させるためには、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、好ましくは、哺乳動物細胞での発現に好適な核酸構築物中にライゲーションする。そのような核酸構築物は、細胞におけるポリヌクレオチド配列の転写を構成的または誘導性の様式で指示するプロモーター配列を含む。

【０７２３】

特定の実施形態によると、調節因子は異種調節因子である。

【０７２４】

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物（本明細書では「発現ベクター」とも呼ばれる）は、このベクターを、原核生物、真核生物、または好ましくは両方（例えば、シャトルベクター）における複製および組み込みに好適なものにする、さらなる配列を含む。加えて、典型的なクローニングベクターは、転写および翻訳開始配列、転写および翻訳ターミネーター、ならびにポリアデニル化シグナルも含有し得る。例として、そのような構築物は、典型的には、５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、第２鎖ＤＮＡ合成起点、および３’ＬＴＲまたはその一部分を含む。

【０７２５】

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物は、典型的には、構築物が入っている宿主細胞からペプチドを分泌させるためのシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物のシグナル配列か、または本発明のいくつかの実施形態のポリペプチド変異体のシグナル配列である。

【０７２６】

真核生物プロモーターは、典型的には、ＴＡＴＡボックスおよび上流プロモーターエレメントという２種類の認識配列を含有する。転写開始部位から２５～３０塩基対上流に位置するＴＡＴＡボックスは、ＲＮＡポリメラーゼによるＲＮＡ合成の開始に関与していると考えられている。他方の上流プロモーターエレメントは、転写開始の頻度を決定する。

【０７２７】

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物に用いられるプロモーターは、形質転換された特定の細胞集団において活性を示すものが好ましい。細胞型特異的プロモーターおよび／または組織特異的プロモーターの例としては、肝臓特異的であるアルブミンなどのプロモーター［Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277］、リンパ様特異的プロモーター［Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275］、特に、Ｔ細胞受容体のプロモーター［Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733］および免疫グロブリンのプロモーター、［Banerji et al. (1983) Cell 33729-740］、ニューロン特異的プロモーター、例えば神経フィラメントプロモーター［Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477］、膵臓特異的プロモーター［Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916］、または乳腺特異的プロモーター、例えば乳清プロモーター（米国特許第４，８７３，３１６号および欧州特許出願公開第２６４，１６６号）が挙げられる。

【０７２８】

エンハンサーエレメントは、結合した相同プロモーターまたは異種プロモーターによる転写を最大で１，０００倍まで増加させることができる。エンハンサーは、転写開始部位から下流にあっても上流にあっても活性がある。ウイルスに由来する多くのエンハンサーエレメントが、広い宿主範囲を有し、種々の組織において活性を示す。例えば、ＳＶ４０初期遺伝子エンハンサーは、多くの細胞型に好適である。本発明のいくつかの実施形態に好適な他のエンハンサー／プロモーターの組み合わせとしては、ポリオーマウイルス、ヒトまたはマウスサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）に由来するものや、マウス白血病ウイルス、マウスまたはラウス肉腫ウイルス、およびＨＩＶなどの様々なレトロウイルスに由来する末端反復配列が挙げられる。参照により本明細書に組み込まれている、Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb

or, New York, 1983を参照されたい。

【０７２９】

発現ベクターの構築において、プロモーターは、その天然の環境における転写開始部位からの距離とほぼ同じ距離だけ異種の転写開始部位から離れた位置にあるのが好ましい。しかしながら、当技術分野で公知であるように、プロモーター機能を失うことなく、この距離のいくらかの差異が許容され得る。

【０７３０】

ｍＲＮＡ翻訳効率を増加させるために、ポリアデニル化配列を発現ベクターに付加することもできる。正確かつ効率的なポリアデニル化には、２つの特徴的な配列エレメントが必要である。それらは、ポリアデニル化部位の下流に位置するＧＵリッチ配列またはＵリッチ配列と、１１～３０ヌクレオチド上流に位置する、高度に保存された６つのヌクレオチドからなるＡＡＵＡＡＡ配列である。本発明のいくつかの実施形態に好適な終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルとしては、ＳＶ４０に由来するものが挙げられる。

【０７３１】

本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターは、既に記載したエレメントに加えて、典型的には、クローニングされた核酸の発現レベルを上昇させること、または組換えＤＮＡを有する細胞の識別を容易にすることを目的とした、他の特殊化したエレメントを含有し得る。例えば、いくつかの動物ウイルスは、許容細胞型におけるウイルスゲノムの染色体外複製を促進するＤＮＡ配列を含有する。こうしたウイルスのレプリコンを有するプラスミドは、プラスミド上または宿主細胞のゲノム上の遺伝子によって適切な因子が提供される限り、エピソームとして複製される。

【０７３２】

ベクターは、真核生物レプリコンを含む場合もあれば、含まない場合もある。真核生物レプリコンが存在する場合、ベクターは、適切な選択可能マーカーを使用して真核細胞において増幅可能である。ベクターが真核生物レプリコンを含まない場合、エピソームの増幅は不可能である。その代わり、組換えＤＮＡが、工学的に操作された細胞のゲノムに組み込まれ、ここでプロモーターが所望の核酸を発現せしめる。

【０７３３】

本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターは、例えば、単一のｍＲＮＡからいくつかのタンパク質を翻訳することを可能にする、さらなるポリヌクレオチド配列、例えば、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）およびプロモーターキメラポリペプチドのゲノム組み込みのための配列をさらに含むことができる。

【０７３４】

よって、特定の実施形態によると、ヘテロダイマーに含まれる両方のモノマーが1つの構築物から発現される。

【０７３５】

他の特定の実施形態によると、ヘテロダイマーに含まれるモノマーのそれぞれが異なる構築物から発現される。

【０７３６】

発現ベクターに含まれる個々のエレメントが種々の構成で配置され得ることは理解されよう。例えば、エンハンサーエレメント、プロモーターなど、そしてさらにはヘテロダイマーのモノマーをコードするポリヌクレオチド配列は、「ヘッドトゥテール」構成で配置されてもよく、逆相補鎖として、または逆平行鎖中の相補鎖として存在してもよい。このような構成の多様性は、発現ベクターの非コードエレメントで生じる可能性がより高いが、発現ベクターにおけるコード配列の代替的な構成も考えられる。

【０７３７】

哺乳動物の発現ベクターの例としては、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社から入手可能なｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＧＬ３、ｐＺｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＳｅｃＴａｇ２、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＳｉｎＲｅｐ５、ＤＨ２６Ｓ、ＤＨＢＢ、ｐＮＭＴ１、ｐＮＭＴ４１

、ｐＮＭＴ８１、Ｐｒｏｍｅｇａ社から入手可能なｐＣＩ、Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ社から入手可能なｐＭｂａｃ、ｐＰｂａｃ、ｐＢＫ－ＲＳＶ、およびｐＢＫ－ＣＭＶ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社から入手可能なｐＴＲＥＳ、ならびにこれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０７３８】

レトロウイルスなどの真核生物ウイルスに由来する調節エレメントを含有する発現ベクターを使用することもできる。ＳＶ４０ベクターには、ｐＳＶＴ７およびｐＭＴ２が含まれる。ウシパピローマウイルスに由来するベクターとしては、ｐＢＶ－１ＭＴＨＡが挙げられ、エプスタイン・バーウイルスに由来するベクターとしては、ｐＨＥＢＯおよびｐ２Ｏ５が挙げられる。他の例示的なベクターとしては、ｐＭＳＧ、ｐＡＶ００９／Ａ＋、ｐＭＴＯ１０／Ａ＋、ｐＭＡＭｎｅｏ－５、バキュロウイルスｐＤＳＶＥ、および、ＳＶ－４０初期プロモーター、ＳＶ－４０後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核細胞における発現に有効であることが報告されている他のプロモーターの指示の下で、タンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが挙げられる。

【０７３９】

前述のように、ウイルスは、多くの場合、宿主の防御機構を回避するように進化してきた、非常に特殊化した感染性因子である。典型的には、ウイルスは特定の細胞型に感染し、伝播する。ウイルスベクターの標的化特異性は、所定の細胞型を特異的に標的とする天然の特異性を用いることにより、組換え遺伝子を感染細胞に導入する。よって、本発明のいくつかの実施形態によって使用するベクターの種類は、形質転換される細胞型によって決まる。形質転換する細胞型によって好適なベクターを選択する能力は十分に当業者の能力の範疇にあり、したがって本明細書では、選択に関する検討事項の概説は提供しない。例えば、骨髄細胞は、ヒトＴ細胞白血病ウイルスＩ型（ＨＴＬＶ－Ｉ）を使用して標的化することができ、腎臓細胞は、Liang CY et al., 2004 (Arch Virol. 149: 51-60)に記載の、バキュロウイルスであるAutographa californica核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に存在する異種プロモーターを使用して標的化することができる。

【０７４０】

組換えウイルスベクターは、水平感染および標的化特異性などの利点をもたらすため、モノマーおよびヘテロダイマーのｉｎ　ｖｉｖｏ発現に有用である。水平感染は、例えばレトロウイルスの生活環に固有であり、単一の感染細胞が出芽して隣接細胞に感染する、多くの子孫ビリオンを生成するプロセスである。その結果、広い範囲が急速に感染し、そのほとんどは、最初は元のウイルス粒子に感染していなかったものである。これは、感染性因子が娘子孫を通してのみ伝播する垂直型の感染と対照的である。水平に伝播することができないウイルスベクターを作製することもできる。この特徴は、特定の遺伝子を限局的な数の標的細胞のみに導入することが所望の目的である場合には有用であり得る。

【０７４１】

本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターを細胞に導入するためには、様々な方法を使用することができる。そのような方法は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)、Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)、Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995)、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988)、およびGilboa et at. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]に概説されており、例えば、安定トランスフェクションまたは一過性トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、および組換えウイルスベクターによる感染を含む。加えて、陽性－陰性の選択方法に関しては、米国特許第５，４６４，７６４号および同第５，４８７，９９２号の明細書を

参照されたい。

【０７４２】

ウイルス感染による核酸の導入には、リポフェクションおよび電気穿孔などの他の方法と比べていくつかの利点がある。これは、ウイルスの感染性の性質のため、より高いトランスフェクション効率を得ることができるからである。

【０７４３】

現在好ましいｉｎ　ｖｉｖｏでの核酸移入技術としては、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ型、またはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、および脂質ベースの系といった、ウイルス構築物または非ウイルス構築物のトランスフェクションが挙げられる。脂質を介した遺伝子の移入に有用な脂質は、例えば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、およびＤＣ－Ｃｈｏｌである［Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14 (1): 54-65 (1996)］。遺伝子療法において使用するのに最も好ましい構築物はウイルスであり、最も好ましくはアデノウイルス、ＡＡＶ、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。レトロウイルス構築物などのウイルス構築物は、少なくとも１つの転写プロモーター／エンハンサーまたは遺伝子座決定エレメント、またはメッセンジャーの選択的スプライシング、核ＲＮＡ輸送、もしくは翻訳後修飾といった他の手段によって遺伝子発現を制御する他のエレメントを含む。そのようなベクター構築物は、ウイルス構築物に既に存在する場合を除き、パッケージングシグナル、末端反復配列（ＬＴＲ）またはその一部分、ならびに使用されるウイルスに適切なプラス鎖およびマイナス鎖のプライマー結合部位も含む。加えて、そのような構築物は、典型的には、構築物が入っている宿主細胞からペプチドを分泌させるためのシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物のシグナル配列か、または本発明のいくつかの実施形態のポリペプチド変異体のシグナル配列である。任意選択で、構築物は、ポリアデニル化をもたらすシグナル、ならびに１つまたは複数の制限部位および翻訳終結配列を含んでもよい。例として、そのような構築物は、典型的には、５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、第２鎖ＤＮＡ合成起点、および３’ＬＴＲまたはその一部分を含む。カチオン性脂質、ポリリジン、およびデンドリマーなど、ウイルスではない他のベクターを使用してもよい。

【０７４４】

既に述べたように、本発明のいくつかの実施形態の発現構築物は、挿入されるコード配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含有する他にも、発現されるモノマーまたはヘテロダイマーの安定性、生成、精製、収率、または毒性を増進するように工学的に操作された配列を含むこともできる。例えば、本発明のいくつかの実施形態のモノマーまたはヘテロダイマーと異種タンパク質とを含む融合タンパク質または切断可能な融合タンパク質の発現を工学的に操作することができる。そのような融合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーにより、例えば、異種タンパク質に対して特異的なカラムに固定化することにより、融合タンパク質が容易に単離され得るように設計することができる。本発明のいくつかの実施形態のモノマーまたはヘテロダイマーと異種タンパク質との間に切断部位を工学的操作によって設けた場合、切断部位を破壊する適切な酵素または薬剤を用いて処理することにより、クロマトグラフィーカラムからモノマーまたはヘテロダイマーを遊離させることができる［例えば、Booth et al. (1988) Immunol. Lett. 19:65-70、およびGardella et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:15854-15859を参照されたい］。

【０７４５】

本発明は、本明細書に記載の構築物を含む細胞も企図する。

【０７４６】

よって、本発明の一態様によると、ヘテロダイマー、またはヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステムを含む、宿主細胞を提供する。

【０７４７】

本明細書で前述したように、本発明のいくつかの実施形態のヘテロダイマーを発現させ

るための宿主発現系として、種々の原核細胞または真核細胞を使用することができる。これらは、コード配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、またはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換した細菌、コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母などの微生物、コード配列を含有する、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ、タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）に感染させた、またはＴｉプラスミドなどの組換えプラスミド発現ベクターで形質転換した、植物細胞系を含むが、これらに限定されない。哺乳動物の発現系を使用して、本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドを発現させることもできる。

【０７４８】

細菌構築物の例としては、ｐＥＴシリーズのＥ．ｃｏｌｉ発現ベクターが挙げられる（Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89）。

【０７４９】

本発明の教示と併せて使用され得る真核細胞の例としては、哺乳動物細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、藻細胞、または植物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【０７５０】

酵母においては、米国特許出願第５，９３２，４４７号明細書に開示されているように、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含有するいくつかのベクターを使用することができる。代替的には、酵母染色体への外来ＤＮＡ配列の組み込みを促進するベクターを使用してもよい。

【０７５１】

植物発現ベクターを使用する場合、いくつかのプロモーターによってコード配列の発現を駆動することができる。例えば、ＣａＭＶの３５Ｓ　ＲＮＡおよび１９Ｓ　ＲＮＡプロモーターなどのウイルスプロモーター［Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514］、またはＴＭＶのコートタンパク質プロモーター［Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311］を使用することができる。代替的には、植物プロモーター、例えばＲＵＢＩＳＣＯの小サブユニット［Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680およびBrogli et al., (1984) Science 224:838-843］、または熱ショックプロモーター、例えばダイズｈｓｐ１７．５－Ｅまたはｈｓｐ１７．３－Ｂ［Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565］を使用してもよい。これらの構築物は、Ｔｉプラスミド、Ｒｉプラスミド、植物ウイルスベクター、直接ＤＮＡ形質転換、マイクロインジェクション、電気穿孔、および当業者に周知の他の技術を使用して、植物細胞に導入することができる。例えば、Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463を参照されたい。

【０７５２】

当技術分野で周知である昆虫および哺乳動物の宿主細胞系といった他の発現系も、本発明のいくつかの実施形態によって使用され得る。

【０７５３】

特定の実施形態によると、細胞は、哺乳動物細胞である。

【０７５４】

特定の実施形態によると、細胞は、ヒト細胞である。

【０７５５】

特定の実施形態によると、細胞は、細胞株である。

【０７５６】

別の特定の実施形態によると、細胞は、初代細胞である。

【０７５７】

細胞は、血液、筋肉、神経、脳、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、毛髪、皮膚、骨、乳房、子宮、膀胱、脊髄、または様々な種類の体液を含むがこれらに限定されない、好適な組織に由来し得る。細胞は、胚期、胎生期、および成体期を含む任意の発生段階、ならびに任意の発生起源、即ち外胚葉起源、中胚葉起源

、および内胚葉起源に由来してよい。

【０７５８】

哺乳動物細胞の非限定的な例としては、ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ、例えばＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）、ヒト胎児由来腎臓株（ＨＥＫ２９３細胞または懸濁培養下で増殖させるためにサブクローニングしたＨＥＫ２９３細胞、Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 1977）、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）、マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 1980）、サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）、ヒト子宮頸癌細胞（ＨｅＬａ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）、ＮＩＨ３Ｔ３、Ｊｕｒｋａｔ、イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　３４）、バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）、ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ　８０６５）、マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）、ＴＲＩ細胞（Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 1982）、ＭＲＣ　５細胞、ＦＳ４細胞、ならびにヒト肝細胞腫株（Ｈｅｐ　Ｇ２）、ＰＥＲ．Ｃ６、Ｋ５６２、およびチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）が挙げられる。

【０７５９】

本発明のいくつかの実施形態によると、哺乳動物細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞、ＨＴ１０８０細胞、ＮＳ０細胞、Ｓｐ２／０細胞、ＢＨＫ細胞、Ｎａｍａｌｗａ細胞、ＣＯＳ細胞、ＨｅＬａ細胞、およびＶｅｒｏ細胞からなる群より選ばれる。

【０７６０】

本発明のいくつかの実施形態によると、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞、または２９３（例えば、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ）細胞を含む。

【０７６１】

本発明の別の態様によると、本明細書に記載の核酸構築物またはシステムを宿主細胞中で発現させることを含む、ヘテロダイマーを製造する方法を提供する。

【０７６２】

特定の実施形態によると、製造は、哺乳動物細胞による発現と、３２～３７℃、５～１０％のCO_2で５～１３日の培養とを含む。

【０７６３】

本発明の特定の実施形態で使用することのできる製造条件の非限定的な例は後述する実施例の項で開示する。

【０７６４】

従って、例えば、ヘテロダイマーをコードする発現ベクターを、Ｅｘｐｉ２９３ＦまたはＥｘｐｉＣＨＯ等の哺乳動物細胞内で発現させる。その後、形質導入細胞を３２～３７℃、５～１０％のCO_2で、Ｅｘｐｉ２９３ＦまたはＥｘｐｉＣＨＯ細胞の製造社のマニュアル（Ｔｈｅｒｍｏ社）に基づく細胞特異的培養培地において続く少なくとも５日間培養し、培養上清からタンパク質を回収し、精製する。

【０７６５】

特定の実施形態によると、培養はバッチ式、スプリットーバッチ式、フィードバッチ式または潅流モードで実施する。

【０７６６】

特定の実施形態によると、培養はフィードバッチ条件で実施される。

【０７６７】

特定の実施形態によると、培養は３６．５℃で実施する。

【０７６８】

特定の実施形態によると、培養は、３６．５℃で実施され、３２℃への温度変化を伴う

。この温度変化は、定常状態に達する前に細胞の代謝を遅らせるために実施することができる。

【０７６９】

特定の実施形態によると、方法は、発現されたアミノ酸配列、即ち、Ｉ型膜タンパク質のアミノ酸配列およびＩＩ型膜タンパク質のアミノ酸配列、にダイマー化部分を付加することを含む。

【０７７０】

特定の実施形態によると、本方法は、ヘテロダイマーを単離することを含む。

【０７７１】

特定の実施形態によると、組換えヘテロダイマーの回収は、適切な時間に亘り培養した後で実施する。特定の実施形態によると、組換えヘテロダイマーの回収は、ヘテロダイマーを含有する培養培地全体を収集することを指し、必ずしもさらなる分離または精製のステップを暗示するとは限らない。特定の実施形態によると、本発明のいくつかの実施形態のヘテロダイマーは、限定されるものではないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、濾過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンＡクロマトグラフィー、ミックスモードクロマトグラフィー、金属アフィニティークロマトグラフィー、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、およびＤＳ法（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ｓｏｌｕｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）など、種々の標準的なタンパク質精製技術を使用して精製することができる。

【０７７２】

特定の実施形態によると、製造および精製に続き、ヘテロダイマーの治療有効性は、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏのいずれかで検出することができる。このような方法は当業界で知られており、例えば、細胞生存率、トランスジェニックマウスの生存、ならびに活性化マーカーの発現を挙げることができる。

【０７７３】

本発明のいくつかの実施形態の組成物（例えば、ヘテロダイマー、ヘテロダイマーをコードする核酸構築物またはシステム、および／または細胞）は、それ自体で、または組成物を好適な担体もしくは賦形剤と混合した医薬組成物として生物に投与することができる。

【０７７４】

よって、本発明は、いくつかの実施形態において、本願で開示する組成物を治療有効量で含む医薬組成物を特色とする。

【０７７５】

本明細書において、「活性成分」という用語は、生物学的効果の要因となる組成物（例えば、本明細書に記載のヘテロダイマー、核酸構築物またはシステム、および／または細胞）を示す。

【０７７６】

本明細書において、「賦形剤」という用語は、活性成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を示す。限定されるものではないが、賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類および各種のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【０７７７】

以降、交換可能に使用され得る「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という表現は、生物に著しい刺激作用をもたらさず、また、投与される化合物の生物学的活性および特性を無効にすることのない、担体または希釈剤を示す。これらの表現には、アジュバントが含まれる。

【０７７８】

本明細書において使用する場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性のある、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤およ

び吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与、または上皮投与（例えば、注射または注入による投与）に好適である。活性化合物は、投与ルートに応じて１つまたは複数の薬学的に許容される塩を含み得る。「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望まれない毒性効果を与えない塩を指す（例えば、Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照されたい）。そのような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、無毒の無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などに由来するもの、ならびに、無毒の有機酸、例えば脂肪族のモノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカノン酸、ヒドロキシアルカノン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族のスルホン酸などに由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどに由来するもの、ならびに、無毒の有機アミン、例えばＮ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどに由来するものが挙げられる。

【０７７９】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を含んでもよい。薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、（１）水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、二亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、（２）油溶性抗酸化剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ－トコフェロールなど、および（３）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが挙げられる。本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る医薬組成物は、洗剤および可溶化剤（例えば、ＴＷＥＥＮ　２０（ポリソルベート－２０）、ＴＷＥＥＮ　８０（ポリソルベート－８０））、および保存剤（例えば、チメロサール、ベンジルアルコール）、および増量物質（ｂｕｌｋｉｎｇ　ｓｕｂｓｔａｎｃｅｓ）（例えば、ラクトース、マンニトール）などの添加剤を含んでもよい。

【０７８０】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る医薬組成物に用いられ得る好適な水性および非水性の担体の例としては、水、様々なバッファー成分（例えば、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨおよびイオン強度の緩衝食塩水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、ならびにこれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。

【０７８１】

適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合は必要な粒径を維持することによって、そして界面活性剤の使用によって、維持することができる。

【０７８２】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントを含有してもよい。微生物の存在は、滅菌手順（上記参照）と、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの包含との両方によって、確実に防止することができる。糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含めることが望ましい場合もある。加えて、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの包含により、注射用医薬品形態の持続的吸収がもたらされ得る。

【０７８３】

薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液を即時調製するための滅菌粉末が含まれる。このような媒体および薬剤を薬学的活性物質に使用することは、当技術分野で公知である。いずれかの従来の媒体または薬剤が

活性化合物と不適合である場合を除き、本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る医薬組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性化合物を組成物に組み込むこともできる。

