

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7449292号
(P7449292)

(45)発行日 令和6年3月13日(2024.3.13)

(24)登録日 令和6年3月5日(2024.3.5)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	38/36 (2006.01)	A 6 1 K	38/36
請求項の数 26 (全591頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-536660(P2021-536660)	(73)特許権者	521087117
(86)(22)出願日	令和1年8月30日(2019.8.30)		エイチシーダブリュー バイオロジックス
(65)公表番号	特表2021-535225(P2021-535225 A)		インコーポレイテッド
(43)公表日	令和3年12月16日(2021.12.16)		アメリカ合衆国 3 3 0 2 5 フロリダ州
(86)国際出願番号	PCT/US2019/049142		ミラマー ノース コマース パークウェイ
(87)国際公開番号	WO2020/047462	(74)代理人	2 9 2 9
(87)国際公開日	令和2年3月5日(2020.3.5)		100102978
審査請求日	令和4年7月29日(2022.7.29)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/725,038	(74)代理人	100160923
(32)優先日	平成30年8月30日(2018.8.30)		弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119507
(31)優先権主張番号	62/724,969		弁理士 刑部 俊
(32)優先日	平成30年8月30日(2018.8.30)	(74)代理人	100142929
最終頁に続く		(74)代理人	弁理士 井上 隆一
		(74)代理人	100148699
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 加齢関連障害の治療法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
多鎖 (m u l t i - c h a i n) キメラポリペプチドを含む、対象においてがんを治療する方法に使用するための医薬組成物であって、
前記方法は、前記対象に、治療有効量の多鎖キメラポリペプチドを投与することを含み、
前記多鎖キメラポリペプチドが、
（a）第1のキメラポリペプチドであって、
（i）可溶性腫瘍増殖因子受容体βを含む、第1の標的結合ドメイン、
（i i）可溶性組織因子ドメイン、および
（i i i）一対の親和性ドメインの第1のドメイン
を含む、第1のキメラポリペプチドと、
（b）第2のキメラポリペプチドであって、
（i）一対の親和性ドメインの第2のドメイン、および
（i i）可溶性腫瘍増殖因子受容体βを含む、第2の標的結合ドメイン
を含む、第2のキメラポリペプチドと
を含み、
前記第1のキメラポリペプチドと前記第2のキメラポリペプチドが、前記一対の親和性ドメインの前記第1のドメインと前記第2のドメインとの結合を介して会合している、医薬組成物。
【請求項2】

多鎖 (multi-chain) キメラポリペプチドを含む、がんを有する対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法に使用するための医薬組成物であって、

前記方法は、前記対象に、治療有効量の多鎖キメラポリペプチドを投与することを含み、前記多鎖キメラポリペプチドが、

(a) 第1のキメラポリペプチドであって、

(i) 可溶性腫瘍増殖因子受容体 β を含む、第1の標的結合ドメイン、

(i i) 可溶性組織因子ドメイン、および

(i i i) 一对の親和性ドメインの第1のドメイン

を含む、第1のキメラポリペプチドと、

(b) 第2のキメラポリペプチドであって、

(i) 一对の親和性ドメインの第2のドメイン、および

(i i) 可溶性腫瘍増殖因子受容体 β を含む、第2の標的結合ドメイン

を含む、第2のキメラポリペプチドと

を含み、

前記第1のキメラポリペプチドと前記第2のキメラポリペプチドが、前記一对の親和性ドメインの前記第1のドメインと前記第2のドメインとの結合を介して会合している、医薬組成物。

【請求項3】

前記対象が、がんを有すると特定または診断されている、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記多鎖キメラポリペプチドが、腫瘍増殖因子受容体 β の活性化の減少をもたらす、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記第1の標的結合ドメインと前記可溶性組織因子ドメインが、前記第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記第1のキメラポリペプチドが、前記第1のキメラポリペプチド内の前記第1の標的結合ドメインと前記可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記可溶性組織因子ドメインと前記一对の親和性ドメインの第1のドメインが、前記第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記第1のキメラポリペプチドが、前記第1のキメラポリペプチド内の前記可溶性組織因子ドメインと前記一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記一对の親和性ドメインの第2のドメインと前記第2の標的結合ドメインが、前記第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

第2のキメラポリペプチドが、前記第2のキメラポリペプチド内の前記一对の親和性ドメインの第2のドメインと前記第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記可溶性組織因子ドメインが、血液凝固を刺激しない、請求項1～10のいずれか1項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

前記可溶性組織因子ドメインが、野生型可溶性ヒト組織因子由来の配列を含むか、またはそれからなる、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

前記第 1 の標的結合ドメインが、配列番号 188 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、
前記可溶性組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、
前記一対の親和性ドメインの第 1 のドメインが、配列番号 115 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、
前記一対の親和性ドメインの第 2 のドメインが、配列番号 113 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、および
前記第 2 の標的結合ドメインが、配列番号 188 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、
請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 4】

前記第 1 の標的結合ドメインが、配列番号 188 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、
前記可溶性組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、
前記一対の親和性ドメインの第 1 のドメインが、配列番号 115 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、
前記一対の親和性ドメインの第 2 のドメインが、配列番号 113 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、および
前記第 2 の標的結合ドメインが、配列番号 188 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、
請求項 13 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 5】

前記第 1 の標的結合ドメインが、配列番号 188 を含む、
前記可溶性組織因子ドメインが、配列番号 93 を含む、
前記一対の親和性ドメインの第 1 のドメインが、配列番号 115 を含む、
前記一対の親和性ドメインの第 2 のドメインが、配列番号 113 を含む、および
前記第 2 の標的結合ドメインが、配列番号 188 を含む、
請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 236 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、および
前記第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 193 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、
請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 1 7】

前記第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 236 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、および
前記第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 193 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、
請求項 16 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 1 8】

前記第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 236 を含む、および
前記第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 193 を含む、
請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記がんが膀胱癌である、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

前記がんが卵巣癌である、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記がんが結腸直腸癌である、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

50

【請求項 2 2】

前記がんが乳癌である、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

前記がんが肝細胞癌である、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記がんが黒色腫である、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記がんが胃癌である、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

前記がんが尿路上皮癌である、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2019年3月11日に提出された米国特許出願第62/816,683号、2018年8月30日に提出された米国特許出願第62/725,038号、2019年3月12日に提出された米国特許出願第62/817,244号、2019年7月31日に提出された米国特許出願第62/881,039号、2018年8月30日に提出された米国特許出願第62/724,969号、2019年3月12日に提出された米国特許出願第62/817,230号、2018年8月30日に提出された米国特許出願第62/725,043号、2018年8月30日に提出された米国特許出願第62/725,010号、2018年10月22日に提出された米国特許出願第62/749,007号、2018年10月17日に提出された米国特許出願第62/746,832号、2018年10月23日に提出された米国特許出願第62/749,506号、2019年3月12日に提出された米国特許出願第62/817,241号、および2019年7月31日に提出された米国特許出願第62/881,088号に対する優先権を主張する。

20

【0 0 0 2】

技術分野

本開示は、免疫学および細胞生物学の分野に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

老化は、表現型の変化、アポトーシスへの耐性、および損傷を感知するシグナル伝達経路の活性化を伴う不可逆的な成長停止の一形態である。細胞老化は、増殖する能力を失った培養ヒト線維芽細胞で最初に説明され、約50回の集団倍加（ヘイフリック限界と称される）後に永久停止に達した。老化は、酸化的ストレスおよび遺伝毒性ストレス、DNA損傷、テロメア摩滅、発がん性活性化、ミトコンドリア機能障害、または化学療法剤を含む、広範囲の内因性および外因性傷害によって誘導され得るストレス応答とみなされる。

【0 0 0 4】

40

老化細胞は、代謝的に活性を維持し、それらの分泌表現型を介して組織の止血、疾患、加齢に影響を及ぼし得る。老化は、生理学的プロセスとみなされており、創傷治癒、組織の恒常性、再生、および線維症の調節を促進する上で重要である。例えば、老化細胞の一過性の誘導は、治癒中に観察され、創傷の消散に寄与する。老化はまた、腫瘍抑制において役割を果たす。老化細胞の蓄積は、加齢および加齢関連疾患および状態も促進する。老化の表現型は、慢性炎症反応も引き起こし、その結果、慢性炎症状態を増強して、腫瘍の成長を促進する可能性がある。老化と加齢との間の関連性は、当初、老化細胞が加齢組織に蓄積するという観察に基づいていた。トランスジェニックモデルの使用により、多くの加齢関連障害において老化細胞を体系的に検出することが可能になった。老化細胞を選択的に排除するための戦略は、老化細胞が加齢関連障害において因果的役割を果たすことが

50

できることを実証している。

【発明の概要】

【0005】

概要

本発明は、がんを有する哺乳動物へのNK細胞活性化物質の投与が腫瘍阻害をもたらす、糖尿病動物モデルへのNK細胞活性化物質の投与が皮膚および毛髪の外観および質感の改善、ならびに血糖値の減少を示したという発見に基づいている。本明細書に提供されるこの発見を考慮して、加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効数の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質の治療有効量および／または活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、当該対象に、治療有効数の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質の治療有効量および／または活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。皮膚および／または毛髪