【０７８４】

治療用組成物は、典型的には、製造および保存の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、または高い薬物濃度に好適な他の秩序構造として製剤化することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合は必要な粒径の維持、そして界面活性剤の使用によって維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含めることにより、注射用組成物の持続的吸収がもたらされ得る。滅菌注射用溶液は、必要な量の活性化合物を適切な溶媒に、必要に応じて上記に列挙した成分のうちの１つまたは組み合わせと共に組み込み、続いて滅菌精密濾過を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基礎分散媒、および上記に列挙したもののうち必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに、活性化合物を組み込むことによって調製する。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。これらの方法により、予め滅菌濾過された活性成分と任意のさらなる所望の成分の溶液から、それらの粉末が得られる。

【０７８５】

滅菌注射用溶液は、必要な量の活性化合物を適切な溶媒に、必要に応じて上記に列挙した成分のうちの１つまたは組み合わせと共に組み込み、続いて滅菌精密濾過を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基礎分散媒、および上記に列挙したもののうち必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに、活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。これらの方法により、予め滅菌濾過された活性成分と任意のさらなる所望の成分の溶液から、それらの粉末が得られる。

【０７８６】

単一の剤形を作製するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、治療される対象、および特定の投与様式に応じて異なる。単一の剤形を作製するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、概して、治療効果をもたらす組成物の量である。この量は概して、１００パーセントのうち、活性成分の約０．０１パーセント～約９９パーセント、好ましくは、薬学的に許容される担体と組み合わせた活性成分の約０．１パーセント～約７０パーセント、最も好ましくは約１パーセント～約３０パーセントの範囲である。

【０７８７】

投薬レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）をもたらすように調整する。例えば、単回ボーラス投与でもよいし、いくつかの分割用量を経時的に投与してもよいし、または、治療状況の緊急性により必要に応じて用量を相対的に低減もしくは増加させてもよい。非経口組成物は、投与を容易にし投薬量を均一にするために、単位剤形で製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される単位剤形とは、治療される対象のための単位投薬量として適切な物理的に別個の単位を指し、各単位が、必要な薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の活性化合物を含有する。本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る単位剤形の仕様は、（ａ）活性化合物の独特の特徴および達成すべき特定の治療効果、ならびに（ｂ）個体の感受性を治療するためにかかる活性化合物を調合する技術分野に固有の制約によって決まり、これらに直接左右される。

【０７８８】

薬物の製剤化および投与のための技術は、参照により本明細書に組み込まれている“Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PAの最新版において確認することができる。

【０７８９】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物は、当技術分野で周知のプロセス、例えば、従来の混合、溶解、造粒、ドラジェ作製、湿式粉砕（ｌｅｖｉｇａｔｉｎｇ）、乳化、カプセル封入、捕捉、または凍結乾燥のプロセスによって製造することができる。

【０７９０】

本発明の組成物は、当技術分野で公知である種々の方法のうちの１つまたは複数を使用して、１つまたは複数の投与ルートを介して投与することができる。当業者には理解されるであろうが、投与のルートおよび／または様式は、所望の結果に応じて異なる。本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る治療剤の好ましい投与ルートとしては、血管内送達（例えば注射または注入）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、経口、経腸、直腸、肺（例えば吸入）、経鼻、局所（経皮、頬側、および舌下を含む）、膀胱内、硝子体内、腹腔内、膣内、脳送達（例えば脳室内、脳内、および対流強化拡散（ｃｏｎｖｅｃｔｉｏｎ ｅｎｈａｎｃｅｄ ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ））、ＣＮＳ送達（例えばくも膜下腔内、脊髄周囲（ｐｅｒｉｓｐｉｎａｌ）、および脊髄内）、もしくは非経口（皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内（ＩＶ）、および皮内を含む）、経皮（受動的か、またはイオン泳動もしくは電気穿孔の使用のいずれか）、経粘膜（例えば、舌下投与、経鼻、膣内、直腸、または舌下）の各種投与、またはインプラントによる投与、または例えば注射もしくは注入による他の非経口投与ルート、または当技術分野で公知の他の送達ルートおよび／もしくは投与形態が挙げられる。本明細書において使用される「非経口投与」という表現は、経腸投与および局所投与以外の投与様式を意味し、通常は注射によるものである。限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨下の注射および注入、または生体内分解性挿入物の使用を含み、各投与ルートに適切な剤形で製剤化することができる。特定の実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態に係るタンパク質、治療剤、または医薬組成物は、腹腔内または静脈内に投与することができる。

【０７９１】

特定の実施形態によると、本願で開示する組成物は水溶液として、非経口注射で投与される。製剤は、懸濁液またはエマルションの形態であってもよい。通常、非経口注射用の医薬組成物は、有効量の本願で開示する組成物を含み、任意で薬学的に許容される希釈剤保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび／または担体を含むものが提供される。このような組成物は、任意選択で、希釈剤、滅菌水、様々なバッファー内容物（例えば、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨ、およびイオン強度の緩衝食塩水、ならびに、洗剤および可溶化剤（例えば、ＴＷＥＥＮ ２０（ポリソルベート－２０）、ＴＷＥＥＮ ８０（ポリソルベート－８０））、抗酸化剤（例えば、水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、二亜硫酸ナトリウム、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、二亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、油溶性抗酸化剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、α－トコフェロール、および金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸）、および保存剤（例えば、チメロサール、ベンジルアルコール）、および増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）などの添加剤のうちの１つまたは複数を含む。非水性の溶媒またはビヒクルの例は、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油およびトウモロコシ油などの植物油、ゼラチン、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。製剤は、フリーズドライ（凍結乾燥）または真空乾燥し、使用直前に再溶解／再懸濁してもよい。製剤は、例えば、細菌保持フィルタを通して濾過すること、組成物に滅菌剤を組み込むこと、組成物を照射処理すること、または組成物を加熱すること

により、滅菌することができる。

【０７９２】

本明細書で開示する様々な組成物（例えば、ポリペプチド）は、局所適用することができる。局所投与は、ほとんどのペプチド製剤では効果的でないが、特に肺、鼻腔、口腔（舌下、頬側）、膣内、または直腸の粘膜に適用した場合には有効であり得る。

【０７９３】

本発明の組成物は、空気動力学的直径が約５ミクロン未満のエアロゾルまたは噴霧乾燥粒子のいずれかとして送達された場合、吸入中に肺に送達され、肺上皮層を横断して血流に入ることができる。治療用製剤を肺に送達するように設計された様々な機械デバイスを使用することができる。この機械デバイスは、限定されるものではないが、ネブライザー、計量式吸入器、および粉末吸入器を含み、これらはすべて、当業者にはよく知られている。市販のデバイスのいくつかの特定例は、Ｕｌｔｒａｖｅｎｔネブライザー（ミズーリ州、セントルイス、Ｍａｌｌｉｎｃｋｒｏｄｔ　Ｉｎｃ．製）、Ａｃｏｒｎ　ＩＩネブライザー（コロラド州、エングルウッド、Ｍａｒｑｕｅｓｔ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ社製）、Ｖｅｎｔｏｌｉｎ計量式吸入器（ノースカロライナ州、リサーチ・トライアングル・パーク、Ｇｌａｘｏ　Ｉｎｃ．製）、およびＳｐｉｎｈａｌｅｒ粉末吸入器（マサチューセッツ州、ベドフォード、Ｆｉｓｏｎｓ　Ｃｏｒｐ製）である。Ｎｅｋｔａｒ社、Ａｌｋｅｒｍｅｓ社、およびＭａｎｎｋｉｎｄ社の各社は、吸入可能なインスリン粉末調製物が承認されているか、またはこの技術が本明細書に記載の製剤に適用され得る臨床試験段階にある。

【０７９４】

粘膜に投与するための製剤は、典型的には、噴霧乾燥した薬物粒子であり、これは、錠剤、ゲル、カプセル、懸濁液、またはエマルションに組み込むことができる。標準的な薬学的賦形剤は、いずれの製薬会社からも入手可能である。経口製剤は、チューインガム、ゲル片、錠剤、またはロゼンジの形態であり得る。

【０７９５】

経皮製剤を調製することもできる。これらは典型的には軟膏、ローション、スプレー、またはパッチであり、これらはすべて、標準的な技術を使用して調製することができる。経皮製剤は、浸透促進剤の包含を必要とする。本発明の医薬組成物における活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に対して有毒となることなく、特定の患者、組成物、および投与様式に関して所望される治療応答を達成するために有効な量の活性成分が得られるように変更してもよい。選択する投薬量レベルは、用いる特定の本発明の組成物の活性、投与ルート、投与時間、用いる特定の化合物の排泄速度、治療の期間、用いる特定の組成物と併用する他の薬物、化合物、および／または材料、治療する患者の年齢、性別、体重、状態、全体的な健康、および過去の病歴を含む種々の薬物動態学的要因、ならびに医学分野で周知である同様の要因に依存する。

【０７９６】

特定の実施形態によると、本明細書で開示する組成物を治療有効量で対象に投与する。本明細書において使用する場合、「有効量」または「治療有効量」という用語は、治療されている障害の１つまたは複数の症状を治療、阻害、もしくは緩和するのに十分であるか、さもなければ所望の薬理的効果および／または生理学的効果をもたらすのに十分な投薬量を示す。治療有効量の決定は、特に、本明細書に提供する詳細な開示内容を踏まえれば、当業者の能力の範囲内である。

【０７９７】

本発明の方法において使用される任意の製剤について、治療上有効な量または用量は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび細胞培養アッセイから最初に推定され得る。例えば、用量は、所望の濃度または力価を達成するように動物モデルにおいて処方され得る。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。本明細書に記載の有効成分の毒性および治療効力は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、細胞培養物で、または実験動物で、標準医薬手順によって決定され得る。これらのｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび細胞培養ア

ッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおいて使用するための投与量の範囲の処方において使用され得る。投与量は、使用される投与形態および利用される投与経路に応じて変わり得る。正確な処方、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択され得る（例えば、“The Pharmacological Basis of Therapeutics,” Ch. 1 p.1のFingl et al. (1975)を参照）。

【０７９８】

投与量および投与間隔は、有効成分のレベルが、生物学的効果を誘導または抑制するのに十分な量（最小有効濃度、ＭＥＣ）となるように、個別に調整することができる。ＭＥＣは、各製剤によって変化するが、ｉｎ ｖｉｔｒｏデータから推定することができる。ＭＥＣを達成するのに必要な投与量は、個々の特徴および投与経路に応じて変化する。血漿中濃度を調べるために、検出アッセイが使用され得る。

【０７９９】

治療されるべき状態の重症度および応答性に応じて、投与量は、数日から数週間持続する治療の過程で、または治癒が達成されるもしくは疾患状態の消失が達成されるまでに、単回または複数回投与のものであり得る。

【０８００】

投与する組成物の量は、当然ながら、治療される対象、苦痛の重症度、投与方式、担当医師の判断などに依存するものである。

【０８０１】

ある特定の実施形態では、組成物（例：ヘテロダイマー、核酸構築物またはシステム、または細胞）は、例えば、治療すべき部位に直接注射することにより、局所投与される。典型的には、注射により、組成物の局所濃度が、全身投与によって達成され得る濃度よりも高い濃度に上昇する。ヘテロダイマー組成物を前述のマトリックスと組み合わせると、治療すべき部位から出るポリペプチドの受動的拡散を低減させることにより、ポリペプチド組成物の局所濃度の上昇をもたらすのに役立ち得る。

【０８０２】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で公知の医療デバイスを用いて投与することができる。例えば、任意選択の実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る医薬組成物は、米国特許第５，３９９，１６３号、同第５，３８３，８５１号、同第５，３１２，３３５号、同第５，０６４，４１３号、同第４，９４１，８８０号、同第４，７９０，８２４号、または同第４，５９６，５５６号の明細書に開示されているデバイスなどの、無針皮下注射デバイスを用いて投与することができる。本発明において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例としては、制御された速度で薬物を分注するための植込み型微量注入ポンプを開示する米国特許第４，４８７，６０３号明細書、皮膚を通して薬品を投与するための治療デバイスを開示する米国特許第４，４８６，１９４号明細書、精確な注入速度で薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示する米国特許第４，４４７，２３３号明細書、持続的な薬物送達のための流量可変植込み型注入装置を開示する米国特許第４，４４７，２２４号明細書、マルチチャンバコンパートメントを有する浸透圧性薬物送達系を開示する米国特許第４，４３９，１９６号明細書、および浸透圧性薬物送達系を開示する米国特許第４，４７５，１９６号明細書が挙げられる。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。このようなインプラント、送達系、およびモジュールは、他にも多くが当業者に公知である。

【０８０３】

活性化合物は、化合物の急速な放出を防ぐ担体と共に調製することができ、これは例えば徐放性製剤であり、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など、生分解性、生体適合性ポリマーを使用してもよい。このような製剤を調製するための多くの方法が特許取得済みであるか、または一般的に当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【０８０４】
ポリマーデバイス（ロッド、シリンダー、フィルム、ディスク）の植込みまたは注射（微粒子）の後に長期にわたって全身に放出するための徐放性ポリマーデバイスを製造することができる。マトリックスは、ペプチドが固体ポリマーマトリックス中に分散したマイクロスフェア、または、コアがポリマーシェルとは異なる材料からなり、ペプチドがコア内に分散もしくは懸濁されたマイクロカプセル（このコアは、実質的に液体であっても固体であってもよい）などの、微粒子の形態であり得る。本明細書において明確に定義されない限り、微粒子、マイクロスフェア、およびマイクロカプセルは、交換可能に使用される。代替的には、ポリマーは、数ナノメートルから４センチメートルまでの範囲の薄いスラブまたはフィルムとしてキャスティングしてもよいし、粉砕もしくは他の標準的な技術によって作製された粉末であってもよいし、またはヒドロゲルなどのゲルであってもよい。

【０８０５】
本願で開示する活性成分を送達するには、生分解性ではないマトリックスまたは生分解性であるマトリックスのいずれを使用してもよいが、生分解性であるマトリックスが好ましい。これらは天然ポリマーであっても合成ポリマーであってもよいが、合成ポリマーの分解および放出プロファイルの特徴がより良好であるため、合成ポリマーが好ましい。ポリマーは、放出が所望される期間に基づいて選択する。場合によっては、線形放出が最も有用であり得るが、他の場合では、パルス放出または「バルク放出」がより有効な結果をもたらし得る。ポリマーは、ヒドロゲル（典型的には最大約９０重量％の水を吸収する）の形態であってよく、任意選択で、多価イオンまたはポリマーと架橋させてもよい。

【０８０６】
マトリックスは、溶媒蒸発、噴霧乾燥、溶媒抽出、および当業者に公知の他の方法によって形成することができる。生体内分解性マイクロスフェアは、例えば、Mathiowitz and Langer, J. Controlled Release, 5:13-22 (1987)、Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 6:275-283 (1987)、およびMathiowitz, et al., J. Appl Polymer ScL, 35:755-774 (1988)に記載されているような、薬物送達のためのマイクロスフェアを作るために開発された方法のうちのいずれを使用して調製してもよい。

【０８０７】
これらのデバイスは、典型的には体全体の治療のための投薬量よりも大幅に低い投薬量を送達する植込みもしくは注射した領域を治療する局所放出用に製剤化してもよいし、全身送達用に製剤化してもよい。これらのデバイスは、皮下、筋肉内、脂肪内に植込みまたは注射してもよいし、嚥下してもよい。

【０８０８】
ある特定の実施形態では、本発明の少なくともいくつかの実施形態に係る治療用化合物がＢＢＢを通過することを確実にするために（所望される場合）、これらの治療用化合物は、例えばリポソームで製剤化することができる。リポソームの製造方法については、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号、同第５，３７４，５４８号、および同第５，３９９，３３１号の明細書を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器に選択的に輸送されることにより、標的の薬物送達を増進する、１つまたは複数の部分を含み得る（例えば、V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。例示的な標的化部分としては、葉酸塩またはビオチン（例えば、Ｌｏｗらの米国特許第５，４１６，０１６号を参照されたい）、マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）、抗体（P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140、M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）、界面活性剤プロテインＡ受容体（Briscoe et al. (1995) Am. J Physiol. 1233:134）、ｐ１２０（Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）が挙げられる。K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123、J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照されたい。

【０８０９】
本発明のいくつかの実施形態の組成物は、所望の場合、活性成分を含有する１つまたは複数の単位剤形を含み得る、ＦＤＡ承認キットなどのパックまたはディスペンサーデバイスとして提供することができる。パックは、例えば、金属箔またはプラスチック箔、例えばブリスターパックを含み得る。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与に関する説明書が付属していてもよい。パックまたはディスペンサーには、医薬品の製造、使用、または販売を規制する行政機関が規定した形態における、容器に付随した通知が収容されていてもよい。この通知は、組成物の形態またはヒトもしくは動物への投与が当該機関によって承認されたことを反映するものである。このような通知は、例えば、米国食品医薬品局によって承認された処方薬のラベル、または承認された製品の添付文書に関するものであり得る。また、適合性のある薬学的担体において製剤化された本発明の調製物を含む組成物を調製し、適切な容器に入れ、詳細に前述した適応症状の治療に関するラベルを付してもよい。
【０８１０】
本明細書において使用する場合、「約」という用語は、±１０％を示す。
【０８１１】
「具備する（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「具備している（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」という用語およびその活用形は、「限定されるものではないが、含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ　ｔｏ）」を示す。
【０８１２】
「からなる」という用語は、「含み、限定される」ことを示す。
【０８１３】
「から実質的になる」という用語は、組成物、方法または構造が追加の成分、工程および／または部分を含み得ることを示す。但しこれは、追加の成分、工程および／または部分が、請求項に記載の組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特性を実質的に変更しない場合に限られる。
【０８１４】
本明細書において、単数形を表す「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数をも対象とする。例えば、「化合物（ａ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ）」または「少なくとも１種の化合物」には、複数の化合物が含まれ、それらの混合物をも含み得る。
【０８１５】
本願全体を通して、本発明のさまざまな実施形態は、範囲形式にて示され得る。範囲形式での記載は、単に利便性および簡潔さのためであり、本発明の範囲の柔軟性を欠く制限ではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、可能な下位の範囲の全部、およびその範囲内の個々の数値を特異的に開示していると考えるべきである。例えば、１～６といった範囲の記載は、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６等の部分範囲のみならず、その範囲内の個々の数値、例えば１、２、３、４、５および６も具体的に開示するものとする。これは、範囲の大きさに関わらず適用される。
【０８１６】
本明細書において数値範囲を示す場合、それは常に示す範囲内の任意の引用数（分数または整数）を含むことを意図する。第１の指示数と第２の指示数「との間の範囲」という表現と、第１の指示数「から」第２の指示数「までの範囲」という表現は、本明細書で代替可能に使用され、第１の指示数および第２の指示数と、それらの間の分数および整数の全部を含むことを意図する。
【０８１７】
本明細書で使用する「方法」という用語は、所定の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を意味し、化学、薬理学、生物学、生化学および医療の各分野の従事者に既知のもの、または既知の様式、手段、技術および手順から従事者が容易に開発できるも

のが含まれるが、これらに限定されない。

【０８１８】

特定の配列表を参照する場合、そのような参照は、例えば、シーケンシングエラー、クローニングエラー、または塩基置換、塩基欠失、もしくは塩基付加をもたらす他の改変に起因する、わずかな配列変化を含む相補的配列に実質的に対応する配列も包含するものと理解されたい。ただし、そのような変化の頻度は、５０ヌクレオチド中１未満、代替的には１００ヌクレオチド中１未満、代替的には２００ヌクレオチド中１未満、代替的には５００ヌクレオチド中１未満、代替的には１０００ヌクレオチド中１未満、代替的には５，０００ヌクレオチド中１未満、代替的には１０，０００ヌクレオチド中１未満であることを条件とする。

【実施例】

【０８１９】

上記で列挙し、下記の特許請求の範囲に記載した本発明の種々の実施形態および態様について、次の実施例が実験的根拠を示す。

【０８２０】

本明細書において使用される命名法および本発明に使用する実験手順としては、通常、分子的技術、生化学的技術、微生物学的技術および組換えＤＮＡ技術が挙げられる。このような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989)、"Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)、Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)、Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)、Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York、Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)、米国特許第４，６６６，８２８号明細書、第４，６８３，２０２号明細書、第４，８０１，５３１号明細書、第５，１９２，６５９号明細書、および第５，２７２，０５７号明細書に記載された方法、"Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)、"Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition、"Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)、Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)、Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)を参照されたい。利用可能なイムノアッセイは、特許および科学文献に広く記載されており、例えば、米国特許第３，７９１，９３２号、同第３，８３９，１５３号、同第３，８５０，７５２号、同第３，８５０，５７８号、同第３，８５３，９８７号、同第３，８６７，５１７号、同第３，８７９，２６２号、同第３，９０１，６５４号、同第３，９３５，０７４号、同第３，９８４，５３３号、同第３，９９６，３４５号、同第４，０３４，０７４号、同第４，０９８，８７６号、同第４，８７９，２１９号、同第５，０１１，７７１号、および同第５，２８１，５２１号の明細書、"Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984)、“Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)、"Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984)、"Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986)、"Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986)、"A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984)および"Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press、"PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990)、Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (19

96)を参照されたい。上記文献の全てが、本参照により本明細書に完全に組み込まれるものとする。その他の一般的な参考文献は、本明細書を通じて提供される。それらに記載の手順は、当技術分野で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供する。それらに含まれるすべての情報が、本参照により本明細書に組み込まれる。

【０８２１】

実施例１

ＦＣで結合された２種または３種のタンパク質を含むヘテロダイマータンパク質のバリアントの選択

下記を含有するヘテロダイマータンパク質の構造解析を実施した：

・ＰＤ１の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）および４－１ＢＢＬのＥＣＤの３つの繰り返しを含む単鎖（本願において「ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬ」と称する）がＦＣ鎖で連結されたもの（本願において「ＤＳＰ３０５」と称する、配列番号７９および８１）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＰＤ１、ＳＩＲＰαおよびｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ１１１」と称す、配列番号８５および８１）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＰＤ１、ＳＩＲＰαおよびｓｃ３ｘＣＤ４０ＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ１１２」と称す、配列番号８１および１４６）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＬＩＬＲＢ２、ＳＩＲＰαおよびｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ２１５」と称す、配列番号１３８および８５）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＬＩＬＲＢ２、ＳＩＲＰαおよびｓｃ３ｘＣＤ４０ＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ２１７」と称す、配列番号１３８および１４６）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＳＩＧＬＥＣ１０、ＳＩＲＰαおよびｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ４０１」と称す、配列番号１５０および７９）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＴＩＧＩＴ、ＰＤ１およびｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ５０１」と称す、配列番号１５２および７９）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＬＩＬＲＢ２、ＰＤ１および３ｘｓｃＣＤ４０ＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ２２２」と称す、配列番号１３８および１５４）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＳＩＧＬＥＣ１０、ＰＤ１および３ｘｓｃＣＤ４０ＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ４０３」と称す、配列番号１５０および１５４）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＴＩＧＩＴ、ＰＤ１および３ｘｓｃＣＤ４０ＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ５０３」と称す、配列番号１５２および１５４）、