10

【0006】

加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。

【0007】

老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、当該対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、老化細胞は、老化がん細胞、老化単球、老化リンパ球、老化星状細胞、老化ミクログリア、老化ニューロン、老化組織線維芽細胞、老化皮膚線維芽細胞、老化ケラチノサイト、または他の分化組織特異的な分裂機能細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、老化がん細胞は、化学療法によって誘導された老化細胞または放射線によって誘導された老化細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、対象は、加齢関連疾患または状態を有すると特定または診断されている。

30

【0008】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、心臓血管疾患、皮膚疾患、早老症疾患、および脆弱性疾患の群から選択される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃食道癌、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肝臓

40

50

癌、および肝細胞癌の群から選択される。

【0009】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、1型糖尿病である。

【0010】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、代謝性疾患は、肥満、脂肪異常栄養症、および2型真性糖尿病の群から選択される。

【0011】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、および認知症の群から選択される。

10

【0012】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、心臓血管疾患は、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、および肺動脈性肺高血圧症の群から選択される。

【0013】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、皮膚疾患は、創傷治癒、脱毛症、しわ、老人性黒子、皮膚の菲薄化、色素性乾皮症、および先天性角化異常症の群から選択される。

【0014】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、早老症疾患は、早老症およびハッチンソン・ギルフォードプロジェリア早老症症候群の群から選択される。

20

【0015】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、脆弱性疾患は、脆弱、ワクチン接種に対する応答、骨粗鬆症、およびサルコペニアの群から選択される。

【0016】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、加齢関連黄斑変性、骨関節炎、脂肪萎縮、特発性肺線維症、腎移植不全、肝線維症、骨量喪失、サルコペニア、加齢関連肺組織弾性喪失、骨粗しょう症、加齢関連腎機能障害、および化学的に誘導された腎機能障害の群から選択される。

【0017】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、2型糖尿病またはアテローム性動脈硬化症である。

30

【0018】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、投与することは、対象における標的組織の老化細胞の数の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、脂肪組織、膵臓組織、肝臓組織、肺組織、血管系、骨組織、中枢神経系(CNS)組織、眼組織、皮膚組織、筋肉組織、および二次リンパ器官組織の群から選択される。

【0019】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、投与することは、活性化されたNK細胞におけるCD25、CD69、mTORC1、SREBP1、IFN- γ 、およびグランザイムBの発現レベルの増加をもたらす。

40

【0020】

加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0021】

老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、当該対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、老化細胞は、老化がん細胞、老化単球、

50

老化リンパ球、老化星状細胞、老化ミクログリア、老化ニューロン、老化組織線維芽細胞、老化皮膚線維芽細胞、老化ケラチノサイト、または他の分化組織特異的な分裂機能細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、老化がん細胞は、化学療法によって誘導された老化細胞または放射線によって誘導された老化細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、対象は、加齢関連疾患または状態を有すると特定または診断されている。

【0022】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、心臓血管疾患、皮膚疾患、早老症疾患、および脆弱性疾患の群から選択される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃食道癌、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肝臓癌、および肝細胞癌の群から選択される。

10

【0023】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、1型糖尿病である。

20

【0024】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、代謝性疾患は、肥満、脂肪異常栄養症、および2型真性糖尿病の群から選択される。

【0025】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、および認知症の群から選択される。

【0026】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、心臓血管疾患は、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、および肺動脈性肺高血圧症の群から選択される。

30

【0027】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、皮膚疾患は、創傷治癒、脱毛症、しわ、老人性黒子、皮膚の菲薄化、色素性乾皮症、および先天性角化異常症の群から選択される。

【0028】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、早老症疾患は、早老症およびハッチンソン・ギルフォード早老症症候群の群から選択される。

【0029】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、脆弱性疾患は、脆弱、ワクチン接種に対する応答、骨粗鬆症、およびサルコペニアの群から選択される。

40

【0030】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、加齢関連黄斑変性、骨関節炎、脂肪萎縮、特発性肺線維症、腎移植不全、肝線維症、骨量喪失、サルコペニア、加齢関連肺組織弾性喪失、骨粗しょう症、加齢関連腎機能障害、および化学的に誘導された腎機能障害の群から選択される。

【0031】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることとであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることとをさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかの

50

いくつかの実施形態では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、ハプロタイプ一致の休止NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態は、活性化されたNK細胞が対象に投与される前に、活性化されたNK細胞を単離することをさらに含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態は、対象に投与する前に、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体をコードする核酸を、休止NK細胞または活性化されたNK細胞に導入することをさらに含む。

10

【0032】

皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とする対象においてある期間にわたって皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、当該対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0033】

皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とする対象においてある期間にわたって皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、当該対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることをさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、ハプロタイプ一致の休止NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態は、活性化されたNK細胞が対象に投与される前に、活性化されたNK細胞を単離することをさらに含む。

20

30

【0034】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の皮膚の質感および／または外観の改善を提供する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の皮膚におけるしわの形成速度の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の皮膚の着色の改善をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の皮膚の質感の改善をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の毛髪の質感および／または外観の改善を提供する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象における白髪の形成速度の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の白髪の数の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、経時的な対象における毛髪脱落速度の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の毛髪の質感の改善をもたらす。

40

50

【0035】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ある期間は、約1カ月間～約10年間である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の皮膚における老化皮膚線維芽細胞の数の減少をもたらす。

【0036】

肥満の治療の支援を必要とする対象においてある期間にわたって肥満の治療を支援する方法であって、当該対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0037】

肥満の治療の支援を必要とする対象においてある期間にわたって肥満の治療を支援する方法であって、当該対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることをさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、ハプロタイプ一致の休止NK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態は、活性化されたNK細胞が対象に投与される前に、活性化されたNK細胞を単離することをさらに含む。

【0038】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の質量の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間にわたって対象の肥満度指数（BMI）の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、対象における前糖尿病から2型糖尿病への進行速度の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、対象における空腹時血糖値の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、対象におけるインスリン感受性の増加をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、この方法は、対象におけるアテローム性動脈硬化症の重症度の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ある期間は、約2週間～約10年間である。

【0039】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL-2受容体、IL-7受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、IL-33受容体、CD16、CD69、CD25、CD36、CD59、CD352、Nkp80、DNAM-1、2B4、Nkp30、Nkp44、Nkp46、NKG2D、KIR2DS1、KIR2DS2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、およびKIR3DS1のうちの1つ以上の活性化をもたらす。

【0040】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、IL-2受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL-2受容体に特異的に結合する可溶性IL-2またはアゴニスト抗体である。

【0041】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、IL-7受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL-7受容体に特異的に結合する可溶性IL-7またはアゴニスト抗体である。

【0042】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、IL-12受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL-12受容体に特異的に結合する可溶性IL-12またはアゴニスト抗体である。

【0043】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、IL-15受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL-15受容体に特異的に結合する可溶性IL-15またはアゴニスト抗体である。

10

【0044】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、IL-21受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL-21受容体に特異的に結合する可溶性IL-21またはアゴニスト抗体である。

【0045】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、IL-33受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL-33受容体に特異的に結合する可溶性IL-33またはアゴニスト抗体である。

20

【0046】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、CD16受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD16に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0047】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、CD69受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD69に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0048】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、CD25またはCD59受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD25またはCD59に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

30

【0049】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、CD352受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD352に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0050】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、NKP80受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKP80に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

40

【0051】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、DNAM-1受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、DNAM-1に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0052】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、2B4受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、2B4に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0053】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、NKP30受容体

50

の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKp30に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0054】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、NKp44受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKp44に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0055】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、NKp46受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKp46に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

10

【0056】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、NKG2D受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKG2Dに特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0057】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KIR2DS1受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DS1に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0058】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KIR2DS2／3受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DS2／3に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

20

【0059】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KIR2DL4受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DL4に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0060】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KIR2DL4受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DL4に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

30

【0061】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KIR2DS5受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DS5に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0062】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、KIR3DS1受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR3DS1に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0063】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、PD-1、TGF-β受容体、TIGIT、CD1、TIM-3、Siglec-7、IRP60、Tactile、IL1R8、NKG2A／KLRD1、KIR2DL1、KIR2DL2／3、KIR2DL5、KIR3DL1、KIR3DL2、ILT2／LIR-1、およびLAG-2のうちの1つ以上の活性化の減少をもたらす。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、PD-1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、PD-1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性PD-1、可溶性PD-L1、またはPD-L1に特異的に結合する抗体である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、TGF-β受容体の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性TGF-β受容体、T

40

50

G F- β に特異的に結合する抗体、またはT G F- β 受容体に特異的に結合するアンタゴニスト抗体である。

【0064】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、T I G I Tの活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、T I G I Tに特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性T I G I T、またはT I G I Tのリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0065】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、C D 1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、C D 1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性C D 1、またはC D 1のリガンドに特異的に結合する抗体である。