・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＰＤ１、ＴＩＧＩＴおよび３ｘ

ｓｃ４－１ＢＢＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ５０１Ｖ１」と称す、配列番号８１および１５６）、あるいは
・Ｎ末端シグナルペプチド（配列番号９５）およびｈＩｇＧ４の「ノブ・イントゥ・ホール」含有ＦＣ（配列番号１１０および１１１）を含む、ＰＤ１、ＴＩＧＩＴおよび３ｘｓｃＣＤ４０ＬのそれぞれのＥＣＤがＦＣ鎖で連結された組み合わせ（本願において「ＴＳＰ５０３Ｖ１」と称す、配列番号８１および１５８）。

【０８２２】

上記構造解析は、以下のパラメーターの最適化のために行った：
・フォールディング： 標的への結合を可能にし、潜在的ジスルフィド結合のスクランブリングを最小化する、正しいフォールディング、
・完全性： タンパク質分解性部位の露出無し、
・哺乳動物発現システムにおける高発現、および
・低い免疫原性。

【０８２３】

ホモログＸ線構造に基づき、各部分のホモロジーモデリングを実施した。ＰＤ１－ＰＤＢのＩＤには、３ＲＲＱ、５ＧＧＲ、５ＧＧＳ、５ＪＸＥおよび４ＺＱＫをテンプレートとして使用した。ｈＩｇＧ４－ＰＤＢのＩＤには、４Ｃ５４、４Ｃ５５、５Ｗ５Ｍおよび５Ｗ５Ｎをテンプレートとして使用した。４１ＢＢ－Ｌ－ＰＤＢのＩＤには、６ＣＰＲ、６Ａ３Ｖおよび６ＣＵ０をテンプレートとして使用した。ＳＩＲＰα－ＰＤＢのＩＤには、２ＵＶ３、２ＷＮＧ、４ＣＭＭ、６ＢＩＴ、２ＪＪＳおよび２ＪＪＴをテンプレートとして使用した。リンカーセグメントは、構造違反を防止し、可能な「スペーサー」長のもっともらしい概算を可能にするために、主としてＣＨＡＲＭＭのループモデリングを用いてモデル化した。ＣＤ４０Ｌ－ＰＤＢのＩＤには、１ＡＬＹ、１Ｉ８Ｒ、３ＬＫＪおよび３ＱＤ６をテンプレートとして使用した。ＬＩＬＲＢ２－ＰＤＢのＩＤには、２ＧＷ５、４ＬＬＡ、２ＤＹＰおよび６ＢＣＰをテンプレートとして使用した。ＳＩＧＬＥＣ１０－ＰＤＢのＩＤには、ＳＩＧＬＥＣ８ホモログの２Ｎ７Ａおよび２Ｎ７Ｂをテンプレートとして使用した。ＴＩＧＩＴ－ＰＤＢのＩＤには、３ＱＯＨ、３ＲＱ３、３ＵＣＲ、３ＵＤＷおよび５Ｖ５２をテンプレートとして使用した。

【０８２４】

図３および図６は、リガンド（ＣＤ４７、ＰＤＬ１および４－１ＢＢ）の有りおよび無しの条件で作製した、ＰＤ１－Ｆｃ－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマー（図３）またはＳＩＲＰα－ＰＤ１－Ｆｃ－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマー（図６）から同定されたドメインおよびセグメントの３Ｄモデルを示す。図１２Ａ～１６Ｃは、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－ｓｃ３ｘＣＤ４０ＬヘテロダイマーＦＩＧ１２Ａ～Ｃ）、ＬＩＬＲＢ２－Ｆｃ－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマー（図１３Ａ～Ｃ）、ＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－ｓｃ３ｘＣＤ４０ＬヘテロダイマーＦＩＧ１４Ａ～Ｃ）、ＳＩＧＬＥＣ１０－ＰＤ１－Ｆｃ－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマー（図１５Ａ～Ｃ）またはＴＩＧＩＴ－ＰＤ１－Ｆｃ－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマー（図１６Ａ～Ｃ）に関する、ヘテロダイマーの模式図およびヘテロダイマーから同定されたドメインおよびセグメントから作製した３Ｄモデルを示す。この解析はリガンドへの可能な結合および異なるドメイン間に干渉がないことを予測した。構造解析は、ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬ内の３つの４－１ＢＢＬアミノ酸配列の繰り返しの間の内部（ＧＧＧＧＳ）×２＋ＧＧＧＧ（配列番号９６）リンカーおよびｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ内の３つのＣＤ４０Ｌアミノ酸配列の繰り返しの間の内部（ＧＧＧＧＳ）×３（配列番号１３６）リンカーが、このような結合を容易にすることも示した。

【０８２５】

<u>実施例２</u>

ヘテロダイマーの製造

比較機能解析および製造評価のために、「ノブ」イントゥ「ホール」法（米国特許第８，２１６，８０５号明細書に記載）を用いて、以下の複数のヘテロダイマーを製造した：

本願で「ＤＳＰ３０５」（配列番号７９および８１）および「ＤＳＰ３０５＿Ｖ１」（配列番号７９および８３）と称するＰＤ１－Ｆｃ－３ｘＳｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ１１１」（配列番号８５および８１）、「ＴＳＰ１１１＿Ｖ１」（配列番号８９および９１）および「ＴＳＰ１１１＿Ｖ２」（配列番号８５および８３）と称するＰＤ１－ＳＩＲＰａ－Ｆｃ－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ１１２」（配列番号８１および１４６）と称するＰＤ１－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー、本願で「ＤＳＰ２１４」（配列番号１３８および１４２）および「ＤＳＰ　２１４　Ｖ１」（配列番号１４０および１４４）と称するＬＩＬＲＢ２－ＰＤ１－Ｆｃ－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ２１５」（配列番号１３８および８５）および「ＴＳＰ２１５　Ｖ１」（配列番号１４０および８５）と称するＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ２１７」（配列番号１３８および１４６）と称するＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー、本願で「ＤＳＰ２１８」（配列番号１３８および１４８）と称する２ｘＬＩＬＲＢ２－Ｆｃ－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ２２１」（配列番号１３８および７９）と称するＬＩＬＲＢ２－ＰＤ１－Ｆｃ－３ｘ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ２２２」（配列番号１３８および１５４）と称するＬＩＬＲＢ２－ＰＤ１－Ｆｃ－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ４０１」（配列番号１５０および７９）と称するＳＩＧＬＥＣ１０－Ｆｃ－ＰＤ１－３ｘｓｃ－４－１ＢＢＬヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ４０３」（配列番号１５０および１５４）と称するＳＩＧＬＥＣ１０－ＰＤ１－Ｆｃ－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー、本願で「ＴＳＰ５０１」（配列番号１５２および７９）と称するＴＩＧＩＴ－Ｆｃ－ＰＤ１－３ｘｓｃ－４－１ＢＢＬヘテロダイマー、および本願で「ＴＳＰ５０３」（配列番号１５２および１５４）と称するＴＩＧＩＴ－ＰＤ１－Ｆｃ－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー。製造したヘテロダイマーのいくつかの模式図を図２、５、１２Ａ、１３Ａ、１４Ａ、１５Ａ、１６Ａおよび３２に示した。

【０８２６】

製造は、ＤＳＰ３０５、ＤＳＰ３０５＿Ｖ１、ＴＳＰ１１１、ＴＳＰ１１１＿Ｖ１、ＴＳＰ１１１＿Ｖ２、ＴＳＰ１１２、ＤＳＰ２１４、ＤＳＰ２１４＿Ｖ１、ＴＳＰ２１５、ＴＳＰ２１５＿Ｖ１、ＴＳＰ２１７、ＤＳＰ２１８、ＴＳＰ２２１、ＴＳＰ２２２、ＴＳＰ４０１、ＴＳＰ４０３、ＴＳＰ５０１またはＴＳＰ５０３のコード配列がクローニングされたｐｃＤＮＡ３．４発現ベクターを形質転換したＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞で実施した。配列のベクターへのクローニングにはＥｃｏＲＩとＨｉｎｄＩＩＩまたはＸｂａＩとＥｃｏＲＶ制限酵素を使用し、Ｋｏｚａｋ配列および人工シグナルペプチド（ＭＥＳＰＡＱＬＬＦＬＬＬＬＷＬＰＤＧＶＨＡ、配列番号９５）を付加した。タンパク質は細胞培養上清から回収し、場合によっては、プロテインＡ（ＰＡ）Ｐｏｒｏｓ　ＭａｂＣａｐｔｕｒｅＡ樹脂またはアニオン交換Ｈｉｇｈ　Ｔｒａｐ　Ｑ　ＦＦ樹脂を用いた一工程精製でタンパク質を精製した。

【０８２７】

製造はＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した。具体的には、各サンプルの３５μｌの上清または３μｇのＰＡ精製タンパク質をβ－メルカプトエタノール含有または不含のローディングバッファー（それぞれ還元および非還元条件）と混合し、９５℃で５分間加熱し、８％または４～２０％グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動、即ち、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離した。ゲル上のタンパク質の移動は、ｅ－Ｓｔａｉｎ機構（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）を製造社の仕様書に従って使用し可視化した。

【０８２８】

図４、７および１７～１８Ｂから明らかなように、期待されたヘテロダイマーの分子量のタンパク質の大部分が非還元条件下で観察され、２つのサブユニットの発現が還元条件で確認された。ＳＤＳ－ＰＡＧＥでは低レベルの異性体（２つの「ノブ」断片または２つの「ホール」断片を含むダイマー）しか検出されなかった。

【０８２９】

同様に、いくつかの他のヘテロダイマー、具体的には、本願で「ＴＳＰ５０１　Ｖ１」（配列番号８１および１５６）と称するＰＤ１－ＴＩＧＩＴ－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、および本願で「ＴＳＰ５０３　Ｖ１」（配列番号８１および１５８）と称するＰＤ１－ＴＩＧＩＴ－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマーも上記と同様に製造し、分析した。

【０８３０】

製造したヘテロダイマーの全てを下記の実施例３～１３のそれぞれでさらに解析した。

【０８３１】

実施例３

全ドメインを含むヘテロダイマー

材料：　上記実施例２と同様に製造したヘテロダイマー。

【０８３２】

ウエスタンブロット解析用：　Ｓｐｅｃｔｒａ　ＢＲタンパク質マーカー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ｃａｔ＃２６６３４）または３色のＥｘｔｒａ　Ｒａｎｇｅタンパク質マーカー（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、ｃａｔ＃ＰＭ２８００）、Ｌａｅｍｍｅｌｉローディングバッファー（ＢｉｏＲａｄ、ｃａｔ＃１６１－０７４７）またはサンプルバッファー（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、ｃａｔ＃Ｍ００６７６）、８％または４～２０％のポリアクリルアミドゲル（ＢｉｏＲａｄ、ｃａｔ＃５５６－８０９４あるいはＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、ｃａｔ＃Ｍ００６６２またはＭ００６５６）、抗ヒト４－１ＢＢＬ（ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ、５３６９－１００）、ＰＤ１（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ、ｃａｔ＃８６１６３）、抗ヒトＰＤ１（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、ｃａｔ＃Ａ０１８２９－４０）、ビオチン化ウサギ抗ヒトＳＩＲＰα（ＬｓＢｉｏ、ｃａｔ＃ＬＳ－Ｃ３７０３３７）、抗ヒトＬＩＬＲＢ２（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、ｃａｔ＃ＭＡＢ２０７８）、抗ヒトＳＩＲＰα（ｃａｔ＃ＬＳ－Ｘ３７０３３７）ストレプトアビジン－ＨＲＰ（Ｐｉｅｒｃｅ、ｃａｔ＃ＴＳ２１１２６）、抗ヒトＳＩＧＬＥＣ１０（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、ｃａｔ＃ＡＦ２１３０）、抗ヒトＴＩＧＩＴ（ＭｙＢｉｏＳｏｕｒｃｅ、ｃａｔ＃ＭＢＳ９２１７２８５、抗ヒトＣＤ４０Ｌ（ＭｙＢｉｏＳｏｕｒｃｅ、ｃａｔ＃ＭＢＳ８４０３８７）、二次ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）－ＨＲＰ複合体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、ｃａｔ＃１７０－６５１５）、ヤギ抗マウスＩｇＧ　ＨＲＰ－複合体（Ｂｉｏ－ｒａｄ、ｃａｔ＃１７０－６５１６）およびＥＣＬ　Ｐｌｕｓウエスタンブロッティング基質（Ｐｉｅｒｃｅ、ｃａｔ＃３２１３２）。

【０８３３】

サンドウィッチＥＬＩＳＡ用：　抗４－１ＢＢＬ抗体（適合ペアからの捕捉抗体、Ａｂｎｏｖａ、＃Ｈ０００８７４４－ＡＰ４１）または抗ＣＤ４０Ｌ、抗ＰＤ１－ビオチン化抗体、抗ヒトＳＩＲＰα（ｃａｔ＃ＬＳ－Ｃ３７０３３７）、抗ヒトＳＩＧＬＥＣ１０（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、ｃａｔ＃ＡＦ２１３０）、抗ヒトＴＩＧＩＴ（ＭｙＢｉｏＳｏｕｒｃｅ、ｃａｔ＃ＭＢＳ９２１７２８５）、抗ヒトＣＤ４０Ｌ（ＭｙＢｉｏＳｏｕｒｃｅ、ｃａｔ＃ＭＢＳ８４０３８７）、ストレプトアビジンタンパク質、ＨＲＰ（＃２１１２６、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＴＭＢ基質（１－Ｓｔｅｐ（商標）Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質溶液、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、＃３４０２８）。

【０８３４】

方法：

ウエスタンブロット解析：　製造したヘテロダイマー（レーン当たり５０～５００ｎｇ）を還元または非還元条件（それぞれβ－メルカプトエタノール有りまたは無しのローディングバッファー中）で処理し、９５℃で５分間加熱し、８％または４～２０％グラジエントのＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離した。続いてタンパク質をＰＶＤＦメンブランに移動し、抗ヒト４－１ＢＢＬ、抗ＰＤ１、抗ＳＩＲＰα、抗ヒトＬＩＬＲＢ２、抗ヒトＳＩＧＬＥＣ１０、抗ヒトＴＩＧＩＴまたは抗ヒトＣＤ４０Ｌである一次抗体と共に１時間または一晩インキュベートし、次にＨＲＰ－複合体二次抗体と１時間インキュベートした。ＥＣＬ

の発生後にシグナルを検出した。

【０８３５】

サンドウィッチＥＬＩＳＡ： プレートを抗４－１ＢＢＬ捕捉抗体または抗ＣＤ４０Ｌ捕捉抗体（ＰＢＳ中に２．５μｇ／ｍｌ）で被覆し、ブロッキング溶液（ＰＢＳ、１％のＢＳＡ、０．００５％のＴｗｅｅｎ）でブロックした。産生されたヘテロダイマーをブロッキング溶液で段階希釈し、被覆したプレートに加えて２時間インキュベートし、次に検出抗体（例えば、抗ＰＤ１ビオチン化抗体または抗ＳＩＲＰαビオチン化抗体）とインキュベートし、続いて、製造社の推奨法に従い、ストレプトアビジン－ＨＲＰおよびＴＭＢ基質で検出した。プレートを４５０ｎｍのプレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ ＦＣ）で、参照を６２０ｎｍとし、解析した。

【０８３６】

結果

産生されたヘテロダイマーはその全てのドメインを含んでいた、即ち、ＴＳＰ１１１はＰＤ１、ＳＩＲＰαおよび４－１ＢＢＬドメインを含み（図１９Ａ～Ｃ）、ＴＳＰ１１２はＰＤ１およびＳＩＲＰαドメインを含み（図２０Ａ～Ｂ）、ＴＳＰ４０１は４－１ＢＢＬおよびＰＤ１ドメインを含み（図２０Ａおよび２０Ｃ）、ＴＳＰ５０１は４－１ＢＢＬおよびＰＤ１ドメインを含み（図２０Ａおよび２０Ｃ）、ＴＳＰ２２１は４－１ＢＢＬドメインを含み（図２０Ｃ）、ＤＳＰ２１４はＬＩＬＲＢ２および４－１ＢＢＬドメインを含み（図２１ＡおよびＣ）、ＤＳＰ２１４ Ｖ１は４－１ＢＢＬドメインを含み（図２１Ａ）、ＴＳＰ２１５はＬＩＬＲＢ２、ＳＩＲＰαおよび４－１ＢＢＬドメインを含み（図２１Ａ～Ｃ）、ＴＳＰ２１５ Ｖ１はＳＩＲＰα、４－１ＢＢＬドメインを含み（図２１Ａ～Ｂ）、ＴＳＰ２１７はＬＩＬＲＢ２ドメインを含み（図２１Ｃ）、そしてＤＳＰ２１８はＬＩＬＲＢ２ドメインを含む（図２１Ｃ）。

【０８３７】

実施例４

ヘテロダイマーは、細胞表面に発現された対応するリガンド／受容体に結合する

ＰＤ１部分のＰＤＬ１への結合解析

ＰＤ１ドメインおよび４－１ＢＢＬドメインを含むヘテロダイマー（例えば、ＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬヘテロダイマー、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー）のＰＤ１ドメインのヒトＰＤＬ１に対する結合を、ＰＤＬ１を過剰発現するＤＬＤ１－ＰＤＬ１細胞系を用いて決定した。ＤＬＤ１－ＷＴ細胞は低いレベルの内因性ＰＤＬ１を発現することから対照となった（図８Ａ）。細胞を異なる希釈率のヘテロダイマー含有上清とインキュベートし、続いて複合体化抗４－１ＢＢＬ抗体による免疫染色を行った。結合はフローサイトメトリーで解析した。

【０８３８】

材料： 上記実施例２と同様に製造したＰＤ１ドメインおよび４－１ＢＢＬドメインを含むヘテロダイマー。ＤＬＤ１－ＷＴ細胞系およびＤＬＤ１－ＰＤＬ１細胞系（Ｈｅｎｄｒｉｋｓ ｅｔ ａｌ ２０１６）、抗ヒトＣＤ４７（ＩｎｈｉｂＲｘ－ｌｉｋｅ、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ＡＦ６４７抗ヒトＣＤ４７（ＩｎｈｉｂＲｘ－ｌｉｋｅ、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ＡＰＣ抗ヒトＣＤ２７４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３２９７０８）、ＡＰＣマウスＩｇＧ１、ｋアイソタイプ対照（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２２）、ＡＰＣ抗４－１ＢＢＬ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３１１５０６）。

【０８３９】

方法： 細胞を、製造したヘテロダイマーを含有する上清の希釈系列と４℃で２０分間インキュベートし、次に、４－１ＢＢＬに対する複合体化抗体で免疫染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。場合によっては、上清とインキュベートする前に、細胞を抗ＣＤ４７遮断抗体とのプレインキュベーションに付した。

【０８４０】

結果： 図８Ａが示すように、ＰＤＬ１の低い内因性発現を示したＤＬＤ１ ＷＴ細胞と比べて、ＤＬＤ１－ＰＤＬ１過剰発現細胞上では高レベルのＰＤＬ１の膜発現が観察さ

れた。
【０８４１】
図８Ｃが示すように、ＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）は、用量依存的にＤＬＤ１　ＰＤＬ１過剰発現細胞を結合した。
【０８４２】
図９Ａ～Ｂが示すように、ＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）は、用量依存的にＤＬＤ１　ＷＴ細胞系およびＰＤＬ１過剰発現細胞系の両方に結合した。両方のＤＬＤ１細胞系はＣＤ４７も発現することから、ＴＳＰ１１１のＳＩＲＰαアームが主として細胞上に発現されているＣＤ４７を介してＤＬＤ１　ＷＴ細胞に結合し、一方、ＴＳＰ１１１のＰＤ１アームおよびＳＩＲＰαアームの両方が細胞表面に発現されたＰＤＬ１およびＣＤ４７タンパク質を介してＤＬＤ１　ＰＤＬ１過剰発現細胞に結合することが示唆された。
【０８４３】
図２２Ａに示されるように、ＴＳＰ４０１（配列番号１５０および７９）は、用量依存的にＤＬＤ１　ＰＤＬ１過剰発現細胞に結合した。
【０８４４】
図２２Ｂに示されるように、ＴＳＰ５０１（配列番号１５２および７９）は、用量依存的にＤＬＤ１　ＰＤＬ１過剰発現細胞に結合した。
【０８４５】
４－１ＢＢＬ部分の４－１ＢＢへの結合解析
４－１ＢＢＬドメインおよびＰＤ１またはＬＩＬＲＢ２ドメインを含むヘテロダイマー（例えば、ＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬヘテロダイマーおよびＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー）の４－１ＢＢＬドメインのヒト４－１ＢＢに対する結合を、４－１ＢＢを過剰発現するＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞系を用いて決定した。ＨＴ１０８０　ＷＴ細胞を負の対照とした。細胞を異なる希釈率のヘテロダイマー含有上清とインキュベートし、複合体化抗ＰＤ１抗体または抗ＬＩＬＲＢ２抗体による免疫染色を行った。結合はフローサイトメトリーで解析した。
【０８４６】
材料：　上記実施例２と同様に製造した、４－１ＢＢＬドメインと、ＰＤ１またはＬＩＬＲＢ２ドメインとを含むヘテロダイマー。ＨＴ１０８０　ＷＴおよびＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞（Ｗｙｚｇｏｌ ｅｔ ａｌ, ２００９）、抗ヒトＣＤ４７遮断抗体（ＩｎｈｉｂＲｘ－ｌｉｋｅ、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ＡＦ６４７標識抗ヒトＣＤ４７、抗ヒト４－１ＢＢクローンＭ１２７遮断抗体（ＢＤ、ｃａｔ＃５５２５３２）、ＡＦ６４７標識抗ヒト４－１ＢＢクローンＭ１２７、ＡＰＣ抗ヒトＣＤ８５ｄ（ＩＬＴ４）抗体クローン４１Ｄ１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３３８７０８）、ＡＰＣマウスＩｇＧ１、ｋアイソタイプ対照（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２２）、ＡＰＣ標識抗ＰＤ１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３２９９０８）。
【０８４７】
方法：　細胞を、製造したヘテロダイマーを含有する上清の希釈系列と４℃で２０～３０分間インキュベートし、次に、ＰＤ１またはＬＩＬＲＢ２に対する抗体で免疫染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。場合によっては、上清とインキュベートする前に、細胞を抗ＣＤ４７遮断抗体または抗４－１ＢＢ遮断抗体とのプレインキュベーションに付した。
【０８４８】
結果：　図８Ｂが示すように、４－１ＢＢの膜発現はＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞の表面に見られたが、ＨＴ１０８０　ＷＴ細胞には見られなかった。
【０８４９】
図８Ｄが示すように、ＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）は、ＨＴ１０８０　４－１ＢＢ過剰発現細胞に結合した。
【０８５０】
図９Ｂが示すように、ＴＳＰ１１１（配列番号８９および９１）は両方のＨＴ１０８０

－４－１ＢＢ細胞系に結合した。両方のＨＴ１０８０細胞系がＣＤ４７も発現することから、ＴＳＰ１１１の４－１ＢＢＬアームおよび／またはＳＩＲＰαアームの両方がそれらの受容体（それぞれ４－１ＢＢ、ＣＤ４７）に結合することが示唆された。

【０８５１】

図２３が示すように、ＴＳＰ４０１（配列番号１５０および７９）およびＴＳＰ５０１（配列番号１５２および７９）はＨＴ１０８０－４－１ＢＢ過剰発現細胞に結合した。

【０８５２】

図２４が示すように、ＤＳＰ２１４（配列番号１３８および１４２）はＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞系に結合した。抗４－１ＢＢ遮断抗体とのプレインキュベーションは結合を完全に防止した。

【０８５３】

図２５が示すように、ＴＳＰ２１５（配列番号１３８および８５）はＨＴ１０８０－４１ＢＢ細胞系に結合した。抗ＣＤ４７遮断抗体または抗４－１ＢＢ遮断抗体とのプレインキュベーションは結合を減少させた。抗ＣＤ４７遮断抗体および抗４１ＢＢ遮断抗体とのプレインキュベーションは結合を完全に防止した。

【０８５４】

ＳＩＲＰα部分のＣＤ４７への結合解析

ＳＩＲＰαドメインおよび４－１ＢＢＬドメインを含むヘテロダイマー（例えば、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー）のＳＩＲＰαドメインのヒトＣＤ４７に対する結合を、ヒトＣＤ４７を過剰発現するＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７細胞系を用いて決定した。ＣＨＯ－Ｋ１　ＷＴ細胞を負の対照とした。細胞を異なる希釈率のヘテロダイマー含有上清とインキュベートし、複合体化抗４－１ＢＢＬ抗体による免疫染色を行った。結合はフローサイトメトリーで解析した。

【０８５５】

材料：　上記実施例２と同様に製造した、ＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）、ＴＳＰ１１１＿Ｖ１（配列番号８９および９１）およびＴＳＰ１１１＿Ｖ２（配列番号８５および８３）。ＣＨＯ－Ｋ１細胞およびＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７細胞、抗ヒトＣＤ４７遮断抗体（ＩｎｈｉｂＲｘ－ｌｉｋｅ、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ＡＦ６４７標識抗ヒトＣＤ４７、ＡＰＣ標識マウスＩｇＧ１、ｋアイソタイプ対照（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２２）、ＡＰＣ抗４－１ＢＢＬ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３１１５０６）。

【０８５６】

方法：　細胞を、製造したヘテロダイマーを含有する上清の希釈系列と４℃で２０分間インキュベートし、次に、４－１ＢＢＬに対する抗体で免疫染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。場合によっては、ヘテロダイマーとインキュベートする前に、細胞を抗ＣＤ４７遮断抗体とのプレインキュベーションに付した。

【０８５７】

結果：　図９Ｃが示すように、ＣＤ４７の膜発現は、ＣＨＯ－Ｋ１　ＷＴ細胞と比べて、ＣＨＯ－Ｋ１　ＣＤ４７過剰発現細胞の表面に見られた。

【０８５８】

図９Ｄが示すように、ＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）は、ＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７細胞とは結合し、ＣＨＯ－Ｋ１　ＷＴ細胞とは結合しなかった。抗ＣＤ４７遮断抗体とのプレインキュベーションは、ＴＳＰ１１１のＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７細胞への結合を完全に排除した。総合すると、これら結果は、ＴＳＰ１１１のＳＩＲＰαアームのそのリガンド（ＣＤ４７）への結合を示す。

【０８５９】

ＣＤ４０Ｌ部分へのＣＤ４０への結合解析

ＣＤ４０ＬドメインおよびＰＤ１ドメインを含むヘテロダイマー（例えば、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー）のＣＤ４０Ｌドメインのヒトに対する結合を、ＣＤ４０を過剰発現するＨＴ１０８０－ＣＤ４０細胞系を用いて決定した

。内因性ＣＤ４０を発現しないため、ＨＴ１０８０　ＷＴ細胞を負の対照とした。細胞を異なる希釈率のヘテロダイマー含有上清とインキュベートし、複合体化抗ＰＤ－１抗体による免疫染色を行った。結合はフローサイトメトリーで解析した。

【０８６０】

材料：　上記実施例２と同様に製造した、ＣＤ４０ＬドメインおよびＰＤ１ドメインを含むヘテロダイマー、例えば、ＴＳＰ１１２。ＨＴ１０８０　ＷＴおよびＨＴ１０８０－ＣＤ４０細胞系（Wyzgol et al, 2009）、ＡＰＣ抗ヒトＣＤ４０抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３１３００８）、ＡＰＣマウスＩｇＧ１、ｋアイソタイプ対照（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２０）、ＡＰＣ標識抗ＰＤ１抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３２９９０８）。

【０８６１】

方法：　細胞を、製造したヘテロダイマーを含有する上清の希釈系列と４℃で２０分間インキュベートし、次に、ＰＤ－１に対する抗体で免疫染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

【０８６２】

結果：　図２６Ａが示すように、ＣＤ４０の内因性発現を示さないＨＴ１０８０　ＷＴ細胞と比べて、ＨＴ１０８０－ＣＤ４０過剰発現細胞はＣＤ４０の高レベルの膜発現を示した。

【０８６３】

図２６Ｂが示すように、ＴＳＰ１１２（配列番号８１および１４６）は、用量依存的にＨＴ１０８０－ＣＤ４０過剰発現細胞を結合した。

【０８６４】

ＴＩＧＩＴ部分のＣＤ１５５（ＰＶＲ）への結合解析

ＴＩＧＩＴドメインおよび４－１ＢＢＬドメインを含むヘテロダイマー（例えば、ＴＩＧＩＴ－Ｆｃ－ＰＤ１－３ｘＳｃ－４－１ＢＢＬヘテロダイマー）のＴＩＧＩＴドメインのヒトＣＤ１５５に対する結合を、ＣＤ１５５の内因性発現を示すＤＬＤ－１　ＷＴ細胞系を用いて決定した。内因性ＣＤ１５５を発現しないため、Ｕ９３７細胞を負の対照とした。細胞を異なる希釈率のヘテロダイマー含有上清とインキュベートし、複合体化抗４－１ＢＢＬ抗体による免疫染色を行った。結合はフローサイトメトリーで解析した。

【０８６５】

材料：　上記実施例２と同様に製造した、ＴＩＧＩＴドメインおよび４－１ＢＢＬドメインを含むヘテロダイマー、例えば、ＴＳＰ５０１。ＤＬＤ１－ＷＴ細胞系（ＡＴＣＣ、ＣＣＬ－２２１）、Ｕ９３７（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－３２５３）、ＡＰＣ抗ヒトＣＤ１５５抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３３７６１８）、ＡＰＣマウスＩｇＧ１、ｋアイソタイプ対照（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２０）、ＡＰＣ抗４－１ＢＢＬ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３１１５０６）。

【０８６６】

方法：　細胞を、製造したヘテロダイマーを含有する上清の希釈系列と４℃で２０分間インキュベートし、次に、４－１ＢＢＬに対する抗体で免疫染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

【０８６７】

結果：　図２７Ａ～Ｂが示すように、アイソタイプ対照抗体と比べて、ＤＬＤ－１　ＷＴ細胞はＣＤ１５５の高レベルの膜発現を示したが、Ｕ９３７細胞はＣＤ１５５を発現しなかった（図２７Ｂ）。

【０８６８】

図２７Ｃが示すように、ＴＳＰ５０１（配列番号１５２および７９）は、用量依存的にＤＬＤ－１　ＷＴ細胞を結合し、Ｕ９３７細胞を結合しなかった。

【０８６９】

ヘテロダイマーのヒト、マウスおよびカニクイザルの相対物に対する結合

ヘテロダイマーの関連する相対リガンド／受容体への結合を表面プラズモン共鳴（ＳＰ

Ｒ）アッセイで決定した。
【０８７０】
材料：　上記実施例２と同様に製造したヘテロダイマー。シリーズＳセンサーチップＣＭ５（ＧＥ、ｃａｔ．＃ＢＲ１００５３０）、Ａｂ捕捉キット、陰性対照タンパク質、ヒトＰＤＬ１－ｈＦｃ（Ｒ＆Ｄ、ｃａｔ．＃１５６－Ｂ７－１００）、ヒトＣＤ４７－ｈＦｃ（Ｒ＆Ｄ、ｃａｔ＃４６７０－ＣＤ－０５０）、マウスＣＤ４７－ｈＦｃ（Ｒ＆Ｄ、ｃａｔ．＃１８６６－ＣＤ－０５０）、カニクイザルＣＤ４７－ｈＦｃ（ＡＣＲＯＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、ｃａｔ．＃ＣＤ７－Ｃ５２５２）、ヒト４－１ＢＢ－ｈＦｃ（ＬｓＢｉｏ、ｃａｔ＃ＬＳ－Ｇ４０４１－１００）、マウス４－１ＢＢ－ｈＦｃ（Ｒ＆Ｄ、ｃａｔ．＃９３７－４Ｂ－０５０）、カニクイザル４－１ＢＢ－ｈＦｃ（Ｒ＆Ｄ、ｃａｔ．＃９３２４－４Ｂ－１００）、マウスＰＤＬ１、カニクイザルＰＤＬ１。
【０８７１】
方法：　ＳＰＲ解析は、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００バイオセンサー（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて実施した。製造社の推奨する標準アミンカップリングプロトコルを用いて、捕捉キットの抗体をチップの４つ全てのフローチャネル（Ｆｃ１～４）にカップリングした。非限定的な例として、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマーについては、ＰＤＬ１、ＣＤ４７および４－１ＢＢのチップへの結合をＨＢＳ－ＥＰ＋ランニングバッファー（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３）、１５０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、０．０５％のＴｗｅｅｎ２０）で行い、負の対照タンパク質を参照チャネルＦｃ１にロードし、Ｆｃ２～４にはヒト、マウスおよびカニクイザルのＰＤＬ１タンパク質をロードした。チップの自動再生に続き、チャネルＦｃ１には負の対照タンパク質、チャネルＦｃ２～４にはヒト、マウスおよびカニクイザルの４－１ＢＢをチップに再ロードした。チップの自動再生に続き、チャネルＦｃ１には負の対照タンパク質、チャネルＦｃ２～４にはヒト、マウスおよびカニクイザルのＣＤ４７をチップに再ロードした。相対物の結合に続いて、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬ－バリアントの被検体を４つのチャネルすべてに流した。この工程を、種々の濃度のＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬ被検体によって５０μｌ／分の流速で繰り返した。各サイクルの終わりには、捕捉分子を除去して活性表面を再生するために３ＭのＭｇＣｌ$_2$溶液を（２０μｌ／分で４５秒間）注入した。結合パラメーターはＢｉａＥｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウエアｖ．３．０．２（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）の動的１：１結合モデルを用いて評価した。ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬには同じ方法を、ＣＤ４７の不存在下で適応した。同様に、ヒト、カニクイザルおよびマウス由来の関連する相対リガンド／受容体組換えタンパク質を用いて各ヘテロダイマーを研究した。
【０８７２】
実施例５
ヘテロダイマーは相対物のリガンド／受容体を同時に結合する
ヘテロダイマーのその相対リガンド／受容体への結合（例えば、ＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬおよびＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマーの場合は、ＰＤ１のＰＤＬ１へ、４－１ＢＢＬの４－１ＢＢへおよびＳＩＲＰαのＣＤ４７への結合、ＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマーの場合は、４－１ＢＢＬの４－１ＢＢへ、ＬＩＬＲＢ２のＨＬＡ－ＧへおよびＳＩＲＰαのＣＤ４７への結合）を、サンドウィッチＥＬＩＳＡに基づくアッセイで試験した。このアッセイは、ヘテロダイマータンパク質の異なるバリアントの機能的性質を比較するためにも使用した。
【０８７３】
材料：　上記実施例２と同様に製造したヘテロダイマー。ヒト組換えＰＤＬ１（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ヒト組換えＣＤ４７（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ヒト組換えＨＬＡ－Ｇ（Ａｂｃａｍ）、ビオチン複合体化ヒト組換え４－１ＢＢタンパク質（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ウサギ抗ヒトＳＩＲＰα抗体（抗薬剤抗体ＤＳＰ１０７）、ＨＲＰ複合体化ストレプトアビジンタンパク質（ｃａｔ＃２１１２６、Ｔｈｅｒｍｏｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質溶液（Ｓｉｇｍａ、Ｃａｔ＃Ｔ０４４０）およびＴＭＢ停止溶液（

Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ、ｃａｔ＃０４１２－０１）。

【０８７４】

方法： 組換えＣＤ４７タンパク質、ＰＤＬ１タンパク質、ＨＬＡ－Ｇタンパク質または等モル量の２種のタンパク質の混合物と４℃で一晩インキュベートすることで９６ウェルプレートをプレ被覆した。ブロッキングおよび洗浄に続き、製造したＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬ、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬ、２ｘＬＩＬＲＢ２－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬまたはＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマーを含有する上清を段階希釈したものを関連するプレ被覆ウェルに加えた。さらなる洗浄工程に続き、ビオチン化４－１ＢＢまたはウサギ抗抗ＳＩＲＰα抗体を加え、各ヘテロダイマーの４－１ＢＢＬアームまたはＳＩＲＰαアームへの結合を実行せしめた。プレートを再び洗浄し、ストレプトアビジン－ＨＲＰまたはヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体－ＨＲＰを加えた。検出は、プレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ ＦＣ）を用いた標準ＥＬＩＳＡプロトコルに従い、ＴＭＢ基質で実施した。

【０８７５】

結果： 図１０Ａが示すように、ＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）はＰＤＬ１被覆プレートに濃度依存的に結合した。

【０８７６】

図１０Ｂが示すように、ＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）は、ＣＤ４７被覆プレートおよびＰＤＬ１被覆プレートの両方に濃度依存的に結合し、ＣＤ４７およびＰＤＬ１の混合物で被覆したプレートにも結合した。興味深いことに、混合タンパク質被覆プレートに対する結合の方が高く、両方のアーム（ＳＩＲＰαおよびＰＤ１）が関与したときにより強い結合が得られることを示唆していた。対照上清はいずれの被覆プレートにも結合しなかった。

【０８７７】

図２８Ａが示すように、ＤＳＰ２１４（配列番号１３８および１４２）のＨＬＡ－Ｇへの結合は、用量依存的に４１ＢＢ－ビオチンを介して検出され、ＬＩＬＲＢ２アームおよび４－１ＢＢＬアームがそれらの標的に結合することを示唆した。陰性対照上清には結合が観察されなかった。

【０８７８】

図２８Ｂ～Ｃが示すように、ＴＳＰ２１５（配列番号１３８および８５）のＨＬＡ－ＧまたはＣＤ４７への結合は、用量依存的に４１ＢＢ－ビオチンを介して検出され、ＬＩＬＲＢ２アーム、ＳＩＲＰαアームおよび４－１ＢＢＬアームがそれらの標的に結合することを示唆した。ＢＳＡのみで被覆した対照プレートに結合は観察されなかった。

【０８７９】

実施例６

４－１ＢＢまたはＣＤ４０のヘテロダイマーによる活性化

４－１ＢＢ受容体の活性化

４－１ＢＢＬドメインを含む製造したヘテロダイマー（例えば、ＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬヘテロダイマー、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、ＳＩＧＬＥＣ１０－Ｆｃ－ＰＤ１－３ｘＳｃ－４－１ＢＢＬヘテロダイマーおよびＴＩＧＩＴ－Ｆｃ－ＰＤ１－３ｘＳｃ－４－１ＢＢＬヘテロダイマー）による４－１ＢＢ受容体仲介シグナル伝達の活性化を、４－ＢＢＬ過剰発現ＨＴ１０８０細胞系（ＨＴ１０８０－４－１ＢＢ）を用いて決定した。細胞表面の４－１ＢＢ受容体に４－１ＢＢＬが結合すると、シグナル伝達経路が活性化されて、ＩＬ８の分泌がもたらされる（Ｗｙｚｇｏｌ ｅｔ ａｌ., ２００９, Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）。この目的のために、段階希釈したヘテロダイマー含有上清の存在下で細胞を一晩インキュベートした。インキュベーションは、関連するタンパク質、例えば、ＣＤ４７、ＰＤＬ１、ＣＤ２４、ＣＤ１５５または等モル量の２種の関連するタンパク質の混合物、でプレ被覆した９６ウェルプレート内で実施した。活性化ＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞から培養培地へのＩＬ８分泌はＥＬＩＳＡで決定した。

【０８８０】
材料：　上記実施例２と同様に製造した、４－１ＢＢＬドメインを含むヘテロダイマー。ヒト組換えＰＤＬ１（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ヒト組換えＣＤ４７（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）、ヒト組換えＰＤＬ１－Ｆｃタグ付き（ＡＣＲＯ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ、ｃａｔ＃ＰＤ１－Ｈ５２５８）、ヒト組換えＣＤ２４－Ｈｉｓタグ付き（ＡＣＲＯ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ、ｃａｔ＃ＣＤ４－Ｈ５２Ｈ３）、ヒト組換えＣＤ１５５　Ｈｉｓタグ付き（ＡＣＲＯ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ、ｃａｔ＃ＣＤ５－Ｈ５２２３）、ＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞、ＩＬ－８　ＥＬＩＳＡキット（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４３１５０７）、ＤＭＥＭ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、ｃａｔ＃０１－０５５－１Ａ）、ＲＰＭＩ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、ｃａｔ＃０１－１００－１Ａ）、ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、ｃａｔ＃１０２７０１０６）、抗４－１ＢＢ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３５９８１０）、アイソタイプＩｇＧ１、ｋ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２２）。

【０８８１】
方法：　ＤＳＰ３０５およびＴＳＰ１１１に対しては組換えＣＤ４７またはＰＤＬ１または等モル量の両方のタンパク質の混合物、ＴＳＰ４０１に対してはＰＤＬ１およびＣＤ２４、ＴＳＰ５０１に対してはＰＤＬ１およびＣＤ１５５と、４℃で一晩インキュベートすることで９６ウェルプレートをプレ被覆した。洗浄に続き、製造したＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬヘテロダイマー、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー、ＳＩＧＬＥＣ１０－Ｆｃ－ＰＤ１－３ｘＳｃ－４－１ＢＢＬヘテロダイマーまたはＴＩＧＩＴ－Ｆｃ－ＰＤ１－３ｘＳｃ－４－１ＢＢＬヘテロダイマーを含有する上清を段階希釈したものを関連するプレ被覆ウェルに加え、３７℃で１時間インキュベートし、次にＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞（ウェル当たり１００００個）を３７℃で２４時間加えた。インキュベーションに続いて、製造社のプロトコルに従い、ＩＬ８　ＥＬＩＳＡキットで上清のＩＬ８濃度を決定した。プレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ　ＦＣ）を４５０ｎｍ（参照は５４０ｎｍ）で使用し、上清のＩＬ－８濃度について解析した。４－１ＢＢ受容体のＨＴ１０８０　４－１ＢＢ細胞上の発現は、抗４－１ＢＢ抗体による細胞の免疫染色で決定し、解析をフローサイトメトリーで実施した。

【０８８２】
結果：　図８Ｂが示すように、ＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞は実際に関連する受容体４－１ＢＢを高レベルで発現した。図１１Ａ～Ｃおよび図２９Ａ～Ｂが示すように、ＤＳＰ３０５（配列番号７９および８１）、ＴＳＰ１１１（配列番号８５および８１）、ＴＳＰ１１１＿Ｖ１（配列番号８９および９１）またはＴＳＰ１１１＿Ｖ２（配列番号８５および８３）、ＴＳＰ４０１（配列番号１５０および７９）またはＴＳＰ５０１（配列番号１５２および７９）を含有する上清は、シグナル伝達を用量依存的に誘導することが可能であり、その結果、ＨＴ１０８０－４１ＢＢ細胞からＩＬ８が分泌された。

【０８８３】
未形質転換Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞の対照上清の存在下でＨＴ１０８０－４１ＢＢ細胞をインキュベートしたときには、ＩＬ８分泌は観察されなかった。

【０８８４】
興味深いことに、ＣＤ４７およびＰＤ１組換えタンパク質の混合物で被覆したプレート内で細胞および試験したＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマーをインキュベートしたときに、ＩＬ８分泌レベルはより高かく、これは両方のアーム（ＳＩＲＰαとＰＤ１）が関与するときにより強い結合が得られることを示した。

【０８８５】
ＣＤ４０受容体の活性化
ＣＤ４０Ｌドメインを含む製造したヘテロダイマー（例えば、ＰＤ１－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－３ｘＳｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー、ＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－３ｘＳｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマーおよびｌｉｌｒｂ２－Ｆｃ－３ｘＳｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー

）によるＣＤ４０受容体仲介シグナル伝達の活性化を、ＣＤ４０過剰発現ＨＴ１０８０細胞系（ＨＴ１０８０－ＣＤ４０）を用いて決定した。細胞表面のＣＤ４０受容体にＣＤ４０Ｌが結合すると、シグナル伝達経路が活性化されて、ＩＬ８の分泌がもたらされる（Ｗｙｚｇｏｌ ｅｔ ａｌ., ２００９, Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）。この目的のために、段階希釈したヘテロダイマー含有上清の存在下で細胞を一晩インキュベートした。インキュベーションは、関連するタンパク質、例えば、ＣＤ４７、ＰＤＬ１、ＨＬＡ－Ｇまたは等モル量の２種の関連するタンパク質の混合物、でプレ被覆した９６ウェルプレート内で実施した。活性化ＨＴ１０８０－ＣＤ４０細胞から培養培地へのＩＬ８分泌はＥＬＩＳＡで決定した。

【０８８６】

材料：　上記実施例２と同様に製造したヘテロダイマー。ヒト組換えＣＤ４７（ＡＣＲＯ、ｃａｔ＃ＣＤ７－Ｈ５２２７）、ヒト組換えＰＤＬ１－Ｆｃタグ付き（ＡＣＲＯ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ、ｃａｔ＃ＰＤ１－Ｈ５２５８）、ヒト組換えＨＬＡ－Ｇ（Ａｂｃａｍ、ｃａｔ＃ａｂ２２５６６０）、ＨＴ１０８０－ＣＤ４０細胞、ＩＬ－８　ＥＬＩＳＡキット（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４３１５０７）、ＤＭＥＭ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、ｃａｔ＃０１－０５５－１Ａ）、ＲＰＭＩ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、ｃａｔ＃０１－１００－１Ａ）、ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、ｃａｔ＃１０２７０１０６）、抗ＣＤ４０抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３１３００８）、アイソタイプＩｇＧ１、ｋ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２０）。

【０８８７】

方法：　ＴＳＰ１１１に対しては組換えＣＤ４７またはＰＤＬ１、ＴＳＰ２１７に対してＨＬＡ－ＧまたはＣＤ４７、ＤＳＰ２１８に対してＨＬＡ－Ｇと、４℃で一晩インキュベートすることで９６ウェルプレートをプレ被覆した。洗浄に続き、製造したＰＤ１－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－３ｘＳｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマー、ＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－Ｆｃ－３ｘＳｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマーまたはｌｉｌｒｂ２－Ｆｃ－３ｘＳｃＣＤ４０Ｌヘテロダイマーを含有する上清を段階希釈したものを関連するプレ被覆ウェルに加え、３７℃で１時間インキュベートし、次にＨＴ１０８０　ＣＤ４０細胞（ウェル当たり１００００個）を３７℃で２４時間加えた。インキュベーションに続いて、製造社のプロトコルに従い、ＩＬ８　ＥＬＩＳＡキットで上清のＩＬ８濃度を決定した。プレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ　ＦＣ）を４５０ｎｍ（参照は５４０ｎｍ）で使用し、上清のＩＬ－８濃度について解析した。ＣＤ４０受容体のＨＴ１０８０　ＣＤ４０細胞上の発現は、抗ＣＤ４０抗体による細胞の免疫染色で決定し、解析をフローサイトメトリーで実施した。