10

【0066】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、T I M-3の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、T I M-3に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性T I M-3、またはT I M-3のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0067】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、S i g l e c-7の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、S i g l e c-7に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、またはS i g l e c-7のリガンドに特異的に結合する抗体である。

20

【0068】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、I R P 6 0の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、I R P 6 0に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、またはI R P 6 0のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0069】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、T a c t i l eの活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、T a c t i l eに特異的に結合するアンタゴニスト抗体、またはT a c t i l eのリガンドに特異的に結合する抗体である。

30

【0070】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、I L 1 R 8の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、I L 1 R 8に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、またはI L 1 R 8のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0071】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、N K G 2 A / K L R D 1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、N K G 2 A / K L R D 1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、またはN K G 2 A / K L R D 1のリガンドに特異的に結合する抗体である。

40

【0072】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K I R 2 D L 1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、K I R 2 D L 1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、またはK I R 2 D L 1のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0073】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K I R 2 D L 2 / 3の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、

50

K I R 2 D L 2 / 3 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、または K I R 2 D L 2 / 3 のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【 0 0 7 4 】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K I R 2 D L 5 の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、K I R 2 D L 5 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、または K I R 2 D L 5 のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【 0 0 7 5 】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K I R 3 D L 1 の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、K I R 3 D L 1 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、または K I R 3 D L 1 のリガンドに特異的に結合する抗体である。

10

【 0 0 7 6 】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、K I R 3 D L 2 の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、K I R 3 D L 2 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、または K I R 3 D L 2 のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【 0 0 7 7 】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、I L T 2 / L I R - 1 の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、I L T 2 / L I R - 1 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、または I L T 2 / L I R - 1 のリガンドに特異的に結合する抗体である。

20

【 0 0 7 8 】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、L A G - 2 の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、L A G - 2 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、または L A G - 2 のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【 0 0 7 9 】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、(i) 第1の標的結合ドメイン、(i i) 可溶性組織因子ドメイン、および (i i i) 第2の標的結合ドメインを含む、一本鎖キメラポリペプチドである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインは、互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

30

40

【 0 0 8 0 】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載

50

の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0081】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。

【0082】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単一ドメイン抗体を含む。

【0083】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PD L-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIRIリガンド、DNAM-1リガンド、NKp46リガンド、NKp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKp30リガンド、s c MHC I リガンド、s c MHC I I リガンド、s c TCR リガンド、PDGF-DD受容体、幹細胞因子 (SCF) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド (FLT3L) 受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体の群から選択される標的に結合する。

【0084】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFの群から選択される。

【0085】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体は、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RIIRI、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である。

【0086】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性ヒト組織因子ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、配列番号93と少なくとも80%同一の配列を含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、配列番号93と少なくとも90%同一の配列を含

む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、配列番号 93 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上を含まない。

10

【0087】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない。

20

【0088】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、第 V I E a 因子に結合することができない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、不活性第 X 因子を第 X a 因子に変換しない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、哺乳動物における血液凝固を刺激しない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、その N 末端および／または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

30

【0089】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、その N 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインを含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1 つ以上の追加の標的結合ドメインは、第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインのうちの 1 つと第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

40

【0090】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、その C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインを含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 1 つは、第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインのうちの 1 つと第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

【0091】

50

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、そのN末端およびC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインを含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、N末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つは、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、N末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、C末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つは、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、C末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

【0092】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じアミノ酸配列を含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じアミノ酸配列を含む。

【0093】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。

【0094】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F vまたは単一ドメイン抗体を含む。

【0095】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PD1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、

CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIRIリガンド、DNAM-1リガンド、NKp46リガンド、NKp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKp30リガンド、sCMHCIRIリガンド、sCMHCIRIRIリガンド、sCTCRリガンド、PDGF-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体の群から選択される標的に特異的に結合する。

【0096】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFの群から選択される。

【0097】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RIIRI、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である。

【0098】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの1つ以上は、(a) (i) 第1の標的結合ドメイン、(ii) 可溶性組織因子ドメイン、および(iii) 一对の親和性ドメインの第1のドメインを含む第1のキメラポリペプチドと、(b) (i) 一对の親和性ドメインの第2のドメインおよび(ii) 第2の標的結合ドメインを含む第2のキメラポリペプチドとを含む多鎖(multichain)キメラポリペプチドであり、第1のキメラポリペプチドと第2のキメラポリペプチドが、一对の親和性ドメインの第1のドメインと第2のドメインとの結合を介して会合している。

【0099】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

【0100】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ド

10

20

30

40

50

メインおよび第2の標的結合ドメインは、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0101】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。

【0102】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F vまたは単一ドメイン抗体を含む。

【0103】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIRIリガンド、DNAM-1リガンド、NKp46リガンド、NKp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKp30リガンド、s c MHCIリガンド、s c MHCIIRIリガンド、s c TCRリガンド、PDGFR- β 受容体、幹細胞因子 (SCF) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド (FLT3L) 受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体の群から選択される標的に特異的に結合する。

【0104】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR- β 、およびSCFの群から選択される。

【0105】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RIIRI、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である。

【0106】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含み、1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つは、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている。本明細書に記載の方法のうちのいずれか

10

20

30

40

50

のいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、可溶性組織因子ドメインと1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間にリンカー配列、および／または1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

【0107】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメインの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと第1の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

【0108】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に配置されており、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、N末端に配置された1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つの追加の標的結合ドメインは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の少なくとも1つの追加の標的結合ドメインと第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、C末端に配置された1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つの追加の標的結合ドメインは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の少なくとも1つの追加の標的結合ドメインと第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つは、可溶性組織因子ドメインおよび／または一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、(i) 可溶性組織因子ドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間、および／または(ii) 一対の親和性ドメインの第1のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む。

【0109】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリ

ペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つは、第2のキメラポリペプチド内の一对の親和性ドメインの第2のドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと一对の親和性ドメインの第2のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

10

【0110】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じアミノ酸配列を含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じアミノ酸配列を含む。

20

【0111】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F vを含む。

30

【0112】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR- β 、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RII Iリガンド、DNAM-1リガンド、NKp4

40

50

6 リガンド、NKp44 リガンド、NKG2D リガンド、NKp30 リガンド、scMHC I リガンド、scMHC II リガンド、scTCR リガンド、PDGFR- α 受容体、幹細胞因子 (SCF) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3 リガンド (FLT3L) 受容体、MICA 受容体、MICB 受容体、ULP16 結合タンパク質受容体、CD155 受容体、および CD122 受容体の群から選択される標的に特異的に結合する。

【0113】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR- α 、および SCF の群から選択される。

10

【0114】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性 TGF- β 受容体 II (TGF- β RII)、可溶性 TGF- β RIII、可溶性 TNF α 受容体、可溶性 IL-4 受容体、または可溶性 IL-10 受容体である。

20

【0115】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性ヒト組織因子ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、配列番号93と少なくとも80%同一の配列を含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、配列番号93と少なくとも90%同一の配列を含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、配列番号93と少なくとも95%同一の配列を含む。

【0116】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸20位に対応するアミノ酸の位置にリジン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸22位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸45位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸58位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸94位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸135位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸140位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの1つ以上を含まない。

30

【0117】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト組織因子ドメインは、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸20位に対応するアミノ酸の位置にリジン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸22位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸45位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸58位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸94位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸135位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸140位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない。

40

50

【0118】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、第V I I a因子に結合することができない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、不活性第X因子を第X a因子に変換しない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドは、哺乳動物における血液凝固を刺激しない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、ヒトIL-15受容体アルファ鎖（IL-15R α ）由来のs u s h iドメインと可溶性IL-15である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性IL-15は、D8NまたはD8Aアミノ酸置換を有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ヒトIL-15R α は、成熟全長IL-15R α である。

10

【0119】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、バルナーゼとバルンスター、PKAとAKAP、変異RNase I断片に基づくアダプター／ドッキングタグモジュール、ならびにタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、およびSNAP25の相互作用に基づくSNAREモジュールの群から選択される。

【0120】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、(a) 第1および第2のキメラポリペプチドであって、各々が、(i) 第1の標的結合ドメイン、(i i) Fcドメイン、および(i i i) 一対の親和性ドメインの第1のドメインを含む、第1および第2のキメラポリペプチドと、(b) 第3および第4のキメラポリペプチドであって、各々が、(i) 一対の親和性ドメインの第2のドメインおよび(i i) 第2の標的結合ドメインを含む、第3および第4のキメラポリペプチドとを含む多鎖キメラポリペプチドであり、第1および第2のキメラポリペプチドならびに第3および第4のキメラポリペプチドは、一対の親和性ドメインの第1のドメインと第2のドメインとの結合を介して会合しており、かつ第1および第2のキメラポリペプチドは、それらのFcドメインを介して会合している。

20

【0121】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインとFcドメインは、第1および第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1および第2のキメラポリペプチドは、第1および第2のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインとFcドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、Fcドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインは、第1および第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1および第2のキメラポリペプチド内のFcドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

30

【0122】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第3および第4のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第3および第4のキメラポリペプチドは、第3および第4のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む。

40

【0123】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載

50

の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0124】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単一ドメイン抗体を含む。

【0125】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIリガンド、DNAM-1リガンド、Nkp46リガンド、Nkp44リガンド、NKG2Dリガンド、Nkp30リガンド、s c MHC I リガンド、s c MHC II リガンド、s c TCR リガンド、PDGFR- β 受容体、幹細胞因子 (SCF) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド (FLT3L) 受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体の群から選択される標的に特異的に結合する。

【0126】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR- β 、およびSCFの群から選択される。

【0127】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RII、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である。

【0128】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、血液凝固を刺激しない可溶性ヒト組織因子ドメインである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、野生型可溶性ヒト組織因子からの配列を含むか、またはそれからなる。

【0129】

本明細書で使用される場合、「キメラ」という用語は、元来2つの異なる源（例えば、

同じ種または異なる種由来の、例えば、2つの異なる天然に存在するタンパク質）に由来するアミノ酸配列（例えば、ドメイン）を含むポリペプチドを指す。例えば、キメラポリペプチドは、少なくとも2つの異なる天然に存在するヒトタンパク質由来のドメインを含み得る。いくつかの例では、キメラポリペプチドは、合成配列であるドメイン（例えば、s c F v）および天然に存在するタンパク質（例えば、天然に存在するヒトタンパク質）に由来するドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、合成配列である少なくとも2つの異なるドメイン（例えば、2つの異なる s c F v）を含み得る。

【0130】

「活性化されたNK細胞」は、例えば、休止NK細胞と比較して、CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP、IFN- γ 、およびグランザイム（例えば、グランザイムB）のうちの2つ以上（例えば、3つ、4つ、5つ、または6つ）の発現レベルの増加を示すNK細胞である。CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP、IFN- γ 、およびグランザイム（例えば、グランザイムB）の発現レベルを同定するための例示的な方法が、本明細書に記載されている。

10

【0131】

「休止NK細胞」は、例えば、活性化されたNK細胞と比較して、CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP、IFN- γ 、およびグランザイム（例えば、グランザイムB）のうちの2つ以上（例えば、3つ、4つ、5つ、または6つ）の減少した発現を有するNK細胞である。

20

【0132】

「NK細胞活性化物質」は、活性化されたNK細胞に進化させるために、休止NK細胞を（単独で、または追加のNK細胞活性化物質と組み合わせて）誘導または促進する作用物質である。NK細胞活性化物質の非限定的な例および態様は、本明細書に記載されている。

【0133】

「抗原結合ドメイン」とは、1つ以上の異なる抗原に特異的に結合することができる1つ以上のタンパク質ドメイン（例えば、単一のポリペプチド由来のアミノ酸から形成されるか、または2つ以上のポリペプチド（例えば、同じまたは異なるポリペプチド）由来のアミノ酸から形成される）である。いくつかの例では、抗原結合ドメインは、天然に存在する抗体の特異性および親和性と同様の特異性および親和性を有する抗原またはエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体またはその断片であり得る。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、代替足場を含み得る。抗原結合ドメインの非限定的な例が本明細書に記載されている。抗原結合ドメインの追加の例が当該技術分野で既知である。

30

【0134】

「可溶性組織因子ドメイン」とは、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを欠く野生型哺乳動物組織因子タンパク質（例えば、野生型ヒト組織因子タンパク質）のセグメントと少なくとも70%の同一性（例えば、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも99%の同一性、または100%同一）を有するポリペプチドを指す。可溶性組織因子ドメインの非限定的な例が本明細書に記載されている。

40

【0135】

「可溶性インターロイキンタンパク質」という用語は、成熟分泌インターロイキンタンパク質またはその生物学的に活性な断片を指すために本明細書で使用される。いくつかの例では、可溶性インターロイキンタンパク質は、野生型成熟分泌哺乳動物インターロイキンタンパク質（例えば、野生型ヒトインターロイキンタンパク質）と少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一であり、かつその生物学的活性を保持する配列を含み得る。可溶性インターロイキンタンパク質

50

の非限定的な例が本明細書に記載されている。

【0136】

「可溶性サイトカインタンパク質」という用語は、成熟分泌サイトカインタンパク質またはその生物学的に活性な断片を指すために本明細書で使用される。いくつかの例では、可溶性サイトカインタンパク質は、野生型成熟分泌哺乳動物インターロイキンタンパク質（例えば、野生型ヒトインターロイキンタンパク質）と少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一であり、かつその生物学的活性を保持する配列を含み得る。可溶性サイトカインタンパク質の非限定的な例が本明細書に記載されている。

10

【0137】

「可溶性インターロイキン受容体」という用語は、本明細書で最も広い意味で使用され、（例えば、生理学的条件下で、例えば、室温のリン酸緩衝生理食塩水中で）その天然リガンドのうちの1つ以上に結合することができる膜貫通ドメイン（および任意に細胞内ドメイン）を欠くポリペプチドを指す。例えば、可溶性インターロイキン受容体は、野生型インターロイキン受容体の細胞外ドメインと少なくとも70%同一（例えば、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）であり、かつその天然リガンドのうちの1つ以上に特異的に結合する能力を保持するが、その膜貫通ドメインを欠く（任意にさらに細胞内ドメインを欠く）配列を含み得る。可溶性インターロイキン受容体の非限定的な例が本明細書に記載されている。

20

【0138】

「可溶性サイトカイン受容体」という用語は、本明細書で最も広い意味で使用され、（例えば、生理学的条件下で、例えば、室温のリン酸緩衝生理食塩水中で）その天然リガンドのうちの1つ以上に結合することができる膜貫通ドメイン（および任意に細胞内ドメイン）を欠くポリペプチドを指す。例えば、可溶性サイトカイン受容体は、野生型サイトカイン受容体の細胞外ドメインと少なくとも70%同一（例えば、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）であり、かつその天然リガンドのうちの1つ以上に特異的に結合する能力を保持するが、その膜貫通ドメインを欠く（任意にさらに細胞内ドメインを欠く）配列を含み得る。可溶性サイトカイン受容体の非限定的な例が本明細書に記載されている。

30

【0139】

「抗体」という用語は、本明細書でその最も広い意味で使用され、抗原またはエピトープに特異的に結合する1つ以上の抗原結合ドメインを含むある特定のタイプの免疫グロブリン分子を含む。抗体には、具体的には、例えば、インタクトな抗体（例えば、インタクトな免疫グロブリン）、抗体断片、および多重特異性抗体が含まれる。抗原結合ドメインの一例は、VH-VL二量体によって形成された抗原結合ドメインである。抗体の追加の例が本明細書に記載されている。抗体の追加の例は当該技術分野で既知である。

【0140】

「親和性」とは、抗原結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原またはエピトープ）との間の非共有相互作用の合計の強さを指す。別途指示されない限り、本明細書で 사용되는場合、「親和性」とは、抗原結合ドメインのメンバーと抗原またはエピトープとの間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離平衡定数 (K_D) で表され得る。解離平衡定数に寄与する動力学的成分は、以下でより詳細に記載される。親和性は、本明細書に記載の方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定され得る。親和性は、例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術（例えば、BIAcore（登録商標））または生体層干渉法（例えば、FORTEBIO（登録商標））を使用して決定され得る。抗原結合ドメインおよびその対応する抗原またはエピトープに対する親和性を決定するための追加の方法は、当該技

40

50

術分野で既知である。

【0141】

本明細書で使用される「一本鎖ポリペプチド」は、一本のタンパク質鎖を指す。

【0142】

本明細書で使用される「多鎖ポリペプチド」とは、2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、または10）のタンパク質鎖（例えば、少なくとも第1のキメラポリペプチドおよび第2のポリペプチド）を含むポリペプチドを指し、2つ以上のタンパク質鎖が非共有結合を介して結合して、四次構造を形成する。

【0143】

「一对の親和性ドメイン」という用語は、 1×10^{-7} M未満（例えば、 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、または 1×10^{-11} M未満）の K_D で互いに特異的に結合する2つの異なるタンパク質ドメインである。いくつかの例では、一对の親和性ドメインは、一对の天然に存在するタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、一对の合成タンパク質であり得る。一对の親和性ドメインの非限定的な例が本明細書に記載されている。

【0144】

「エピトープ」という用語は、抗原結合ドメインに特異的に結合する抗原の一部を意味する。エピトープは、例えば、表面接触可能アミノ酸残基および／または糖側鎖からなり得、特定の三次元構造特性、ならびに特定の電荷特性を有し得る。立体配座エピトープおよび非立体配座エピトープは、変性溶媒の存在下で前者への結合が失われる可能性があるが、後者への結合が失われる可能性がないという点で区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基を含み得る。抗原結合ドメインが結合するエピトープを特定するための方法は、当該技術分野で既知である。

【0145】

「治療」という用語は、障害の少なくとも1つの症状を改善することを意味する。いくつかの例では、治療される障害はがんであり、がんの少なくとも1つの症状を改善することは、異常な増殖、遺伝子発現、シグナル伝達、翻訳、および／または因子の分泌を減少させることを含む。一般に、治療方法は、かかる治療を必要とするか、またはかかる治療を必要とすると決定された対象に、治療有効量の障害の少なくとも1つの症状を軽減する組成物を投与することを含む。