【０８８８】

結果：　図２６Ａが示すように、ＨＴ１０８０－ＣＤ４０細胞は実際に関連する受容体ＣＤ４０を高レベルで発現した。図３０Ａ～Ｂが示すように、ＴＳＰ１１２（配列番号８１および１４６）、ＴＳＰ２１７（配列番号１３８および１４６）またはＤＳＰ２１８（配列番号１３８および１４８）を含有する上清は、シグナル伝達を用量依存的に誘導することが可能であり、その結果、ＨＴ１０８０－ＣＤ４０細胞からＩＬ８が分泌された。

【０８８９】

実施例７

リガンド－受容体結合の遮断に対するヘテロダイマーの効果

ヘテロダイマーは、標的細胞上に発現された内因性リガンド／受容体と本来の受容体／リガンドとの相互作用を遮断するように設計された。

【０８９０】

よって、例えば、関連ヘテロダイマー（例えば、ＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬヘテロダイマーまたはＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー）のＰＤ１部分は、Ｔ細胞上に発現された内因性ＰＤ１と、腫瘍細胞上に発現されたＰＤＬ１との相互作用を遮断するように設計された。この目的のために、製造したヘテロダイマーの上記相互作用に対する遮断剤としての効果を評価した。プレート（Ａｃｒｏ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅ

ｍｓ、ｃａｔ．　＃ＥＰ１０１）を組換えヒトＰＤＬ１で一晩被覆した。続いて、プレートを洗浄し、異なる濃度の製造したヘテロダイマー（例えば、ＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬまたはＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬ）あるいは陽性対照である抗ＰＤ１抗体と１時間インキュベートした。ビオチン化ＰＤ１を加え、さらに１時間のインキュベーションを続けた。インキュベーションの後、プレートを洗浄し、標準ＥＬＩＳＡプロトコルに従って、ストレプトアビジン－ＨＲＰおよびＴＭＢ基質でブロッティングを実施した。プレート４５０ｎｍのプレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ　ＦＣ）（参照は６２０ｎｍ）でプレートを解析した。

【０８９１】

ＣＤ１５５－ＴＩＧＩＴ、ＳＩＧＬＥＣ１０－ＣＤ２４、ＬＩＬＲＢ２－ＨＬＡ－Ｇ、ＣＤ４７－ＳＩＲＰα、４－１ＢＢＬ－４－１ＢＢおよび／またはＬＩＬＲＢ２－ＨＬＡ－Ｇの結合を遮断する効果を評価するために、同様に関連ヘテロダイマーの遮断活性を研究した。

【０８９２】

実施例８

４－１ＢＢＬドメインまたはＣＤ４０Ｌドメインを含むヘテロダイマーによるＰＢＭＣまたはＴ細胞の活性化

Ｔ細胞の活性化には、２種のシグナル、即ち、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の抗原提示細胞（ＡＰＣ）上の主要組織適合複合体（ＭＨＣ）／ペプチド複合体への連結、およびＴ細胞上の共刺激受容体とＡＰＣ上の対応リガンドとの架橋、が必要である。４－１ＢＢは、４－１ＢＢＬへの連結の際に、ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔ細胞の両方の増殖、生存、分化およびサイトカイン発現を促進するＴ細胞共刺激受容体である。ＣＤ４０およびＣＤ４０Ｌは炎症促進性免疫応答において重要な役割を担う共刺激分子である。ＣＤ４０Ｌは活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞によって主として発現され、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のＣＤ４０に結合し、ＡＰＣの活性化を誘導する。次にＡＰＣは、細胞傷害性Ｔリンパ球を刺激する。

【０８９３】

Ｔ細胞の活性化を決定するための複数の方法が当業界で公知であり、下記が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０８９４】

・Ｔ細胞表面の活性化マーカー（例えば、ＣＤ２５、ＣＤ６９、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ１３７、ＣＤ１０７ａ、ＰＤ１等）の発現。活性化マーカーの発現は、細胞の特異的抗体による染色およびフローサイトメトリー解析（ＦＡＣＳ）で試験する。

【０８９５】

・炎症性サイトカイン（例えば、ＩＬ２、ＩＬ６、ＩＬ８、ＩＮＦガンマ等）の分泌。サイトカインの分泌はＥＬＩＳＡで試験する。

【０８９６】

・Ｔ細胞をＣＦＳＥ（カルボキシフルオレセインスクシニイミジルエステル）または他の細胞増殖染料で予備染色し、ＦＡＣＳで決定されるＣＦＳＥ希釈によって細胞の偏差を決定することで測定する増殖。増殖は、経時的に写真を撮影するＩｎｃｕｃｙｔｅ装置と、特定のソフトウエアによる写真の解析によっても決定する。

【０８９７】

・癌細胞を予めカルセイン－ＡＭ試薬で標識し、培養培地中に放出されたカルセインを発光プレートリーダーで測定することで得られる、標的細胞（例えば、癌細胞）の殺滅。殺滅は、標識標的細胞を使用するＩｎｃｕｃｙｔｅ装置と、カスパーゼ感受性蛍光基質によっても決定する。

【０８９８】

実施例９

ヘテロダイマーのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果

製造したヘテロダイマー（例えば、ＰＤ１－４－３ｘｓｃ１ＢＢＬおよびＳＩＲＰα－

ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬ）の癌の治療における効率を試験するために、３種の異なるｉｎ　ｖｉｖｏマウスモデルを使用した。

【０８９９】

１．ヒト幹細胞またはヒトＰＢＭＣまたは固定化ヒトＰＢＭＣと、ヒト腫瘍細胞とを接種したＮＳＧマウス。このモデルでは、ヘテロダイマーは、関連するヒトの相同受容体／リガンド（例えば、腫瘍および免疫細胞上に発現されたＰＤＬ１）と、ヒト免疫細胞上に発現された４－１ＢＢまたはＣＤ４０と相互作用する。

【０９００】

２．ヒト腫瘍細胞を接種したヌードＳＣＩＤマウス。このモデルでは、関連するヘテロダイマーは、マウスおよびヒトのＣＤ４７（腫瘍細胞上に発現されている）と相互作用し、ヘテロダイマーのマウスマクロファージ活性に対する効果を試験した。

【０９０１】

３．ヒト幹細胞およびヒト腫瘍細胞を接種したＮＳＧマウス。このモデルでは、ヘテロダイマーは、腫瘍および／または免疫細胞上に発現された関連する相同受容体／リガンドと相互作用する。例えば、ＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬについては、ヘテロダイマーはマウスおよびヒトのＣＤ４７（腫瘍および免疫細胞上に発現）と相互作用し、ヒトＴ細胞上の４－１ＢＢとも相互作用する。ヘテロダイマーの免疫細胞および腫瘍成長に対する効果を試験した。

【０９０２】

４．ＭＣ３８マウス結腸癌腫または他の癌細胞系またはヒト関連相同体（例えば、ＰＤＬ１　および／またはＣＤ４７）を過剰発現する癌細胞系を接種した、Ｃ５７ＢＬ／６、即ち、ヒト４－１ＢＢノックインマウス。このモデルでは、マウス４－１ＢＢ細胞外ドメインをヒト４－１ＢＢのそれと置換しているため、ヘテロダイマーはマウスＴ細胞上に発現されたヒト４－１ＢＢと相互作用することができる。ヘテロダイマーは腫瘍細胞上に発現されたマウスおよびヒトのＰＤＬ１および／またはＣＤ４７と相互作用する。

【０９０３】

５．試験したヘテロダイマーの代用タンパク質を発現する同系マウス腫瘍モデル。例えば、このモデルにおいては、ＰＤ１ドメインを含むヘテロダイマーを試験するとき、ヘテロダイマーは腫瘍細胞上のマウスＰＤＬ１と相互作用する。

【０９０４】

全モデルにおいて、マウスは、静脈内（ＩＶ）、腹腔内（ＩＰ）、皮下（ＳＣ）または同所性に腫瘍細胞を接種されている。腫瘍が検知可能（約８０ｍｍ^3）になったら、製造したヘテロダイマー（例えば、４－３ｘｓｃ１ＢＢＬヘテロダイマーおよびＳＩＲＰα－ＰＤ１－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマー）を異なる用量および異なるレジメで使用し、マウスをＩＶ、ＩＰ、ＳＣまたは同所性に処置した。

【０９０５】

マウスの体重および臨床兆候を追跡した。１週間に数回、腫瘍をカリパスで測定し、腫瘍体積は式：Ｖ＝長さ×幅^2／２に基づき計算した。マウスの体重は毎日測定した。腫瘍成長および生存率は実験全体を通じてモニタリングした。

【０９０６】

腫瘍内の免疫細胞の浸潤およびサブタイピングは、腫瘍の切除またはリンパ節の抜き取り、消化、および特異的抗体による染色およびフローサイトメトリー解析を用いた免疫表現型決定で試験した。加えて、または代わりに、腫瘍を切除し、パラフィンに包埋し、切片化して特異的抗体による免疫組織学的染色し、免疫細胞の浸潤または腫瘍の壊死グレードを決定した。

【０９０７】

賭殺時には、Ｈ＆ＥおよびＩＨＣ染色用にマウスの臓器を回収し、パラフィンブロックに包埋した。

【０９０８】

下記の試験のために、一般的な手順に従い、異なる時点でマウスから血液サンプルを採

取した。ＰＫ解析、血漿中のサイトカインの測定、循環中の血液細胞副集団のＦＡＣＳプロファイリング、血液学的試験、血清化学試験、抗薬物抗体（ＡＤＡ）解析、および中和抗体解析（ＮＡＢ）。

【０９０９】

実施例１０

ＨＴ１０８０－４１ＢＢ細胞とＣＨＯ－ＣＤ４７細胞の共培養におけるＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマーによる４－１ＢＢの活性化

材料：　上記実施例２と同様に製造したＴＳＰ２１５。ＨＴ１０８０－４１ＢＢ細部、ＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７細胞、ＩＬ－８　ＥＬＩＳＡキット（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４３１５０７）、ＤＭＥＭ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、ｃａｔ＃０１－０５５－１Ａ）、ＦＢＳ（Ｒｈｅｎｉｕｍ、ｃａｔ＃１０２７０１０６）、ＡＰＣ抗４１ＢＢ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３０９８１０）、ＡＰＣ抗ＣＤ４７抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃３４３１２４）、ＡＰＣアイソタイプＩｇＧ１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、ｃａｔ＃４００１２０）。

【０９１０】

方法：　ＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７細胞を９６ウェルプレートに植え付けた。段階希釈したヘテロダイマー含有上清を加えて３７℃で１時間インキュベートし、次にＨＴ１０８０－４１ＢＢ細胞を加え、３７℃で一晩インキュベートした。製造社のプロトコルに従い、ＩＬ８　ＥＬＩＳＡキットで上清のＩＬ８濃度を決定した。プレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ　ＦＣ）を４５０ｎｍ（参照は５４０ｎｍ）で使用し、上清のＩＬ－８濃度について解析した。ＣＤ４７発現および細胞系上の４－１ＢＢ受容体を抗ＣＤ４７および抗４１ＢＢ抗体による免疫染色で決定し、解析をフローサイトメトリーで実施した。

【０９１１】

結果：　製造したＬＩＬＲＢ２－ＳＩＲＰα－３ｘｓｃ４－１ＢＢＬヘテロダイマーであるＴＳＰ２１５による４－１ＢＢ受容体仲介シグナル伝達の活性化は、４－ＢＢＬ過剰発現ＨＴ１０８０細胞系（ＨＴ１０８０－４１ＢＢ）を用いて決定した。４－１ＢＢＬのこれら細胞表面の４－１ＢＢ受容体への結合の際には、架橋に依存してシグナル伝達経路が活性化されて、ＩＬ８の分泌がもたらされる（Ｗｙｚｇｏｌ ｅｔ ａｌ., ２００９, Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）。ＳＩＲＰαアームによる架橋を提供するために、ＣＤ４７（ＣＨＯ－Ｋ１－ＣＤ４７）を過剰発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞を９６ウェルプレートに植え付けた。段階希釈したＴＳＰ２１５をその上に加え、続いてＨＴ１０８０－４１ＢＢ細胞を加えた。活性化ＨＴ１０８０－４－１ＢＢ細胞の培養培地へのＩＬ８分泌を一晩の共培養後に決定した。

【０９１２】

図３１に示されるように、ＴＳＰ２１５は用量依存的にＩＬ８の放出を引き起こし、架橋に続きＣＤ４７を介して４１ＢＢ／４１ＢＢＬ中枢（ａｘｉｓ）を活性化することを示唆した。

【０９１３】

実施例１１

Ｍ－ＣＳＦ依存性マクロファージ成熟に対する、関連ヘテロダイマーのＬＩＬＲＢ２アームの効果

ヘテロダイマーのＬＩＬＲＢ２アームは、マクロファージおよび樹状細胞等のＡＰＣ上に発現されている内因性ＬＩＬＲＢ２と、それに対して腫瘍または免疫細胞上に発現されたＨＬＡ－Ｇとの相互作用に対して競合するまたは相互作用を遮断することで、誘導される免疫抑制シグナルを遮断するように設計されている。Ｍ１様マクロファージは抗腫瘍活性を示し、一方、Ｍ２マクロファージは、腫瘍進行の促進について報告されている。Ｍ－ＣＳＦ依存性マクロファージ成熟の際のアンタゴニスト様抗体によるＬＩＬＲＢ２の遮断は、ＣＤ１４およびＣＤ１６３の発現が低く、より丸く、強く結合したＭ１様（抗腫瘍）表現型をもたらすことが示された。作製したマクロファージのＬＰＳによる刺激後には、

プロ炎症性サイトカインであるＴＮＦαの分泌の増強および抗炎症性ＩＬ－１０の分泌の減少が検出された。

【０９１４】

このために、製造したＬＩＬＲＢ２ヘテロダイマーのＭ－ＣＳＦ依存性マクロファージ成熟に対する効果を、フローサイトメトリーに基づくＣＤ１４およびＣＤ１６３の検出およびＬＰＳで前処理したマクロファージの刺激後のＴＮＦαおよびＩＬ－１０放出の測定によって評価した。

【０９１５】

材料： 上記実施例２と同様に製造したヘテロダイマー、ＣＤ１４またはＣＤ３３磁気マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、Ｃａｔ＃１３０－０４５－５０１またはＣａｔ＃１３０－０４５－５０１）、ＲＰＭＩ １６４０（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、Ｃａｔ＃０１－１００－１Ａ）、ＦＣＳ（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ＃１２６５７－０２９、Ｍ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｃａｔ＃２１６－ＭＣ）、ＴｒｉｐＬＥ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｃａｔ＃１２６０４－０１３）、ＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｃａｔ＃Ｌ１６６８－５ＭＧ）、ＩＬ－４（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｃａｔ＃２０４－ＩＬ）、ＰＥ抗ヒトＣＤ１４抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃３６７１０４）、ＦＩＴＣ抗ヒトＣＤ１６３抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃３３３６１８、ＩＬ－１０ ＥＬＩＳＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｔ＃８８－７１０６）、ＩＮＦα ＥＬＩＳＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｔ＃８８－７３４６）。

【０９１６】

方法： 健常なボランティアの血液サンプルからＰＢＭＣを密度勾配遠心法で単離し、次に赤血球の塩化アンモニウム溶解を実施した。

【０９１７】

アッセイ用に、単離したＰＢＭＣから（例えば、ＣＤ１４またはＣＤ３３磁気マイクロビーズを用いたＭＡＣＳソーティングで）単球を富化した。４８ウェルプレートにウェル当たり２０，０００の単球を植え付け、製造したヘテロダイマーの存在下または不存在下、Ｍ－ＣＳＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）を添加したＲＰＭＩ １６４０培養培地＋１０％のＦＣＳ中で、５～７日間、マクロファージ（Ｍ０）に分化させた。マクロファージの一部をＴｒｉｐＬＥで剥がし、ＣＤ１４およびＣＤ１６３発現について染色した。残りの部分はＬＰＳ（５０ｎｇ／ｍＬ）およびＩＬ－４（２５ｎｇ／ｍＬ）で一晩刺激し、ＩＬ－１０およびＩＮＦ－αの上清への放出をＥＬＩＳＡで測定した。

【０９１８】

実施例１２

ＳＩＲＰαドメインまたはＬＩＬＲＢ２ドメインを含むヘテロダイマーのマクロファージおよび多形核細胞に対する効果

既に述べたように、ヘテロダイマーのＳＩＲＰα部分は、腫瘍細胞上のＣＤ４７と内因性ＳＩＲＰαとの相互作用と競合または遮断することで、マクロファージおよび顆粒球等のＡＰＣ上に発現される内因性ＳＩＲＰαに向けてＣＤ４７発現腫瘍細胞によって誘導される「私を食べないで（ｄｏｎ’ｔ ｅａｔ ｍｅ）」シグナルを遮断するように設計されている。この「私を食べないで」シグナルの遮断が腫瘍細胞の食作用を誘導する。

【０９１９】

ヘテロダイマーのＬＩＬＲＢ２部分は、腫瘍または免疫細胞上に発現されているＨＬＡ－Ｇと内因性ＬＩＬＲＢ２との相互作用と競合または遮断することで、マクロファージおよびＤＣ等のＡＰＣ上に発現される内因性ＬＩＬＲＢ２に向けて腫瘍または免疫細胞によって誘導される免疫抑制シグナルを遮断するように設計されている。このＨＬＡ－Ｇの「私を食べないで」シグナルの遮断が腫瘍細胞の食作用を誘導し、免疫細胞間の阻害性ＨＬＡ－Ｇ－ＬＩＬＲＢ２シグナル伝達を防止し、その結果、食作用が促進される。

【０９２０】

腫瘍細胞に対するヒトマクロファージまたは多形核細胞（ＰＭＮ）の食作用に対する製

造したＳＩＲＰαヘテロダイマーの効果、および腫瘍細胞に対するヒトマクロファージまたはＤＣの食作用に対する製造したＬＩＬＲＢ２ヘテロダイマーの効果を、フローサイトメトリーに基づく解析または蛍光顕微鏡で評価した。

【０９２１】

材料：　上記実施例２と同様に製造したヘテロダイマー。ＣＤ１４磁気マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、Ｃａｔ＃１３０－０４５－５０１）、ＲＰＭＩ　１６４０（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、Ｃａｔ＃０１－１００－１Ａ）、ＦＣＳ（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ＃１２６５７－０２９、Ｍ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｃａｔ＃２１６－ＭＣ）、ＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｃａｔ＃７９５４－ＧＭ／ＣＦ、ＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｃａｔ＃Ｌ１６６８－５ＭＧ）、ＩＮＦ－γ（ＭＢＬ、Ｃａｔ＃ＪＭ－４１１６－１００）、ＩＬ－４（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｃａｔ＃２０４－ＩＬ）、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）ＣＦＳＥ細胞増殖キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｔ＃Ｃ３４５５４）、ＰＥＲＣＰ／Ｃｙ５．５抗ヒトＣＤ１１ｂ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃３０１３２８）、ＰＥ　Ｃｙ７抗ヒトＨＬＡ－ＤＲ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃３６１７０８）、ＡＰＣ抗ヒトＣＤ４７抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃３２３１２４）、ＦＩＴＣ抗ヒトＨＬＡ－Ｇ抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｔ＃ａｂ２３９３３４）、リツキシマブ、セツキマブ、リンパ腫などの異なる癌腫由来のヒト癌細胞系（例：ＳＵＤＨＬ６、Ｒａｍｏｓ）および固形腫瘍由来のヒト癌細胞系（例：ＤＬＤ－１：直腸癌腫、Ａ５４９：肺癌腫およびＭＤＡＭＢ２３１：三種陰性乳癌）、ＨＬＡ－Ｇを過剰発現する癌細胞系および陰性対照としての非発現細胞。

【０９２２】

方法：　健常なボランティアの血液サンプルから多形核細胞（ＰＭＮ）およびＰＢＭＣを密度勾配遠心法で単離し、次に赤血球の塩化アンモニウム溶解を実施した。ＰＭＮアッセイ用に、細胞膜性または細胞基質性染料で癌細胞を標識し、単離したＰＭＮと混合した。混合培養物を、製造したヘテロダイマー単独で、または治療用抗体（例えば、リツキシマブまたはセツキマブ）と組み合わせて処理した。癌細胞に対する食作用の後、ＰＭＮをフローサイトメトリーで解析した。

【０９２３】

マクロファージの解析には、単離したＰＢＭＣから（例えば、ＣＤ１４磁気マイクロビーズを用いたＭＡＣＳソーティングで）さらに単球を富化した。ＧＭ－ＣＳＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）およびＭ－ＣＳＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）を添加したＲＰＭＩ　１６４０培養培地＋１０％のＦＣＳ中で、７日間、マクロファージ（Ｍ０）に分化させた。１型マクロファージ（Ｍ１）を産生するために、Ｍ０細胞をＬＰＳおよびＩＦＮ－γでさらに２４時間刺激した。単球を５０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦおよび２０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－４を添加したＲＰＭＩ　１６４０培養培地＋１０％のＦＣＳ中で、７日間、単球由来ＤＣに分化させた。癌細胞を細胞膜性または細胞基質性染料で癌細胞を標識し、単離し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで分化させたＩ型マクロファージ（Ｍ１）またはＤＣと混合した。混合培養物を、製造したヘテロダイマー単独で、または治療用抗体と組み合わせて処理した。インキュベーションに続き、飲み込まれなかった腫瘍細胞を洗浄して取り出し、マクロファージを癌細胞とは異なる色の抗ＣＤ１１ｂ抗体（Ｍ１）または抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体（ＤＣ）で染色した。マクロファージまたはＤＣによる癌細胞に対する食作用をフローサイトメトリーで解析した。他の実験では、食作用は以下の方法でＩｎｃｕｃｙｔｅで評価した。種々の癌細胞系の腫瘍細胞を細胞質性染料で予備染色し、マクロファージまたはＤＣをそれぞれ抗ヒトＣＤ１１ｂ抗体または抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体で染色した（細胞質性染料とは色が異なる）。染色した腫瘍細胞およびマクロファージを共培養し、蛍光顕微鏡で画像を撮影した。食作用は、総マクロファージ（単一シグナル）に対する、腫瘍細胞の飲み込みが陽性（混合シグナル）のマクロファージまたはＤＣの割合として定量化した。