【0146】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。方法および材料は、本発明で使用するために本明細書に記載されており、当該技術分野で既知の他の好適な方法および材料も使用され得る。材料、方法、および実施例は、単なる例示であり、限定することを意図するものではない。本明細書に記載の全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、および他の参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。矛盾が生じた場合、定義を含む本明細書が制御するものとする。

【0147】

[本発明1001]

加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

[本発明1002]

老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、前記対象に、治療有効量の1つ以上のNK細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

[本発明1003]

前記投与することが、前記対象における標的組織の老化細胞の数の減少をもたらす、本

10

20

30

40

50

発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

前記標的組織が、脂肪組織、膵臓組織、肝臓組織、肺組織、血管系、骨組織、中枢神経系（CNS）組織、眼組織、皮膚組織、筋肉組織、および二次リンパ器官組織からなる群から選択される、本発明1003の方法。

[本発明1005]

加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法。

[本発明1006]

老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、前記対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法。

[本発明1007]

前記対象が、加齢関連疾患または状態を有すると特定または診断されている、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

前記加齢関連疾患または状態が、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、心臓血管疾患、皮膚疾患、早老症疾患、および脆弱性疾患からなる群から選択される、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記がんが、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃食道癌、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肝臓癌、および肝細胞癌からなる群から選択される、本発明1008の方法。

[本発明1010]

前記自己免疫疾患が1型糖尿病である、本発明1008の方法。

[本発明1011]

前記代謝性疾患が、肥満、リポジストロフィー、および2型真性糖尿病からなる群から選択される、本発明1008の方法。

[本発明1012]

前記神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、および認知症からなる群から選択される、本発明1008の方法。

[本発明1013]

前記心臓血管疾患が、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、および肺動脈高血圧症からなる群から選択される、本発明1008の方法。

[本発明1014]

前記皮膚疾患が、創傷治癒、脱毛症、しわ、老年性黒子、皮膚の菲薄化、色素性乾皮症、および先天性角化異常症からなる群から選択される、本発明1008の方法。

[本発明1015]

前記早老症疾患が、早老症およびハッチンソン・ギルフォード早老症症候群からなる群から選択される、本発明1008の方法。

[本発明1016]

前記脆弱性疾患が、脆弱、ワクチン接種に対する応答、骨粗しょう症、およびサルコペニアからなる群から選択される、本発明1008の方法。

[本発明1017]

10

20

30

40

50

前記加齢関連疾患または状態が、加齢関連黄斑変性、骨関節炎、脂肪萎縮、特発性肺線維症、腎移植不全、肝線維症、骨量喪失、サルコペニア、加齢関連肺組織弾性喪失、骨粗しょう症、加齢関連腎機能障害、および化学的に誘導された腎機能障害からなる群から選択される、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1018]

前記加齢関連疾患または状態が、2型糖尿病またはアテローム性動脈硬化症である、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1019]

皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とする対象においてある期間にわたって皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、前記対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

10

[本発明1020]

皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とする対象においてある期間にわたって皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、前記対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法。

[本発明1021]

前記期間にわたって前記対象の皮膚の質感および／または外観の改善を提供する、本発明1019または1020の方法。

[本発明1022]

20

前記期間にわたって前記対象の皮膚のしわの形成速度の減少をもたらす、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記期間にわたって前記対象の皮膚の着色の改善をもたらす、本発明1021または1022の方法。

[本発明1024]

前記期間にわたって前記対象の皮膚の質感の改善をもたらす、本発明1021～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

前記期間にわたって前記対象の毛髪の質感および／または外観の改善を提供する、本発明1020～1024のいずれかの方法。

30

[本発明1026]

前記期間にわたって前記対象の白髪の形成速度の減少をもたらす、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記期間にわたって前記対象の白髪の数の減少をもたらす、本発明1025または1026の方法。

[本発明1028]

経時的に前記対象の毛髪脱落速度の減少をもたらす、本発明1025～1027のいずれかの方法。

[本発明1029]

40

前記期間にわたって前記対象の毛髪の質感の改善をもたらす、本発明1025～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

前記期間にわたって前記対象の皮膚の老化皮膚線維芽細胞の数の減少をもたらす、本発明1019～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

肥満の治療の支援を必要とする対象においてある期間にわたって肥満の治療を支援する方法であって、前記対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

[本発明1032]

50

(i i) 可溶性組織因子ドメイン、および
(i i i) 第2の標的結合ドメイン
を含む一本鎖キメラポリペプチドである、本発明1001～1041のいずれかの方法。
[本発明1045]
前記第1の標的結合ドメインと前記可溶性組織因子ドメインが、互いに直接隣接している
、本発明1044の方法。
[本発明1046]
前記一本鎖キメラポリペプチドが、前記第1の標的結合ドメインと前記可溶性組織因子ド
メインとの間にリンカー配列をさらに含む、本発明1044の方法。
[本発明1047]
前記可溶性組織因子ドメインと前記第2の標的結合ドメインが、互いに直接隣接している
、本発明1044～1046のいずれかの方法。
[本発明1048]
前記一本鎖キメラポリペプチドが、前記可溶性組織因子ドメインと前記第2の標的結合ド
メインとの間にリンカー配列をさらに含む、本発明1044～1046のいずれかの方法。
[本発明1049]
前記1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、多鎖キメラポリペプチド
であり、前記多鎖キメラポリペプチドが、
(e) 第1のキメラポリペプチドであって、
(i) 第1の標的結合ドメイン、
(i i) 可溶性組織因子ドメイン、および
(i i i) 一对の親和性ドメインの第1のドメイン
を含む、第1のキメラポリペプチドと、
(f) 第2のキメラポリペプチドであって、
(i) 一对の親和性ドメインの第2のドメイン、および
(i i) 第2の標的結合ドメイン
を含む、第2のキメラポリペプチドと
を含み、
前記第1のキメラポリペプチドと前記第2のキメラポリペプチドが、前記一对の親和性ド
メインの前記第1のドメインと前記第2のドメインとの結合を介して会合している、本発明
1001～1041のいずれかの方法。
[本発明1050]
前記第1の標的結合ドメインと前記可溶性組織因子ドメインが、前記第1のキメラポリペ
プチド内で互いに直接隣接している、本発明1049の方法。
[本発明1051]
前記第1のキメラポリペプチドが、前記第1のキメラポリペプチド内の前記第1の標的結
合ドメインと前記可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、本発明10
49の方法。
[本発明1052]
前記可溶性組織因子ドメインと前記一对の親和性ドメインの第1のドメインが、前記第1
のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、本発明1049～1051のいずれかの方
法。
[本発明1053]
前記第1のキメラポリペプチドが、前記第1のキメラポリペプチド内の前記可溶性組織因
子ドメインと前記一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに
含む、本発明1049～1051いずれかの方法。
[本発明1054]
前記一对の親和性ドメインの第2のドメインと前記第2の標的結合ドメインが、前記第2
のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、本発明1049～1053のいずれかの方
法。

10

20

30

40

50

[本発明1055]

第2のキメラポリペプチドが、前記第2のキメラポリペプチド内の前記一対の親和性ドメインの第2のドメインと前記第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、本発明1049～1053のいずれかの方法。

[本発明1056]

前記1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、多鎖キメラポリペプチドであり、前記多鎖キメラポリペプチドが、

(a) 第1および第2のキメラポリペプチドであって、各々が、

(i) 第1の標的結合ドメイン、

(ii) Fcドメイン、および

(iii) 一対の親和性ドメインの第1のドメイン

を含む、第1および第2のキメラポリペプチドと、

(b) 第3および第4のキメラポリペプチドであって、各々が、

(i) 一対の親和性ドメインの第2のドメイン、および

(ii) 第2の標的結合ドメイン

を含む、第3および第4のキメラポリペプチドと

を含み、

前記第1および第2のキメラポリペプチドと前記第3および第4のキメラポリペプチドが、前記一対の親和性ドメインの前記第1のドメインと前記第2のドメインとの結合を介して会合しており、かつ前記第1および第2のキメラポリペプチドが、それらのFcドメインを介して会合している、本発明1001～1041のいずれかの方法。

[本発明1057]

前記第1の標的結合ドメインおよび前記第2の標的結合ドメインの一方または両方が、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PD L-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RII リガンド、DNAM1リガンド、NKp46リガンド、NKp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKp30リガンド、scMHC I リガンド、scMHC II リガンド、scTCR リガンド、PDGF-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、本発明1044～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

前記第1の標的結合ドメインおよび前記第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、本発明1044～1056のいずれかの方法。

[本発明1059]

前記可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFからなる群から選択される、本発明1058の方法。

[本発明1060]

前記第1の標的結合ドメインおよび前記第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、本発明1044～1056のいずれかの方法。

[本発明1061]

前記可溶性受容体が、可溶性TGF-β受容体ⅠⅠ(TGF-βRIⅠ)、可溶性TGF-βRIⅠⅠ、可溶性TNFα受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である、本発明1060の方法。