【０９２４】

実施例１３

ＴＩＧＩＴドメインを含むヘテロダイマーによるＮＫ細胞の細胞毒性活性
ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、Ｂ細胞およびＴ細胞のように特異的抗原を認識することなく、細胞毒性またはサイトカイン／ケモカインの分泌を直接誘導する。ＮＫ細胞毒性は、感染細胞、悪性腫瘍、およびストレスを受けた細胞に対する免疫応答において重要な役割を担い、種々の疾患の病理学的プロセスに関与する。
【０９２５】
製造したヘテロダイマーのＮＫ活性化に対する効果を決定するための複数の解析方法が知られており、それらには以下が含まれるが、これらに限定されるものではない。
【０９２６】
・細胞毒性アッセイ：　共培養アッセイにおけるＮＫ細胞（エフェクター細胞）による標的細胞の殺滅。殺滅％をフローサイトメトリー解析（ＦＡＣＳ）で解析する。標的細胞を９６ウェルプレートに入れて、種々のエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比で予備標識一次ＮＫ細胞とインキュベートした。解析前に、ＮＫ細胞を１０００Ｕ／ｍＬのＩＬ２と共に４８時間培養した。４時間および２４時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析した。ＮＫ細胞なしの培養から回収した標的細胞の数を参照値とした。
【０９２７】
・細胞毒性アッセイ：　共培養アッセイにおけるＮＫ細胞（エフェクター細胞）による標的細胞の殺滅。標識標的細胞およびカスパーゼ感受性蛍光基質を用いてＩｎｃｕｃｙｔｅ装置で殺滅％を決定する。
【０９２８】
・炎症性サイトカインの分泌：　種々の比率の種々の標的細胞で一次ＮＫ細胞を２４時間刺激する。細胞無しの培養上清中のインターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）および顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のレベルをＥＬＩＳＡまたはサイトメトリック・ビーズ・アレイ（ＣＢＡ）で決定する。
【０９２９】
本発明をその特定の実施形態とともに記載したが、多数の代替法、改変および変法も当業者に明らかとなる。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨および広い範囲内に入るすべてのこのような代替法、改変および変法も包含するものとする。
【０９３０】
本明細書で述べた全ての刊行物、特許、および特許出願は、当該刊行物、特許、または特許出願について具体的かつ個別に記載した場合と同様に、参照によりそれらが完全に本明細書に組み込まれるものとする。さらに、本願におけるいかなる参考文献の引用または記載も、そのような参考文献が本願に対する従来技術として存在することの自認と解釈すべきではない。セクションの見出しの使用についても、それらを必ずしも限定として解釈すべきではない。さらに本願の基礎出願に係る書類も、本参照をもって本明細書に完全に組み込まれたものとする。
【配列表フリーテキスト】
【０９３１】
配列番号１：　全長ＰＤ１のアミノ酸配列
配列番号２：　全長ＰＤ１の核酸配列
配列番号３：　ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む、ＰＤ１　ＥＣＤの全長配列
配列番号４：　配列番号３をコードする核酸配列
配列番号５：　ＰＤ１　ＥＣＭの公知断片
配列番号６：　ＰＤ１　ＥＣＭの公知断片
配列番号７：　１５０アミノ酸の本来のＰＤ１ドメイン
配列番号８：　配列番号７の核酸
配列番号９：　ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む、１５０アミノ酸の本来のＰＤ１ドメイン
配列番号１０：　配列番号９の核酸
配列番号１１：　ＰＤ１ドメイン内の１４０アミノ酸　－５－５
配列番号１２：　配列番号１１の核酸

配列番号１３：　ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含むＰＤ１ドメイン内の、１４０アミノ酸－５－５
配列番号１４：　配列番号１３の核酸
配列番号１５：　１４０アミノ酸のＰＤ１セグメント
配列番号１６：　配列番号１５をコードする核酸配列
配列番号１７：　１２８アミノ酸のＰＤ１セグメント
配列番号１８：　配列番号１７をコードする核酸配列
配列番号１９：　１３５アミノ酸のＰＤ１セグメント
配列番号２０：　配列番号１９をコードする核酸配列
配列番号２１：　１３３アミノ酸のＰＤ１セグメント
配列番号２２：　配列番号２１をコードする核酸配列
配列番号２３：　ＰＤ１　－１０－５（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む）
配列番号２４：　配列番号２３をコードする核酸配列
配列番号２５：　ＰＤ１　－１０－１２（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む）
配列番号２６：　配列番号２５をコードする核酸配列
配列番号２７：　ＰＤ１　－５－１２（新規、Ｖ２０由来）（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む）
配列番号２８：　配列番号２７をコードする核酸配列
配列番号２９：　ＰＤ１　－１１－１２
配列番号３０：　配列番号２９をコードする核酸配列
配列番号３１：　ＰＤ１　－１１－１２（新規、Ｖ１８由来）（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む）
配列番号３２：　配列番号３１をコードする核酸配列
配列番号３３：　ＰＤ１　－１１－５
配列番号３４：　配列番号３３をコードする核酸配列
配列番号３５：　ＰＤ１　－１１－５（新規、Ｖ１９由来）（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む）
配列番号３６：　配列番号３５をコードする核酸配列
配列番号３７：　ＰＤ１　－５－７
配列番号３８：　配列番号３７をコードする核酸配列
配列番号３９：　ＰＤ１　－５－７（新規、Ｖ２１由来）（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換を含む）
配列番号４０：　配列番号３９をコードする核酸配列
配列番号４１：　（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換無しの）１３６アミノ酸のＰＤ１　－５－９
配列番号４２：　配列番号４１をコードする核酸配列
配列番号４３：　（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換無しの）１４５アミノ酸のＰＤ１　－０－５
配列番号４４：　配列番号４３をコードする核酸配列
配列番号４５：　（ＣＹＳ９３＞Ｓｅｒ置換無しの）１４３アミノ酸のＰＤ１　－０－７
配列番号４６：　配列番号４５をコードする核酸配列
配列番号４７：　全長４１ＢＢＬのアミノ酸配列
配列番号４８：　全長４１ＢＢＬの核酸配列
配列番号４９：　本来の４１ＢＢＬドメイン
配列番号５０：　配列番号４９をコードする核酸配列
配列番号５１：　４－１ＢＢＬドメイン内の１９１アミノ酸　１４－０
配列番号５２：　配列番号５１の核酸
配列番号５３：　４１ＢＢＬセグメントの１９７アミノ酸
配列番号５４：　配列番号５３をコードする核酸配列
配列番号５５：　４１ＢＢＬセグメントの１８５アミノ酸
配列番号５６：　配列番号５５をコードする核酸配列
配列番号５７：　４１ＢＢＬセグメントの１９９アミノ酸

配列番号５８：　配列番号５７をコードする核酸配列
配列番号５９：　４－１ＢＢＬ　－２１－０の１８４アミノ酸
配列番号６０：　配列番号５９をコードする核酸配列
配列番号６１：　４－１ＢＢＬ　－２３－０の１８２アミノ酸
配列番号６２：　配列番号６１をコードする核酸配列
配列番号６３：　４－１ＢＢＬ　－１４－８の１８３アミノ酸
配列番号６４：　配列番号６３をコードする核酸配列
配列番号６５：　４－１ＢＢＬ　－２１－８の１７６アミノ酸
配列番号６６：　配列番号６５をコードする核酸配列
配列番号６７：　６０１アミノ酸のｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬ（－１４－０）内部リンカー（ＧＧＧＧＳ）×２＋ＧＧＧＧ
配列番号６８：　配列番号６７をコードする核酸配列
配列番号６９：　全長ＳＩＲＰのアミノ酸配列
配列番号７０：　全長ＳＩＲＰの核酸配列
配列番号７１：　本来のＳＩＲＰａドメイン（３４３アミノ酸）
配列番号７２：　配列番号７１をコードする核酸配列
配列番号７３：　１１６アミノ酸のＳＩＲＰａセグメント
配列番号７４：　配列番号７３をコードする核酸配列
配列番号７５：　４点の変異を有するＳＩＲＰａの３４３アミノ酸
配列番号７６：　配列番号７５をコードする核酸配列
配列番号７７：　４点の変異を有するＳＩＲＰａの１１６アミノ酸配列
配列番号７８：　配列番号７７をコードする核酸配列
配列番号７９：　ＤＳＰ３０５およびＤＳＰ１０５＿Ｖ１の９８９アミノ酸のホール鎖
配列番号８０：　配列番号７９をコードする核酸配列
配列番号８１：　ＤＳＰ３０５の３７９アミノ酸のノブ鎖
配列番号８２：　配列番号８１をコードする核酸配列
配列番号８３：　ＤＳＰ３０５＿Ｖ１の３８９アミノ酸のノブ鎖
配列番号８４：　配列番号８３をコードする核酸配列
配列番号８５：　１１９２アミノ酸のＴＳＰ１１１およびＴＳＰ１１１＿Ｖ２の「ホール」鎖
配列番号８６：　配列番号８５の核酸
配列番号８９：　３７９アミノ酸のＴＳＰ１１１＿Ｖ１の「ホール」鎖
配列番号９０：　配列番号８９の核酸
配列番号９１：　１１９２アミノ酸のＴＳＰ１１１＿Ｖ１の「ノブ」鎖
配列番号９２：　配列番号９１の核酸
配列番号９５：　人工シグナルペプチド
配列番号９６：　リンカーペプチド配列
配列番号９７：　リンカーペプチド配列
配列番号９８：　リンカーペプチド配列であって、１～５残基は１～４回繰り返し得る繰り返し配列
配列番号９９：　リンカーペプチド配列
配列番号１００：　リンカーペプチド配列
配列番号１０１：　リンカーペプチド配列であって、１～５残基は１～３回繰り返し得る繰り返し配列
配列番号１０２：　リンカーペプチド配列であって、２～６残基は２～５回繰り返し得る繰り返し配列
配列番号１０３：　リンカーペプチド配列
配列番号１０４：　リンカーペプチド配列
配列番号１０５：　リンカーペプチド配列
配列番号１０６：　リンカーペプチド配列

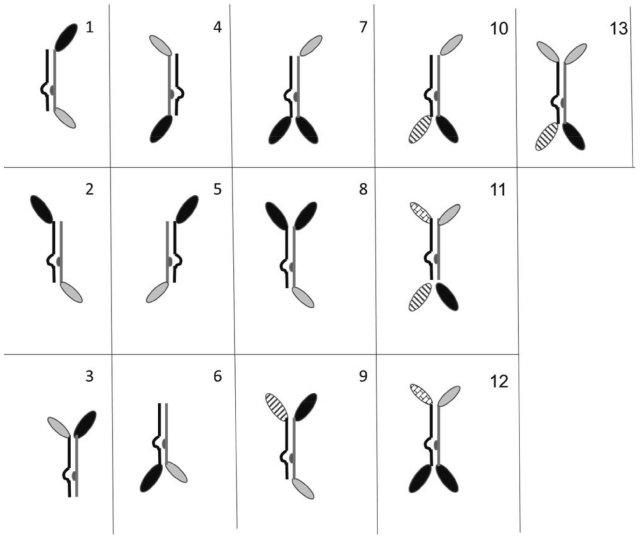
配列番号１０７：　リンカーペプチド配列
配列番号１０８：　リンカーペプチド配列
配列番号１０９：　リンカーペプチド配列
配列番号１１０：　リンカーペプチド配列
配列番号１１１：　リンカーペプチド配列
配列番号１１２：　リンカーペプチド配列
配列番号１１３：　リンカーペプチド配列
配列番号１１４：　リンカーペプチド配列
配列番号１１５：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－４、アミノ酸２２－４１９（Ｑ８Ｎ４２３－１　ＵｎｉＰａｒｃ）であるアミノ酸配列
配列番号１１６：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－４、アミノ酸２２－４１９（Ｑ８Ｎ４２３－１　ＵｎｉＰａｒｃ）である核酸配列
配列番号１１７：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－２、アミノ酸２２－２１９（Ｑ８Ｎ４２３－１　ＵｎｉＰａｒｃ）であるアミノ酸配列
配列番号１１８：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－２、アミノ酸の２２－２１９（Ｑ８Ｎ４２３－１　ＵｎｉＰａｒｃ）である核酸配列
配列番号１１９：　ＣＤ４０Ｌ、アミノ酸１１４－２６１はＣ１９４Ｓ（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）であるアミノ酸配列
配列番号１２０：　ＣＤ４０Ｌ、アミノ酸１１４－２６１はＣ１９４Ｓ（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）である核酸配列
配列番号１２１：　ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ、アミノ酸１１４－２６１はＣ１９４Ｓ（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）内部リンカー３×（ＧＧＧＧＳ）であるアミノ酸配列
配列番号１２２：　ＣＤ４０Ｌ全長ＥＣＤ、アミノ酸４７－２６１（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）であるアミノ酸配列
配列番号１２３：　ＣＤ４０Ｌ、アミノ酸１１４－２６１変異無し（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）であるアミノ酸配列
配列番号１２４：　ＣＤ４０Ｌ、アミノ酸１１４－２６１変異無し（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）である核酸配列
配列番号１２５：　Ｓｉｇｌｅｃ１０、アミノ酸１８－１４５変異無し（Ｑ９６ＬＣ７－１　Ｕｎｉｐｒｏｔ）であるアミノ酸配列
配列番号１２６：　Ｓｉｇｌｅｃ１０、アミノ酸１８－１４５変異無し（Ｑ９６ＬＣ７－１　Ｕｎｉｐｒｏｔ）であるアミノ酸配列
配列番号１２７：　Ｓｉｇｌｅｃ１０、アミノ酸１８－１４５プラスＣ３６Ｓ（Ｑ９６ＬＣ７－１　Ｕｎｉｐｒｏｔ）であるアミノ酸配列
配列番号１２８：　Ｓｉｇｌｅｃ１０、アミノ酸１８－１４５プラスＣ３６Ｓ（Ｑ９６ＬＣ７－１　Ｕｎｉｐｒｏｔ）である核酸配列
配列番号１２９：　Ｓｉｇｌｅｃ１０全長ＥＣＤ、アミノ酸１７－５５０（Ｑ９６ＬＣ７－１　Ｕｎｉｐｒｏｔ）であるアミノ酸配列
配列番号１３０：　ＴＩＧＩＴ、アミノ酸２２－１３４変異無し（Ｑ４９５Ａ１　Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ）であるアミノ酸配列
配列番号１３１：　ＴＩＧＩＴ、ＥＣＤのアミノ酸２２－１４１変異無し（Ｑ４９５Ａ１　Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ）である核酸配列
配列番号１３２：　ＴＩＧＩＴ、アミノ酸２２－１３４プラスＩ４２ＡとＣ６９Ｓ（Ｑ４９５Ａ１　Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ）であるアミノ酸配列
配列番号１３３：　ＴＩＧＩＴ、アミノ酸２２－１３４プラスＩ４２ＡとＣ６９Ｓ（Ｑ４９５Ａ１　Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ）である核酸配列
配列番号１３４：　リンカーアミノ酸配列
配列番号１３５：　リンカーアミノ酸配列
配列番号１３６：　リンカーアミノ酸配列
配列番号１３７：　リンカーアミノ酸配列

配列番号１３８：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－４　Ｆｃ　ＩｇＧ４ノブ：ＴＳＰ２１４および２１５、２１７、２１８、２２１および２２２内のアミノ酸配列
配列番号１３９：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－４　Ｆｃ　ＩｇＧ４ノブ：ＴＳＰ２１４および２１５、２１７、２１８、２２１および２２２内の核酸配列
配列番号１４０：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－２　Ｆｃ　ＩｇＧ４ノブ：ＴＳＰ２１４　Ｖ１および２１５Ｖ１内のアミノ酸配列
配列番号１４１：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－２　Ｆｃ　ＩｇＧ４ノブ：ＴＳＰ２１４　Ｖ１および２１５　Ｖ１内の核酸配列
配列番号１４２：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－４－Ｆｃ　ＩｇＧ４ホール－ｓｃ３ｘ４１ＢＢＬ：ＤＳＰ２１４内のアミノ酸配列
配列番号１４３：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－４－Ｆｃ　ＩｇＧ４ホール－ｓｃ３ｘ４１ＢＢＬ：ＤＳＰ２１４内のアミノ酸配列核酸配列
配列番号１４４：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－２－Ｆｃ　ＩｇＧ４ホール－ｓｃ３ｘ４１ＢＢＬ：ＤＳＰ２１４Ｖ１内のアミノ酸配列
配列番号１４５：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－２－Ｆｃ　ＩｇＧ４ホール－ｓｃ３ｘ４１ＢＢＬ：ＤＳＰ２１４Ｖ１内の核酸配列
配列番号１４６：　ＳＩＲＰａ－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ１１２および２１７内のアミノ酸配列
配列番号１４７：　ＳＩＲＰａ－ＦｃホールＩｇＧ４－ｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ１１２および２１７内の核酸配列
配列番号１４８：　ＬＩＬＲＢ２－Ｆｃ　－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ２１８内のアミノ酸配列
配列番号１４９：　ＬＩＬＲＢ２－Ｆｃ　－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ２１８内の核酸配列
配列番号１５０：　Ｓｉｇｌｅｃ－ＦｃノブＩｇＧ４：ＴＳＰ４０１および４０３内のアミノ酸配列
配列番号１５１：　Ｓｉｇｌｅｃ－ＦｃノブＩｇＧ４：ＴＳＰ４０１および４０３内の核酸配列
配列番号１５２：　ＴＩＧＩＴ－ＦｃノブＩｇＧ４：ＴＳＰ５０１および５０３内のアミノ酸配列
配列番号１５３：　ＴＩＧＩＴ－ＦｃノブＩｇＧ４：ＴＳＰ５０１および５０３内の核酸配列
配列番号１５４：　ＰＤ１－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ２２２および４０３および５０３内のアミノ酸配列
配列番号１５５：　ＰＤ１－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ２２２および４０３および５０３内のアミノ酸配列
配列番号１５６：　ＴＩＧＩＴ－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬ：ＴＳＰ５０１Ｖ１内のアミノ酸配列
配列番号１５７：　ＴＩＧＩＴ－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘ４－１ＢＢＬ：ＴＳＰ５０１Ｖ１内の核酸配列
配列番号１５８：　ＴＩＧＩＴ－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ５０３Ｖ１内のアミノ酸配列
配列番号１５９：　ＴＩＧＩＴ－ＦｃホールＩｇＧ４－ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ：ＴＳＰ５０３Ｖ１内のアミノ酸配列
配列番号１６０：ＴＩＧＩＴ全長（Ｑ４９５Ａ１　Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ）アミノ酸配列
配列番号１６１：　ＬＩＬＲＢ２　Ｄ１－４、全長（Ｑ８Ｎ４２３－１　ＵｎｉＰａｒｃ）アミノ酸配列
配列番号１６２：　Ｓｉｇｌｅｃ　１０全長（Ｑ９６ＬＣ７－１　Ｕｎｉｐｒｏｔ）アミノ酸配列
配列番号１６３：　ＣＤ４０Ｌ全長（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）アミノ酸配列

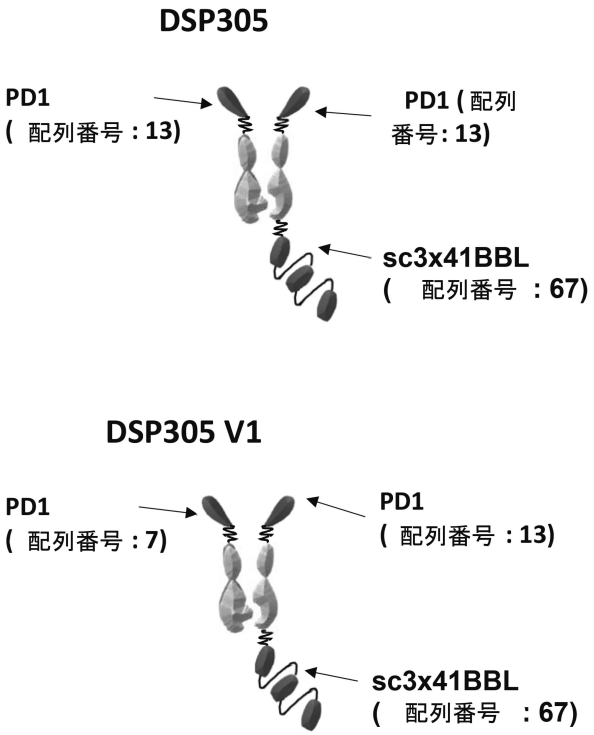
配列番号１６４：　ＴＩＧＩＴ全ＥＣＤアミノ酸配列
配列番号１６５：　ＬＩＬＲＢ２全ＥＣＤアミノ酸配列
配列番号１６６：　ｓｃ３ｘＣＤ４０Ｌ、アミノ酸１１４－２６１　Ｃ１９４Ｓ（Ｐ２９９６５　Ｕｎｉｐｒｏｔ）内部リンカー３×（ＧＧＧＧＳ）核酸配列

【図面】

【図１】



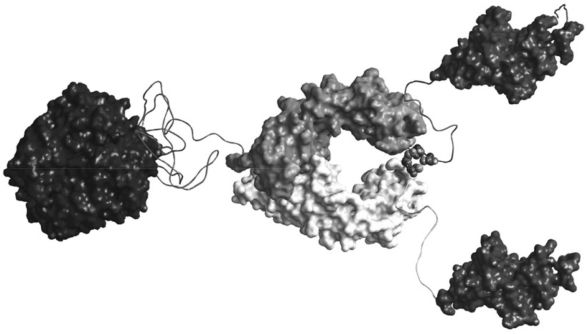
【図２】



【図３－１】
図 3A



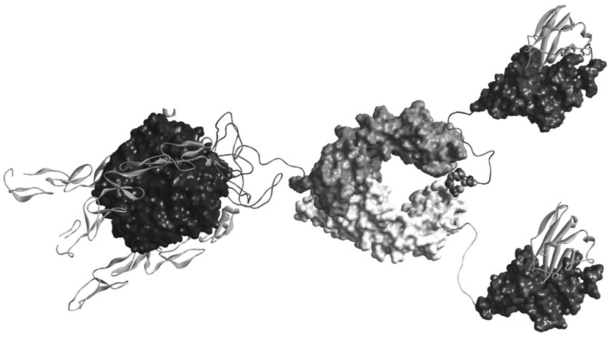
図 3B



【図３－２】
図 3C



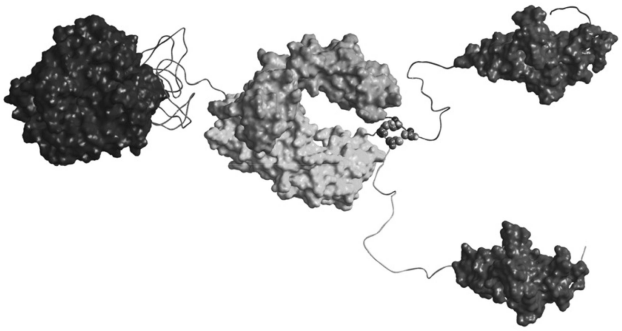
図 3D



【図３－３】
図 3E



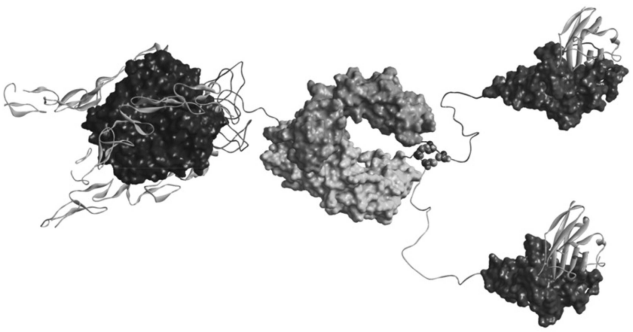
図 3F



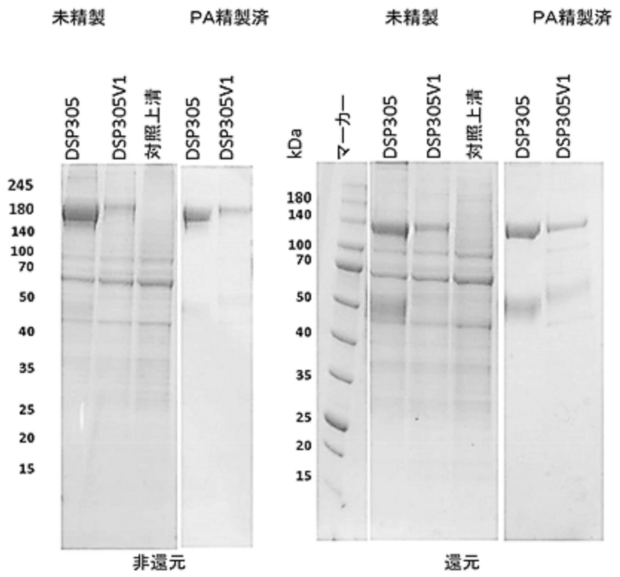
【図３－４】
図 3G



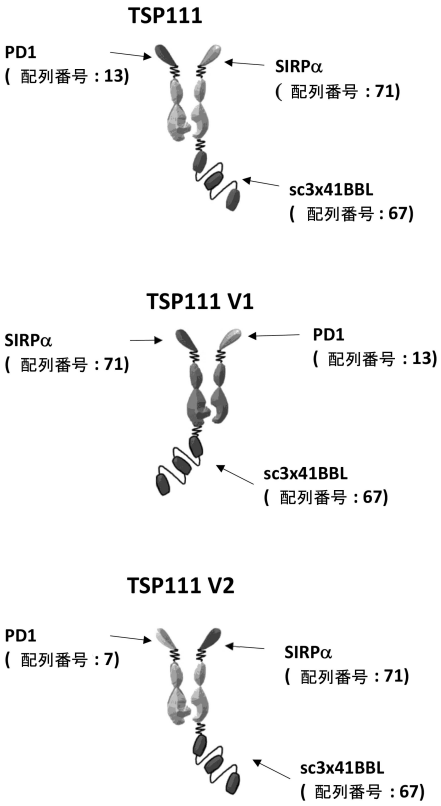
図 3H



【図４】



【図５】



【図６－１】

図 6A



図 6B

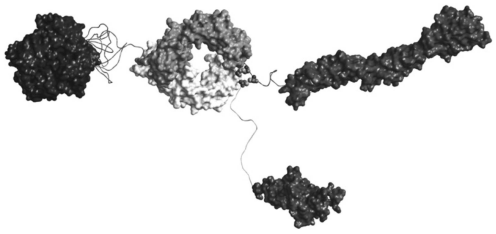
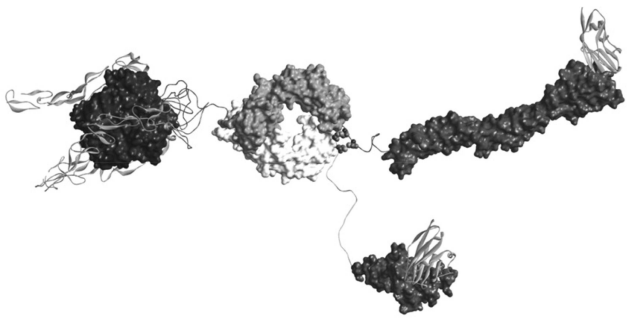


図 6C

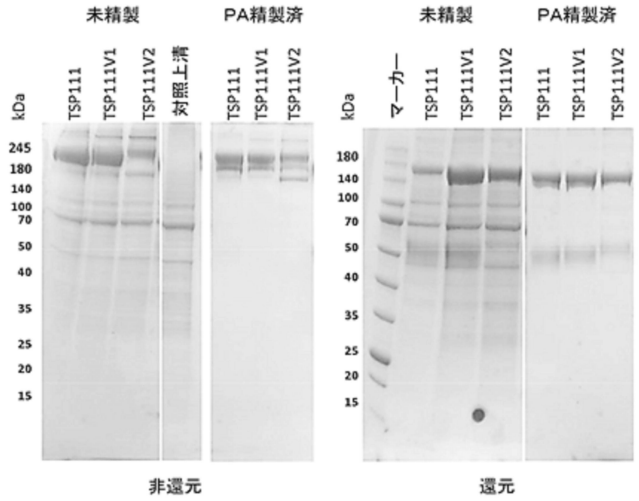


【図６－２】

図 6D



【図７】



【図８－１】

図 8A

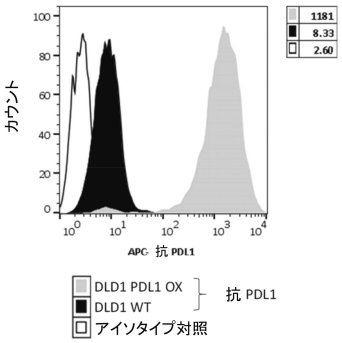
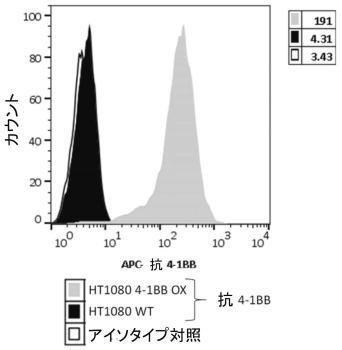


図 8B



【図８－２】

図 8C

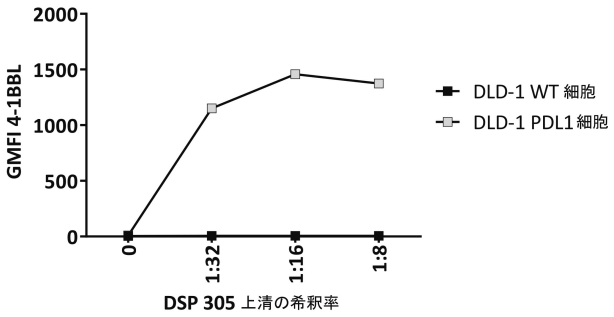
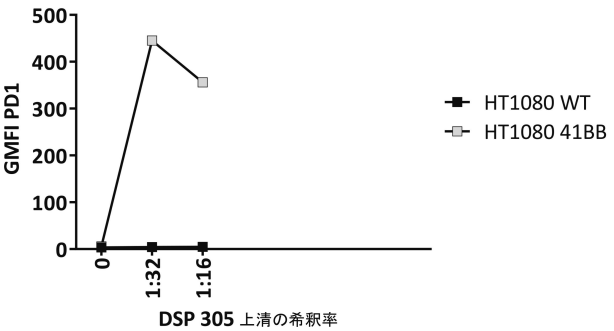


図 8D



【図９－１】

図 9A

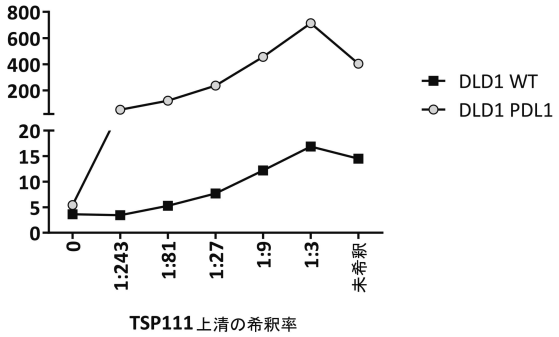
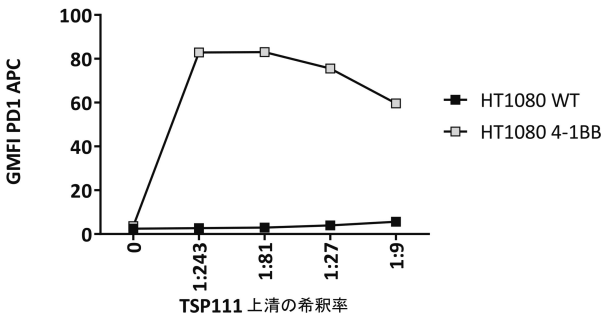


図 9B



【図９－２】

図 9C

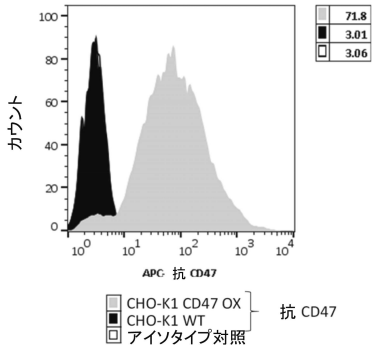
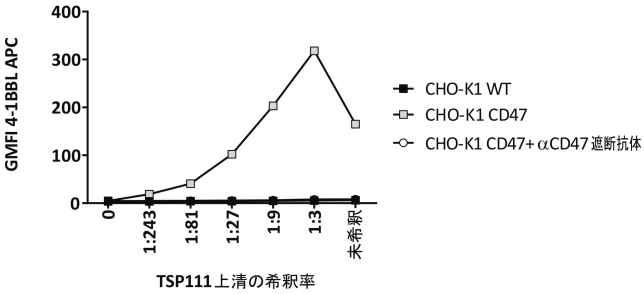


図 9D



【図１０】

図 10A

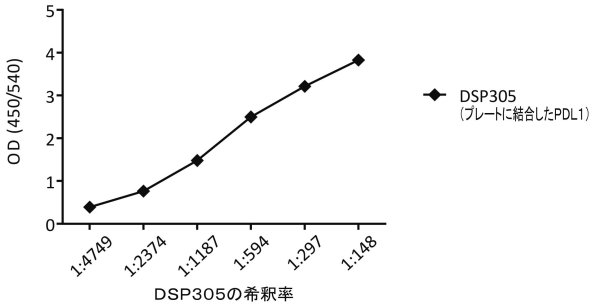
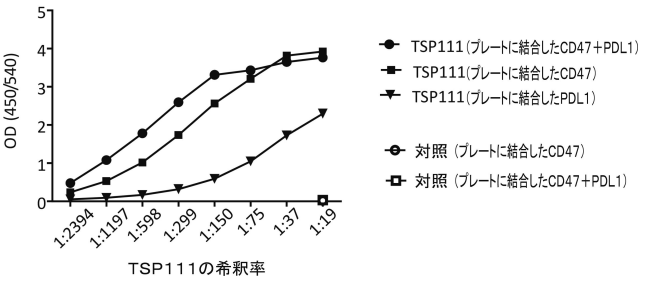


図 10B



【図１１－１】

図 11A

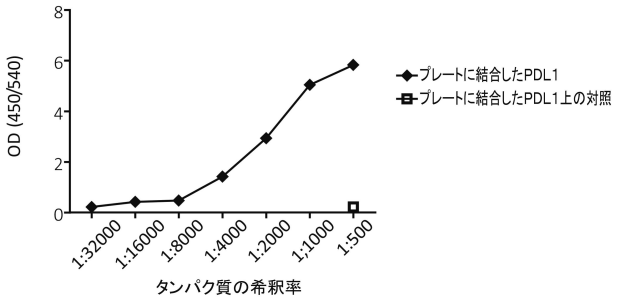
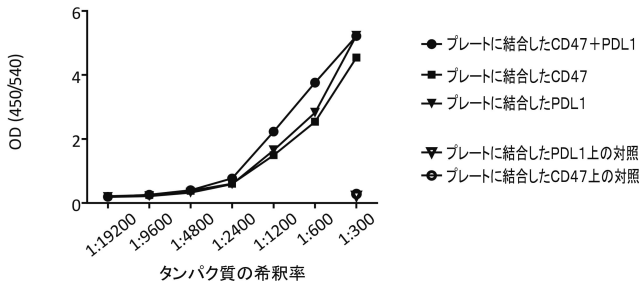
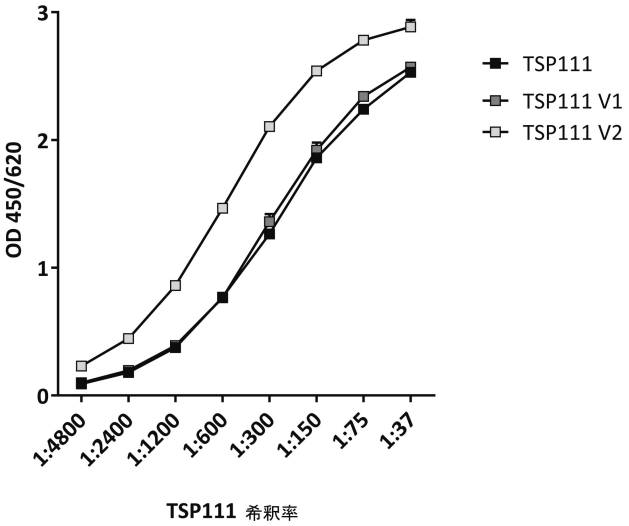


図 11B

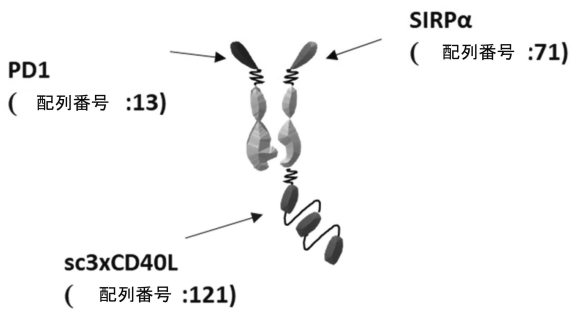


【図１１－２】

図 11C



【図１２－１】
図 12A



【図１２－２】
図 12C

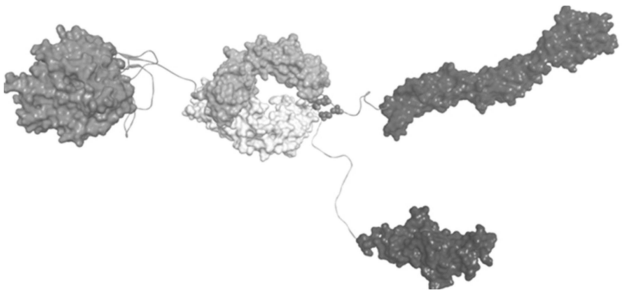
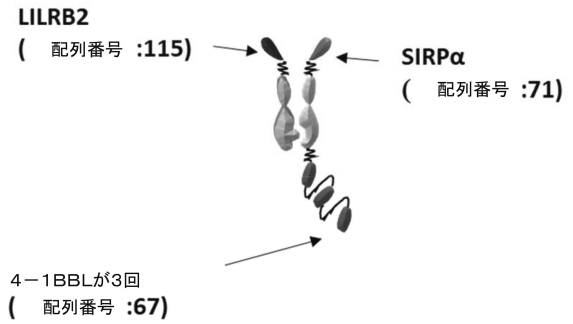


図 12B



【図１３－１】
図 13A



【図１３－２】
図 13B

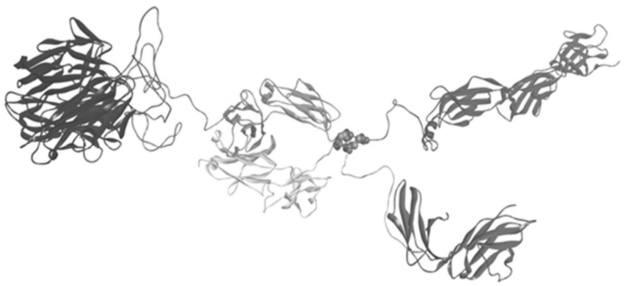
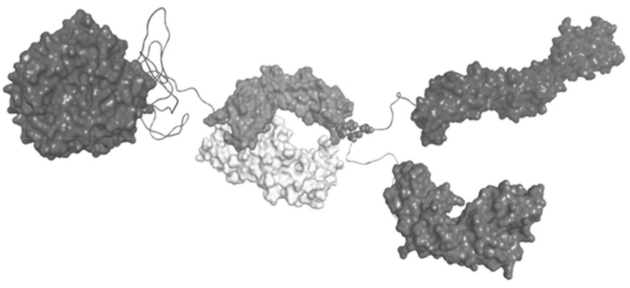


図 13C



【図１４】

図 14A

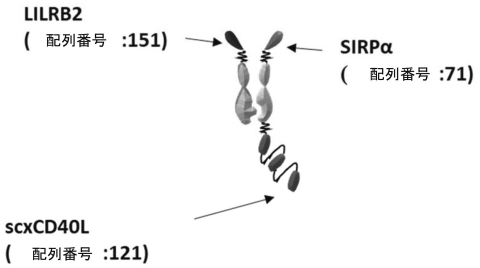


図 14B

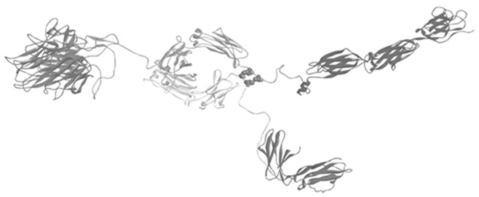
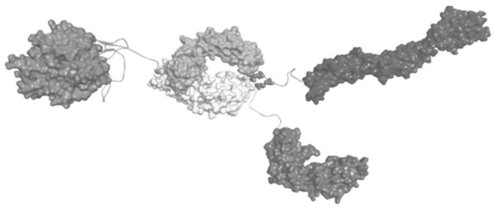


図 14C



【図１５】

図 15A

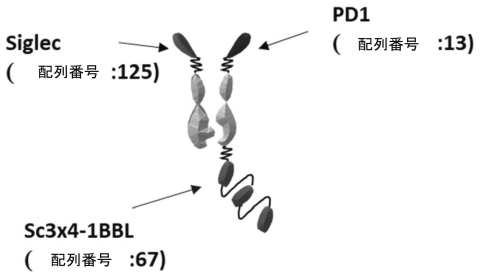
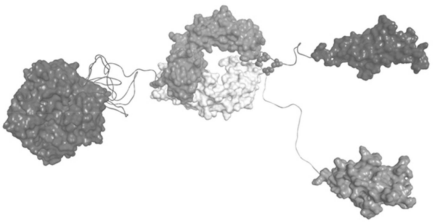


図 15B



図 15C



【図１６】

図 16A

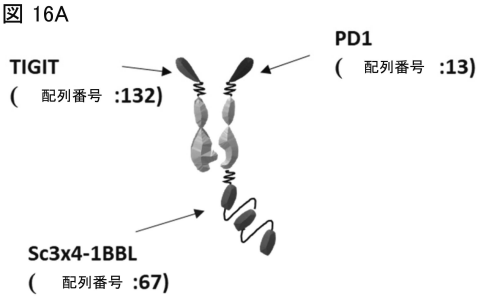
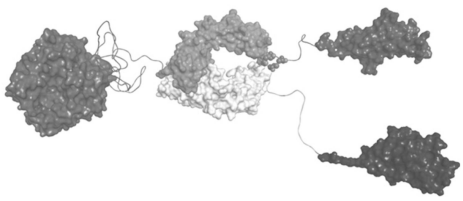