[本発明1062]

前記可溶性組織因子ドメインが、血液凝固を刺激しない可溶性ヒト組織因子ドメインである、本発明1044～1055のいずれかの方法。

[本発明1063]

前記可溶性組織因子ドメインが、野生型可溶性ヒト組織因子由来の配列を含むか、またはそれからなる、本発明1043～1055のいずれかの方法。

本発明の他の特徴および利点は、以下の発明を実施するための形態および図、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0148】

【図1】図1A～1Bは、C57BL/6マウスにおける例示的な多鎖ポリペプチドの免疫刺激の結果を示す。図1Aは、対照溶液で処理したマウスと比較して、例示的な多鎖ポリペプチドの用量を増加させて処理したマウスの脾臓重量を示す。図1Bは、対照溶液で処理したマウスと比較して、例示的な多鎖ポリペプチドの用量を増加させて処理したマウスの脾臓に存在する免疫細胞型のパーセンテージを示す。

【図2】図2A～2Bは、C57BL/6マウスにおける例示的な多鎖ポリペプチドの免疫刺激の持続時間を示す。図2Aは、3mg/kgの例示的な多鎖ポリペプチドで処理したマウスにおける92時間にわたる脾臓重量を示す。図2Bは、3mg/kgの例示的な多鎖ポリペプチドで処理したマウスにおける92時間にわたる脾臓に存在する免疫細胞型のパーセンテージを示す。

【図3】図3A～3Bは、例示的な多鎖ポリペプチドによって誘導される免疫細胞におけるKi67およびグランザイムBの発現を示す。図3Aは、多鎖ポリペプチドによる処理後の様々な時点で、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびCD19⁺ B細胞におけるKi67の発現を示す。図3Bは、多鎖ポリペプチドによる処理後の様々な時点で、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびCD19⁺ B細胞におけるグランザイムBの発現を示す。

【図4】処理後の様々な時点で、例示的な多鎖ポリペプチドで処理したマウスから調製した脾細胞による腫瘍阻害の効果を示す。

【図5】図5A～5Bは、対照食、高脂肪食を与え、未処理のB6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/Jマウス(The Jackson Laboratoryから購入)、および高脂肪食を与え、TGFRt15-TGFRs、2t2、または21t15-TGFRsで処理したマウスの血液中のCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、CD19⁺ B細胞のパーセンテージおよび増殖速度を示す。図5Aは、各対照および実験群における異なる細胞型のパーセンテージを示す。図5Bは、各対照および実験群における異なる細胞型の増殖速度を示す。

【図6】図6A～6Eは、対照食または高脂肪食のいずれかを与え、未処理またはTGFRt15-TGFR、2t2、もしくは21t15-TGFRsで処理したマウスの例示的な身体的外観を示す。

【図7】対照食または高脂肪食のいずれかを与え、未処理またはTGFRt15-TGFR、2t2、もしくは21t15-TGFRsで処理したマウスの空腹時体重を示す。

【図8】対照食または高脂肪食のいずれかを与え、未処理またはTGFRt15-TGFR、2t2、もしくは21t15-TGFRsで処理したマウスの空腹時血糖値を示す。

【図9】図9A～9Fは、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞および老化遺伝子の発現を示す。図9Aは、SAβ-gal染色を使用して視覚化された老化B16F10細胞の化学療法の誘導を示す。図9B～9Fは、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞におけるp21、IL6、DPP4、RATE1E、およびULBP1の経時的な発現を示す。

10

20

30

40

50

【図10】図10A～10Fは、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞によるコロニー形成および幹細胞マーカーの発現を示す。図10Aは、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞によるコロニー形成を示す。図10Bおよび10Cは、対照B16F10細胞と比較した、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞によるOct4 mRNAおよびNctch4 mRNAの発現を示す。図10D～10Fは、CD44、CD24、およびCD133を含む3つの幹細胞マーカーのうちの2つの幹細胞マーカーに対する化学療法によって誘導された老化B16F10細胞の二重陽性のパーセンテージを示す。

【図11】図11A～11Cは、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞の遊走性および浸潤性を示す。図11Aは、幹細胞の特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞（B16F10-SNC-CSC）を対照B16F10細胞と比較した遊走アッセイの結果を示す。図11Bおよび11Cは、幹細胞の特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞（B16F10-SNC-CSC）を対照B16F10細胞と比較した浸潤アッセイの結果を示す。

【図12】図12Aおよび12Bは、幹細胞の特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞（B16F10-SNC-CSC）または対照B16F10細胞に対するインビトロで増殖したNK細胞およびそれらの細胞傷害性を示す。図12Aは、インビトロで増殖したNK細胞を得るプロセスの例示的な概略図を示す。図12Bは、幹細胞の特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞（B16F10-SNC-CSC）または対照B16F10細胞に対する増殖したNK細胞の細胞傷害性を示す。

【図13】図13A～13Cは、マウス黒色腫モデルを使用した併用療法の結果を示す。図13Aは、マウスモデルにおいて黒色腫を治療するための例示的な概略図を示す。図13Bおよび13Cは、化学療法またはTA99治療単独と比較した、TGFRt15-TGFRを含む併用治療による経時的な腫瘍体積の変化を示す。

【図14】対照SW1990細胞と比較した、ヒト膵臓腫瘍細胞株SW1990における老化の誘導ならびに老化SW1990細胞におけるCD44およびCD24の発現を示す。

【図15】化学療法によって誘導された老化SW1990細胞による老化マーカーの発現を示す。

【図16】化学療法によって誘導された老化SW1990細胞または対照SW1990細胞に対するインビトロで活性化したヒトNK細胞の細胞傷害性を示す。

【図17】例示的なIL-12/IL-15RαSu DNA構築物の概略図を示す。

【図18】例示的なIL-18/TF/IL-15 DNA構築物の概略図を示す。

【図19】例示的なIL-12/IL-15RαSu DNA構築物とIL-18/TF/IL-15 DNA構築物との間の相互作用の概略図を示す。

【図20】IL-18/TF/IL-15:IL-12/IL-15RαSu複合体（18t15-12s）をもたらす、例示的なIL-12/IL-15RαSu融合タンパク質とIL-18/TF/IL-15融合タンパク質との間の相互作用の概略図を示す。

【図21】抗TF抗体親和性カラムからの18t15-12s精製溶出のクロマトグラフを示す。

【図22】分析的サイズ排除カラム上での溶出後の抗TF抗体/SEC精製18t15-12sタンパク質の例示的なクロマトグラフィープロファイルを示し、タンパク質凝集体からの単量体多タンパク質18t15-12s複合体の分離を示す。

【図23】ジスルフィド結合の還元後の18t15-12s複合体の4～12%SDS-PAGEの例を示す。レーン1: SeeBlue Plus 2マーカー、レーン2: 抗TF Ab精製18t15-12s (0.5 μg)、レーン3: 抗TF Ab精製18t15-12s (1 μg)。

【図24】脱グリコシル化および非脱グリコシル化18t15-12sのSDS PAGE分析を示す。レーン1: 抗TF Ab精製18t15-12s (0.5 μg) (非脱グリコシル化)、レーン2: 抗TF Ab精製18t15-12s (1 μg) (非脱グリコシル化)、レーン3: 18t15-12s (1 μg) (脱グリコシル化)、レーン4: M

10

20

30

40

50

ark12 非染色マーカー。

【図25】抗ヒト組織因子捕捉抗体およびビオチン化抗ヒトIL-12検出抗体（BAF 219）を含む18t15-12s複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図26】抗ヒト組織因子捕捉抗体およびビオチン化抗ヒトIL-15検出抗体（BAM 247、R&D Systems）を含む18t15-12s複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図27】抗ヒト組織因子捕捉抗体およびビオチン化抗ヒトIL-18検出抗体（D045-6）を含む18t15-12s複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図28】抗ヒト組織因子（I43）捕捉抗体および抗ヒト組織因子検出抗体を含む18t15-12s複合体のサンドイッチELISAを示す。

10

【図29】18t15-12s複合体（白四角）および組換えIL-15（黒四角）によって媒介されたIL-15依存性32Dβ細胞の増殖を示す。

【図30】18t15-12s複合体（白四角）内のIL-18の生物学的活性を示し、組換えIL-18（黒四角）および組換えIL-12（黒丸）が、それぞれ、陽性対照および陰性対照として機能する。

【図31】18t15-12s複合体（白四角）内のIL-12の生物学的活性を示し、組換えIL-12（黒丸）および組換えIL-18（黒四角）が、それぞれ、陽性対照および陰性対照として機能する。

【図32】図32Aおよび32Bは、18t15-12s複合体によって誘導されたNK細胞のCD25の細胞表面発現および18t15-12s複合体によって誘導されたNK細胞の細胞表面CD69発現を示す。