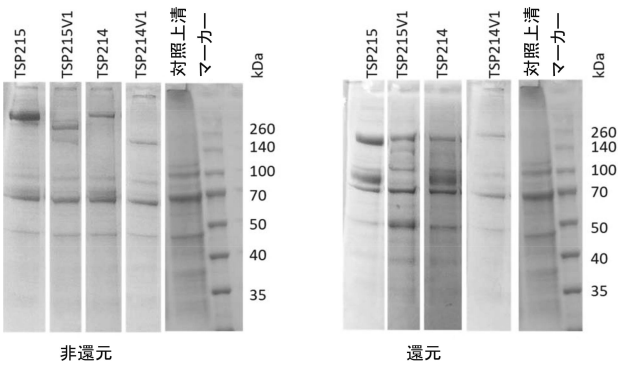
図 16B



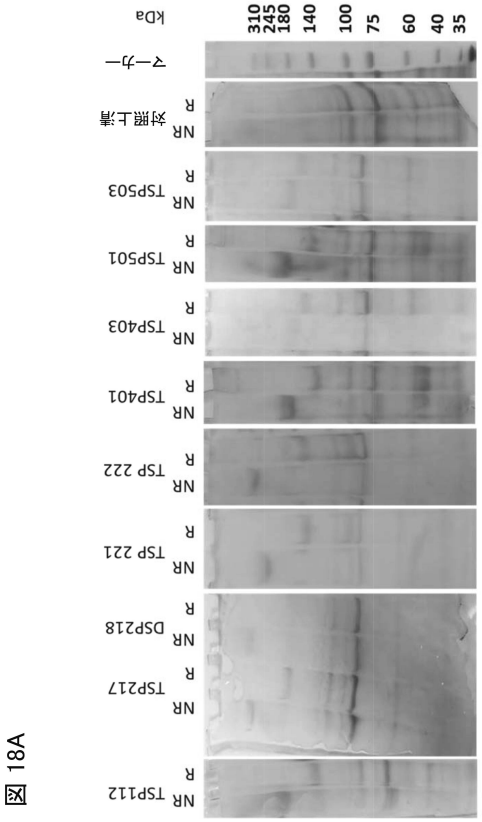
図 16C



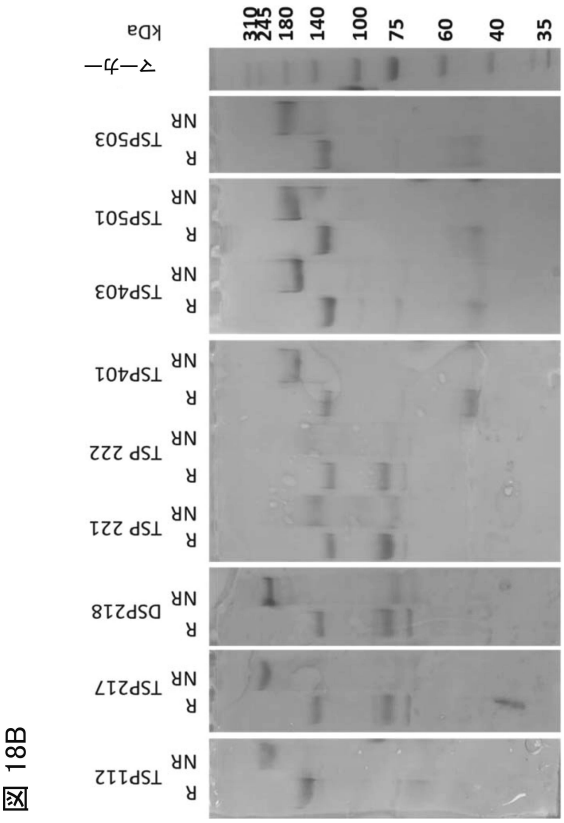
【図１７】



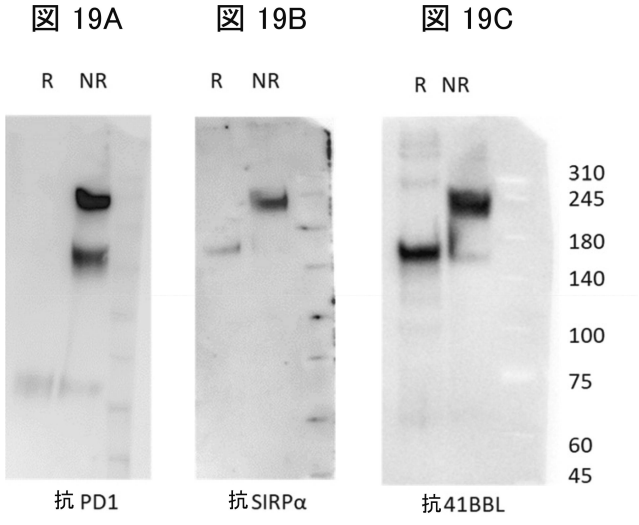
【図１８－１】



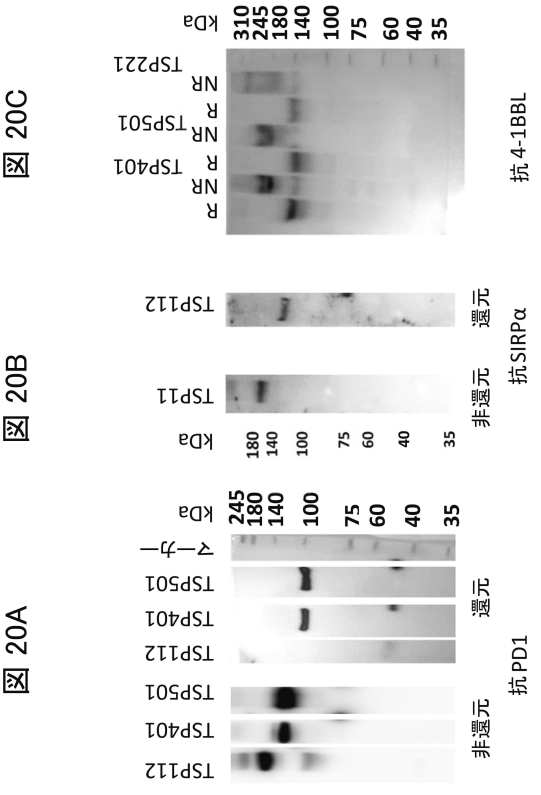
【図１８－２】



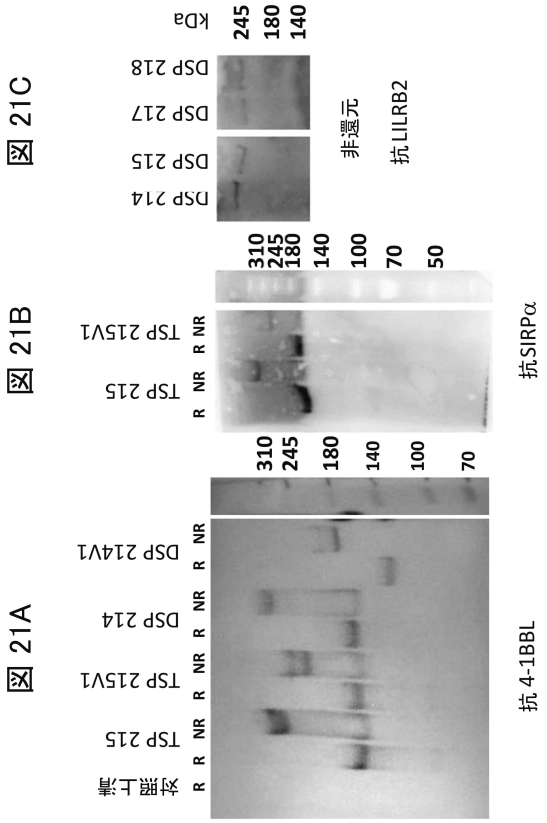
【図１９】



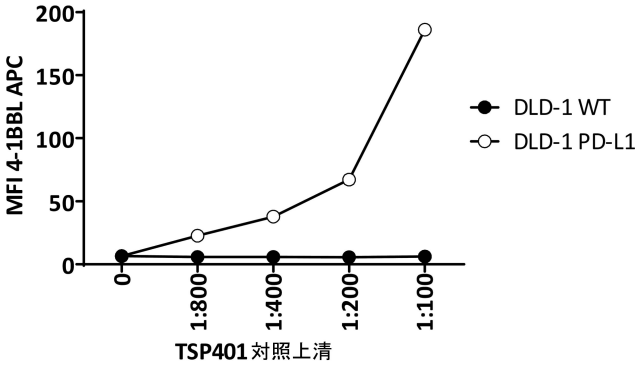
【図２０】



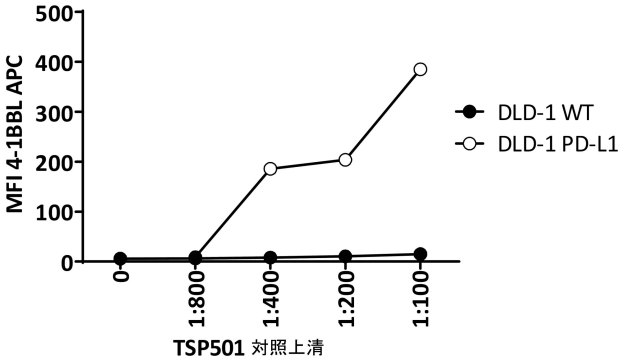
【図２１】



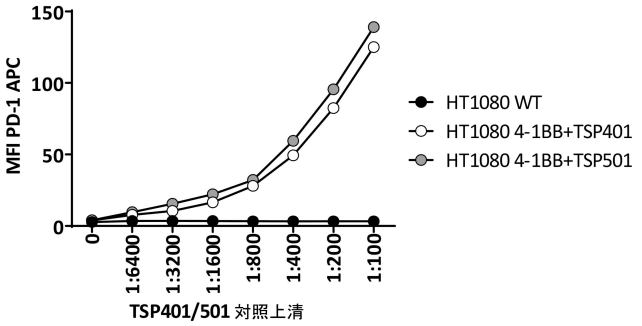
【図２２Ａ】



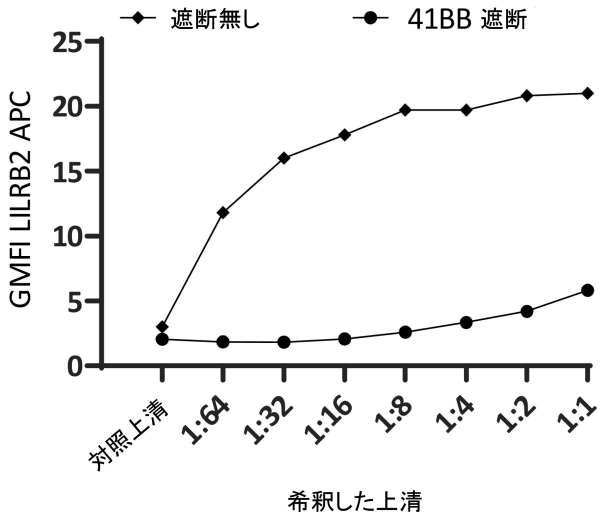
【図２２Ｂ】



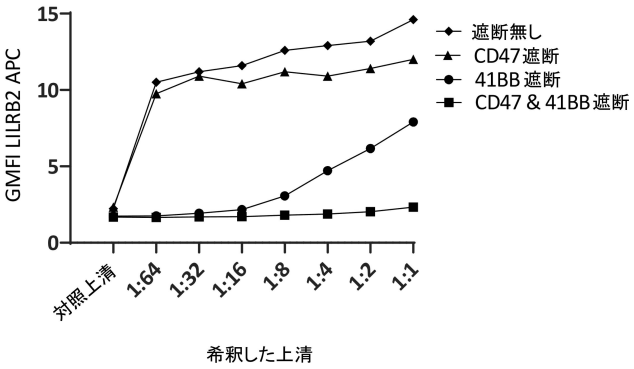
【図２３】



【図２４】



【図２５】



【図２６】

図 26A

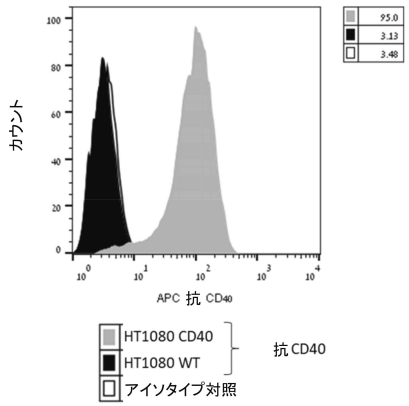
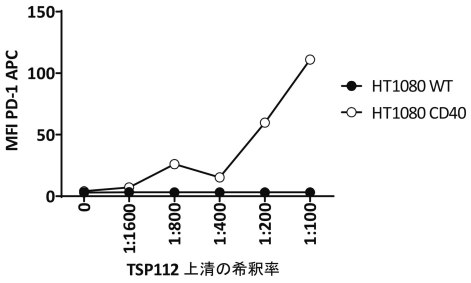


図 26B



【図２７】

図 27A

図 27B

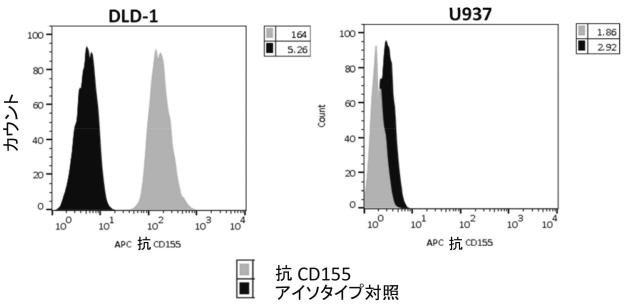
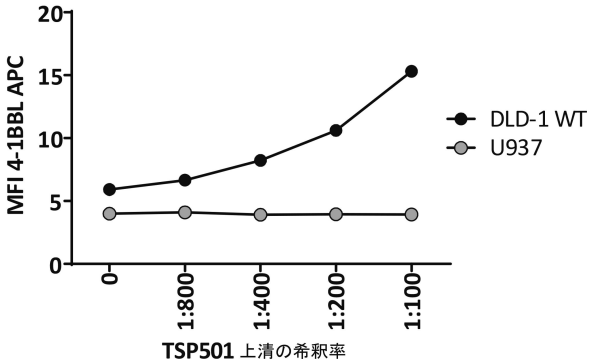


図 27C



【図２８－１】

図 28A

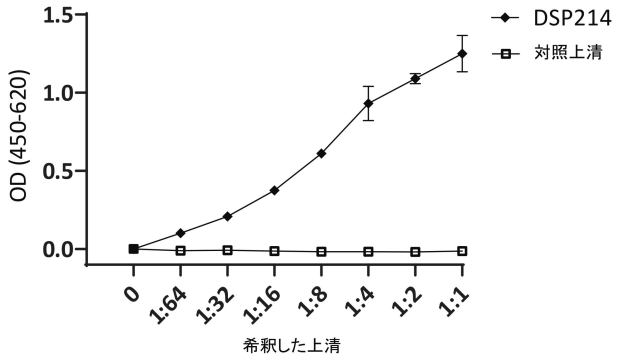
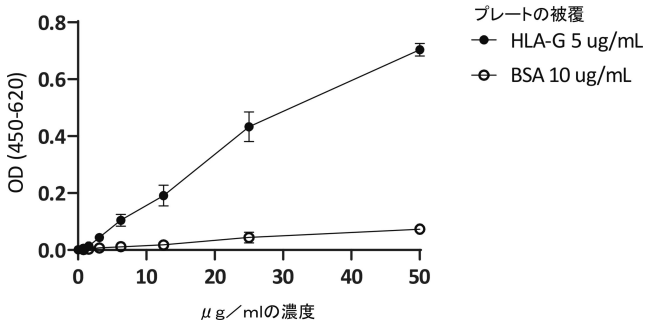
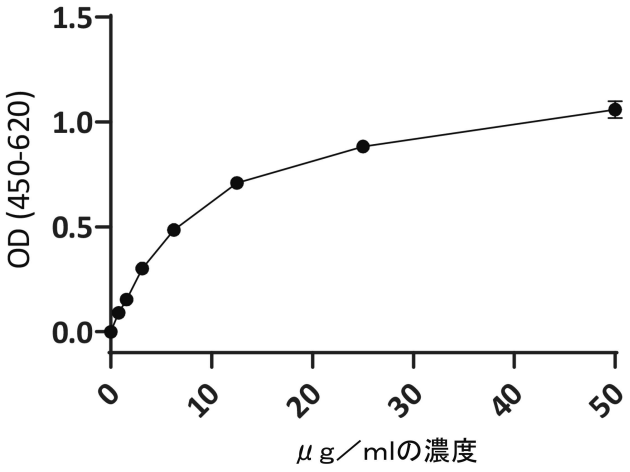


図 28B



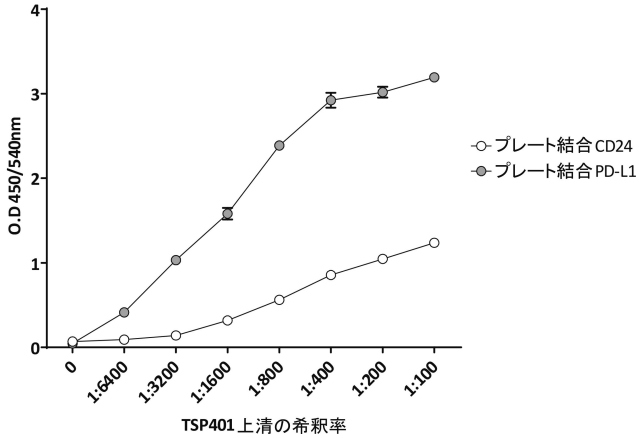
【図２８－２】

図 28C



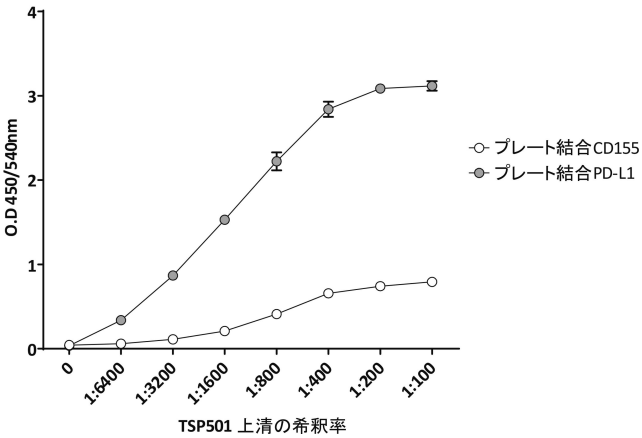
【図２９－１】

図 29A

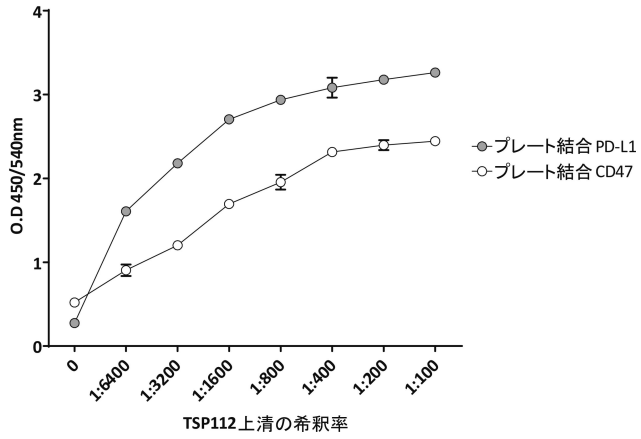


【図２９－２】

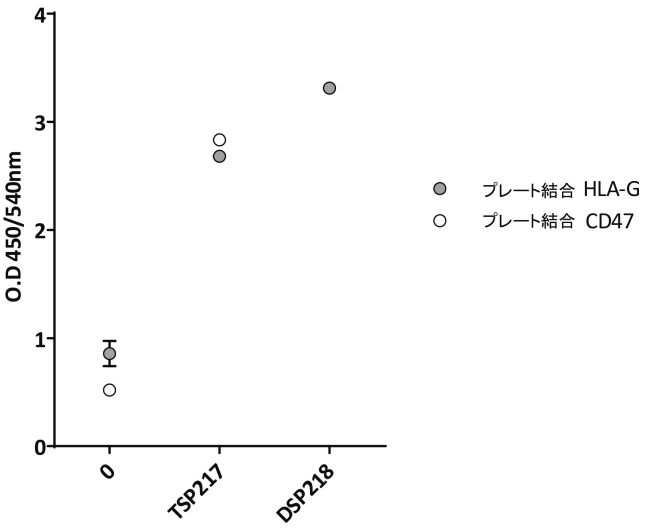
図 29B



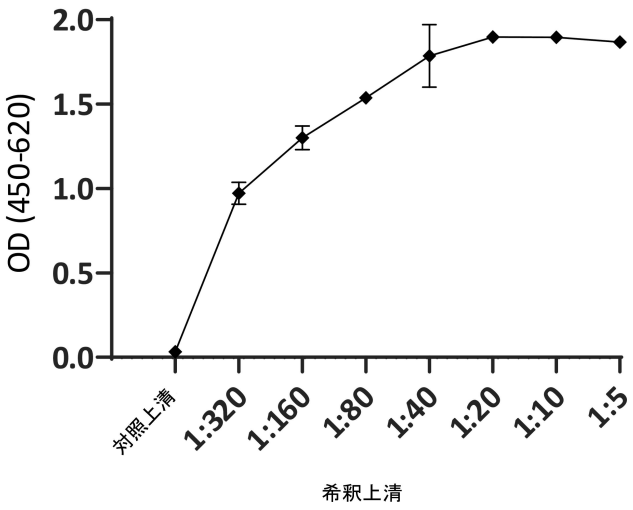
【図３０－１】
図 30A



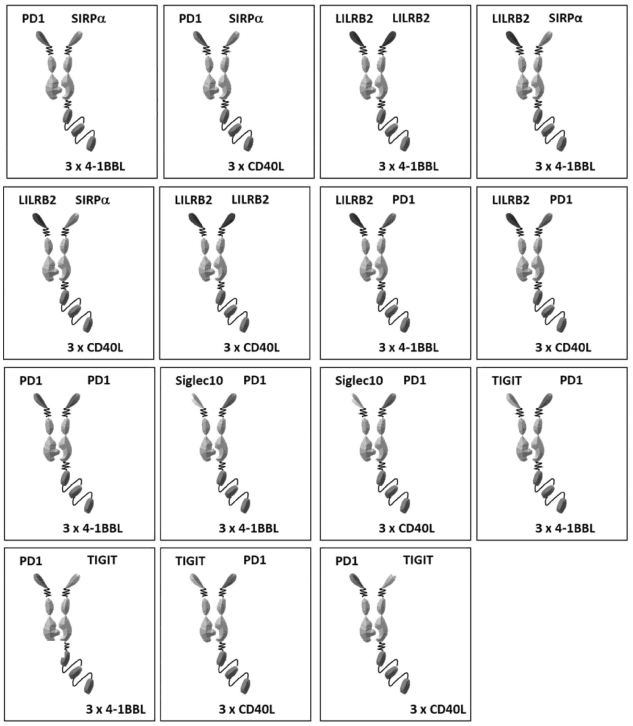
【図３０－２】
図 30B



【図３１】



【図３２】



【配列表】
20225417420000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2020/050762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/525 C07K14/705 A61P35/00 A61P35/02
ADD.

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)
C07K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/376260 A1 (ELHALEL MICHAL DRANITZKI [IL] ET AL) 31 December 2015 (2015-12-31) whole document esp. paragraphs [2,4,5-9,24-25,100,130]	1-6, 8-17,19, 20,33-50
X	US 2019/151413 A1 (SCHREIBER TAYLOR [US] ET AL) 23 May 2019 (2019-05-23) whole document esp. paragraphs [5-7,18,28,128,200,212,240]	1-50
X	WO 2018/127919 A1 (KAHR MEDICAL LTD [IL]) 12 July 2018 (2018-07-12) cited in the application whole document esp. claims	1-50

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 September 2020	06/10/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Brück, Marianne

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2020/050762

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2020/050762

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/127917 A1 (KAHR MEDICAL LTD [IL]) 12 July 2018 (2018-07-12) cited in the application whole document esp. claims	1-50
X,P	WO 2020/012486 A1 (KAHR MEDICAL LTD [IL]) 16 January 2020 (2020-01-16) whole document esp. claims; page 7	1-50
X,P	WO 2020/012485 A1 (KAHR MEDICAL LTD [IL]) 16 January 2020 (2020-01-16) whole document esp. claims 1, 23; page 101	1-50

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IL2020/050762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015376260 A1	31-12-2015	AU 2013371826 A1	13-08-2015
		CA 2896989 A1	10-07-2014
		CN 105026424 A	04-11-2015
		EP 2941438 A1	11-11-2015
		US 2015376260 A1	31-12-2015
		US 2019016782 A1	17-01-2019
		WO 2014106839 A1	10-07-2014
US 2019151413 A1	23-05-2019	AU 2016331076 A1	05-04-2018
		BR 112018006578 A2	26-12-2018
		CA 2999280 A1	06-04-2017
		CN 108350055 A	31-07-2018
		EP 3356393 A1	08-08-2018
		HK 1258835 A1	22-11-2019
		JP 2018529363 A	11-10-2018
		KR 20180051651 A	16-05-2018
		PH 12018500694 A1	01-10-2018
		SG 10201913573U A	30-03-2020
		SG 10201913576R A	27-02-2020
		SG 10201913591S A	27-02-2020
		SG 10201913597V A	27-02-2020
		SG 11201801984T A	27-04-2018
		US 2017095531 A1	06-04-2017
		US 2018064787 A1	08-03-2018
		US 2018125935 A1	10-05-2018
		US 2018326004 A1	15-11-2018
		US 2018326005 A1	15-11-2018
		US 2018326006 A1	15-11-2018
		US 2018326007 A1	15-11-2018
		US 2018326008 A1	15-11-2018
		US 2019151413 A1	23-05-2019
		US 2020101136 A1	02-04-2020
		US 2020246431 A1	06-08-2020
		US 2020261537 A1	20-08-2020
		WO 2017059168 A1	06-04-2017
WO 2018127919 A1	12-07-2018	AU 2018205890 A1	08-08-2019
		CA 3047708 A1	12-07-2018
		CN 110573522 A	13-12-2019
		EP 3565828 A1	13-11-2019
		JP 2020505010 A	20-02-2020
		KR 20190122660 A	30-10-2019
		US 2019352372 A1	21-11-2019
		WO 2018127919 A1	12-07-2018
WO 2018127917 A1	12-07-2018	AU 2018205888 A1	08-08-2019
		CA 3047707 A1	12-07-2018
		CN 110536693 A	03-12-2019
		EP 3565579 A1	13-11-2019
		JP 2020505009 A	20-02-2020
		KR 20190123723 A	01-11-2019
		US 2019352371 A1	21-11-2019
		WO 2018127917 A1	12-07-2018
WO 2020012486 A1	16-01-2020	NONE	
WO 2020012485 A1	16-01-2020	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｋ	*47/68*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68		
Ａ６１Ｋ	*38/17*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/17		
Ｃ０７Ｋ	*14/705*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/705		
Ｃ０７Ｋ	*16/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00		

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人　110002952弁理士法人鷲田国際特許事務所

(72)発明者　チコシンスキ マーク エル.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 メリオン ステーション リンデン レーン ３００

(72)発明者　タミール アミ

イスラエル国 レホボト ナタン アルテルマン ストリート ４

(72)発明者　ブレマー エドウィン

オランダ国 フローニンゲン モーツァルトストラート ２６

Ｆターム（参考）　4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 CC30 DA01

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C076 AA95 CC07 CC26 CC27 CC41 EE59

4C084 AA02 AA06 AA07 BA41 BA42 BA44 CA53 DC50 NA05 NA13 ZB071 ZB211 ZB261 ZB271

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 EA22 EA28 FA34 FA74