20

【図33】18t15-12s複合体によって誘導されたNK細胞の細胞内IFN-γ発現のフローサイトメトリーグラフを示す。

【図34】K562細胞に対する18t15-12s誘導性ヒトNK細胞の細胞傷害性を示す。

【図35】例示的なIL-12/IL-15RαSu/αCD16 DNA構築物の概略図を示す。

【図36】例示的なIL-18/TF/IL-15 DNA構築物の概略図を示す。

【図37】例示的なIL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv DNA構築物とIL-18/TF/IL-15 DNA構築物との間の相互作用の概略図を示す。

30

【図38】例示的な18t15-12s/αCD16タンパク質複合体の概略図を示す。

【図39】抗ヒト組織因子捕捉抗体およびビオチン化抗ヒトIL-12（BAF 219）（暗線）または抗ヒト組織因子検出抗体（薄線）を含む18t15-12s16複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図40】例示的なTGFBRII/IL-15RαSu DNA構築物の概略図を示す。

【図41】例示的なIL-21/TF/IL-15構築物の概略図を示す。

【図42】例示的なIL-IL-21/TF/IL-15構築物とTGFBRII/IL-15RαSu構築物との間の相互作用の概略図を示す。

【図43】IL-21/TF/IL-15/TGFBRII/IL-15RαSu複合体（21t15-TGFRs）をもたらす、例示的なTGFBRII/IL-15RαSu融合タンパク質とIL-21/TF/IL-15融合タンパク質との間の相互作用の概略図を示す。

40

【図44】抗TF抗体親和性カラムからの21t15-TGFRs精製溶出のクロマトグラフを示す。

【図45】主なタンパク質ピークおよび高分子量ピークを示す例示的な21t15-TGFRsサイズ排除クロマトグラフを示す。

【図46】ジスルフィド結合の還元後の21t15-TGFRs複合体の4～12%SDS-PAGEの例を示す。レーン1：Mark12非染色マーカー（左側の数字はkDa単位での分子量を示す）、レーン2：21t15-TGFRs（0.5μg）、レーン3：21t15-TGFRs（1μg）、レーン4：21t15-TGFRs（脱グリコシ

50

ル化) (1 μ g)、MWは、予想サイズ53 kDaおよび39.08 kDaであった。

【図47】抗ヒト組織因子捕捉抗体およびビオチン化抗ヒトIL-21検出抗体(13-7218-81、BioLegend)を含む21t15-TGFRs複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図48】抗ヒト組織因子捕捉抗体およびビオチン化抗ヒトIL-15検出抗体(BAM247、R&D Systems)を含む21t15-TGFRs複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図49】抗ヒト組織因子捕捉抗体およびビオチン化抗ヒトTGFBRII検出抗体(BAF241、R&D Systems)を含む21t15-TGFRs複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図50】抗ヒト組織因子(I43)捕捉抗体および抗ヒト組織因子検出抗体を含む21t15-TGFRs複合体のサンドイッチELISAを示す。

【図51】IL-15(黒四角)と比較した21t15-TGFRs複合体(白四角)によって媒介された32D β 細胞のIL-15依存性増殖を示す。

【図52】21t15-TGFRs複合体(白四角)内のTGFBRIIDメインの生物学的活性を示す。TGFBRII/Fc(黒四角)は、陽性対照として機能した。

【図53】21t15-TGFRs複合体によって誘導されたNK細胞の細胞表面CD25発現のフローサイトメトリーグラフを示す。

【図54】21t15-TGFRs複合体によって誘導されたNK細胞の細胞表面CD69発現のフローサイトメトリーグラフを示す。

【図55】21t15-TGFRs複合体によって誘導されたNK細胞の細胞内IFN- γ 発現のフローサイトメトリーグラフを示す。

【図56】K562細胞に対する21t15-TGFRsによって誘導されたヒトNK細胞の細胞傷害性を示す。

【図57】例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドの概略図である。

【図58】抗組織因子親和性カラムからの例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドの溶出を示すクロマトグラフである。

【図59】例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドでロードしたSuperdex 200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラムの溶出を示すクロマトグラフである。

【図60】抗組織因子親和性カラムを使用して精製された例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル(4~12% NuPage Bis-Trisゲル)である。

【図61】実施例1に記載の方法を使用して実施した例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドのELISA定量を示すグラフである。精製した組織因子を、対照として使用した。

【図62】例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドが2人のドナーからの血液から単離されたCD4⁺ T細胞におけるCD25発現を刺激する能力を示すグラフである。実験は、実施例2に記載されているように実施された。

【図63】例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドが2人のドナーからの血液から単離されたCD8⁺ T細胞におけるCD25発現を刺激する能力を示すグラフである。実験は、実施例2に記載されているように実施された。

【図64】例示的な α CD3scFv/Tf/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドが2人のドナーからの血液から単離されたCD4⁺ T細胞におけるCD69発現を刺激する能力を示すグラフである。実験は、実施例2に記載されているように実施された。

【図65】例示的なIL-7/IL-15R α Su DNA構築物の概略図を示す。

【図66】例示的なIL-21/Tf/IL-15 DNA構築物の概略図を示す。

【図67】例示的なIL-7/IL-15R α Su DNA構築物とIL-21/Tf/IL-15 DNA構築物との間の相互作用の概略図を示す。

10

20

30

40

50

【図68】IL-21/TF/IL-15:IL-7/IL-15R α Su複合体(21t15-7s)をもたらす、例示的なIL-7/IL-15R α Su融合タンパク質とIL-21/TF/IL-15融合タンパク質との間の相互作用の概略図を示す。

【図69】例示的なIL-21/IL-15R α Su DNA構築物の概略図を示す。

【図70】例示的なIL-7/TF/IL-15 DNA構築物の概略図を示す。

【図71】例示的なIL-21/IL-15R α Su DNA構築物とIL-7/TF/IL-15 DNA構築物との間の相互作用の概略図を示す。

【図72】IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15R α SU複合体(7t15-21s)をもたらす、例示的なIL-21/IL-15R α Su融合タンパク質とIL-7/TF/IL-15融合タンパク質との間の相互作用の概略図を示す。

10

【図73】2体の異なるドナーの血液から単離したヒトNK細胞(2×10^6 細胞/mL)のピコモル/分単位での酸素消費速度(OCR)を示す。

【図74】2体の異なるドナーの血液から単離されたヒトNK細胞(2×10^6 細胞/mL)のmpH/分単位での細胞外酸性化速度(ECAR)を示す。

【図75】7t15-16s21構築物の概略図を示す。

【図76】7t15-16s21構築物の追加の概略図を示す。

【図77】図77Aおよび77Bは、対照タンパク質と比較した、ヒトCD16bを発現するCHO細胞への7t15-16s21の結合を示す。

【図78】図78A~78Cは、7t15-16s21の検出にIL-15、IL-21、およびIL-7に対する抗体を使用したELISA実験の結果である。

20

【図79】7t15-16s21または組換えIL-15を用いた32D β 細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図80】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後の7t15-16s21タンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す。

【図81】7t15-16s21の分析的SECプロファイルを示す。

【図82】TGFRt15-16s21構築物の概略図を示す。

【図83】TGFRt15-16s21構築物の追加の概略図を示す。

【図84】図84Aおよび84Bは、TGFRt15-16s21および7t15-21sのヒトCD16bを発現するCHO細胞との結合親和性を示す。図84Aは、TGFRt15-16s21のヒトCD16bを発現するCHO細胞との結合親和性を示す。図84Bは、7t15-21sのヒトCD16bを発現するCHO細胞との結合親和性を示す。

30

【図85】TGFRt15-16s21およびTGFR-FcによるTGF β 1阻害の結果を示す。

【図86】TGFRt15-16s21または組換えIL-15を用いた32D β 細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図87】図87A~87Cは、ELISAを使用してTGFRt15-16s21中のIL-15、IL-21、およびTGF β RIIを対応する抗体で検出した結果を示す。

【図88】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後のTGFRt15-16s21タンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す。

【図89】TGFRt15-16s21の還元SDS-PAGE分析の結果を示す。

40

【図90】7t15-7s構築物の概略図を示す。

【図91】7t15-7s構築物の追加の概略図を示す。

【図92】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後の7t15-7sタンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す。

【図93】ELISAを使用した7t15-7s中のTF、IL-15、およびIL-7の検出を示す。

【図94】図94Aおよび94Bは、TGFRt15-TGFRs処理マウスおよび対照処理マウスにおける脾臓重量および免疫細胞型のパーセンテージを示す。図94Aは、PBS対照と比較した7t15-7sで処理したマウスにおける脾臓重量を示す。図94Bは、PBS対照と比較した7t15-7sで処理したマウスにおけるCD4⁺T細胞、

50

CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージを示す。

【図95】TGFRt15-TGFRs構築物の概略図を示す。

【図96】TGFRt15-TGFRs構築物の追加の概略図を示す。

【図97】TGFRt15-TGFRsおよびTGFR-FcによるTGFβ1阻害の結果を示す。

【図98】TGFRt15-TGFRsまたは組換えIL-15を用いた32Dβ細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図99】図99Aおよび99Bは、ELISAを使用してTGFRt15-TGFRs中のIL-15およびTGFβRIIを対応する抗体で検出した結果を示す。

【図100】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後のTGFRt15-TGFRsタンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。

【図101】TGFRt15-TGFRsの分析的SECプロファイルを示す。

【図102】還元SDS-PAGEによって分析された脱グリコシル化前および脱グリコシル化後のTGFRt15-TGFRsを示す。

【図103】図103Aおよび103Bは、TGFRt15-TGFRs処理マウスおよび対照処理マウスにおける脾臓重量および免疫細胞型のパーセンテージを示す。図103Aは、PBS対照と比較したTGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける脾臓重量を示す。図103Bは、PBS対照と比較したTGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおけるCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージを示す。

【図104】図104Aおよび104Bは、TGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける92時間にわたる脾臓重量および免疫刺激を示す。図104Aは、処理後16、24、48、72、および92時間時点でのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスの脾臓重量を示す。図104Bは、処理後16、24、48、72、および92時間時点でのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける免疫細胞のパーセンテージを示す。

【図105】図105Aおよび105Bは、TGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおけるKi67およびグランザイムB発現を経時的に示す。

【図106】C57BL/6マウスにおけるTGFRt15-TGFRsによる脾細胞の細胞傷害性の増強を示す。

【図107】脾臓癌マウスモデルにおける、PBS処理、化学療法のみ、TGFRt15-TGFRsのみ、または化学療法とTGFRt15-TGFRsとの組み合わせにตอบสนองした腫瘍サイズの変化を示す。

【図108】TGFRt15-TGFRsで処理したマウスから単離されたNK細胞の細胞傷害性を示す。

【図109】7t15-21s137L（ロングバージョン）構築物の概略図を示す。

【図110】7t15-21s137L（ロングバージョン）構築物の追加の概略図を示す。

【図111】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後の7t15-21s137L（ロングバージョン）タンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。

【図112】7t15-21s137L（ロングバージョン）の分析的SECプロファイルを示す。

【図113】7t15-21s137L（ショートバージョン）のCD137L（4.1BBL）への結合を示す。

【図114】図114A~114Cは、ELISAを用いた7t15-21s137L（ショートバージョン）中のIL-15、IL21、およびIL7の検出を示す。図114Aは、ELISAを用いた7t15-21s137L（ショートバージョン）中のIL-15の検出を示す。図114Bは、ELISAを用いた7t15-21s137L（ショ

10

20

30

40

50

ートバージョン)中のIL21の検出を示す。図114Cは、ELISAを用いた7t15-21s137L(ショートバージョン)中のIL7の検出を示す。

【図115】CTLL-2細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図116】IL21R含有B9細胞増殖の促進における7t15-1s137L(ショートバージョン)の活性を示す。

【図117】7t15-TGFRs構築物の概略図を示す。

【図118】7t15-TGFRs構築物の追加の概略図を示す。

【図119】7t15-TGFRsおよびTGFR-FcによるTGFβ1阻害の結果を示す。

【図120】図120A~120Cは、ELISAを用いた7t15-TGFRs中のIL-15、TGFβRII、およびIL-7の検出を示す。

10

【図121】7t15-TGFRsまたは組換えIL-15を用いた32Dβ細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図122】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後の7t15-TGFRsタンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。

【図123】還元SDS-PAGEを使用して分析された脱グリコシル化前および脱グリコシル化後の7t15-TGFRsを示す。

【図124】7t15-TGFRsタンパク質中のIL-7、IL-15、およびTGFβRIIのELISA検出を示す。

【図125】図125Aおよび125Bは、TGFRt15-TGFRs処理マウスおよび対照処理マウスにおける脾臓重量および免疫細胞型のパーセンテージを示す。図125Aは、PBS対照と比較した、様々な投薬量の7t15-TGFRsで処理したマウスの脾臓重量を示す。図125Bは、PBS対照と比較した、様々な投薬量の7t15-TGFRsで処理したマウスにおけるCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージを示す。

20

【図126】図126Aおよび126Bは、C57BL/6マウスにおける7t15-TGFRsによるCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞のCD44発現のアップレギュレーションを示す。

【図127】図127Aおよび127Bは、C57BL/6マウスにおける7t15-TGFRsによるCD8⁺ T細胞およびNK細胞のKi67発現およびグランザイムB発現のアップレギュレーションを示す。

30

【図128】C57BL/6マウスにおける7t15-TGFRsによる脾細胞の細胞傷害性の増強を示す。

【図129】TGFRt15-21s137L構築物の概略図を示す。

【図130】TGFRt15-21s137L構築物の追加の概略図を示す。

【図131】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後のTGFRt15-21s137Lタンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。

【図132】TGFRt15-TGFRs21構築物の概略図を示す。

【図133】TGFRt15-TGFRs21構築物の追加の概略図を示す。

40

【図134】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後のTGFRt15-TGFRs21タンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。

【図135】還元SDS-PAGEによって分析された脱グリコシル化前および脱グリコシル化後のTGFRt15-TGFRs21を示す。

【図136】図136Aおよび136Bは、ELISAを使用したTGFRt15-TGFRs21成分の検出を示す。

【図137】図137Aおよび137Bは、対照処理マウスおよびTGFRt15-TGFRs21処理マウスの脾臓に存在するCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびナチュラルキラー(NK)細胞のパーセンテージおよび増殖を示す。

50

【図138】TGFRt15-TGFRs21で処理したマウスにおける脾細胞のグランザイムB発現のアップレギュレーションを示す。

【図139】C57BL/6マウスにおけるTGFRt15-TGFRs21による脾細胞の細胞傷害性の増強を示す。

【図140】TGFRt15-TGFRs16構築物の概略図を示す。

【図141】TGFRt15-TGFRs16構築物の追加の概略図を示す。

【図142】TGFRt15-TGFRs137L構築物の概略図を示す。

【図143】TGFRt15-TGFRs137L構築物の追加の概略図を示す。

【図144】例示的な2t2一本鎖キメラポリペプチドの概略図である。

【図145】32Dβ細胞増殖アッセイを使用した組換えIL-2と比較した、2t2におけるIL-2活性を示す。

10

【図146】CTL-2細胞増殖アッセイを使用した組換えIL-2と比較した、2t2におけるIL-2活性を示す。

【図147】標準固形食または高脂肪食を与え、かつPBS対照（未処理）または2t2で処理したApoE^{-/-}マウスにおける空腹時血糖値を示す。

【図148】標準固形食または高脂肪食を与え、かつPBS対照（未処理）または2t2で処理したApoE^{-/-}マウスからの血中リンパ球におけるCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T制御性細胞の比を示す。

【図149】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後の2t2タンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。

20

【図150】2t2の分析的SECプロファイルを示す。

【図151】図151Aおよび151Bは、脱グリコシル化前後の2t2の還元SDS-PAGE分析を示す。図151Aは、脱グリコシル化前の2t2の還元SDS-PAGE分析を示す。図151Bは、脱グリコシル化後の2t2の還元SDS-PAGE分析を示す。

【図152】図152Aおよび152Bは、2t2を使用したC57BL/6マウスの免疫刺激の結果を示す。図152Aは、2t2で処理した後の脾臓重量を示す。図152Bは、2t2で処理した後の免疫細胞型のパーセンテージを示す。

【図153】2t2で処理したマウスにおけるCD4⁺T細胞のCD25発現のアップレギュレーションを示す。

30

【図154】C57BL/6マウスにおける2t2の薬物動態を示す。

【図155】図155Aおよび155Bは、ApoE^{-/-}マウスにおける高脂肪誘発性アテローム性動脈硬化症プラークの形成を弱める2t2の効果を示す。図155Aは、標準固形食または高脂肪食を与え、かつPBS対照または2t2のいずれかで処理したApoE^{-/-}マウスからのアテローム性動脈硬化症のプラークの代表的な図を示す。図155Bは、各群のアテローム性動脈硬化症のプラークの定量分析の結果を示す。

【図156】対照処理マウスと比較した、2t2処理マウスにおける空腹時血糖値を示す。

【図157】2t2で処理したマウスおよび対照で処理したマウスからの血中リンパ球におけるCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Tregsのパーセンテージを示す。

【図158】例示的な15t15一本鎖キメラポリペプチドの概略図である。

40

【図159】32Dβ細胞増殖アッセイにおいて、組換えIL-15と比較した15t15のIL-15活性を示す。

【図160】抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後の15t15タンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。

【図161】図161Aおよび161Bは、脱グリコシル化前後の15t15の還元SDS-PAGE分析を示す。図161Aは、脱グリコシル化前の15t15の還元SDS-PAGE分析を示す。図161Bは、脱グリコシル化後の15t15の還元SDS-PAGE分析を示す。

【図162】図162Aおよび162Bは、18t15-12s、18t15-12s16、および7t15-21s + 抗TF抗体で刺激した後のNK細胞の表面表現型の変化

50

を示す一連のヒストグラム（図162A）および一連のグラフ（図162B）である。

【図163】18t15-12s、18t15-12s16、および7t15-21sで刺激した後のリンパ球集団の表面表現型の変化を示す一連のグラフである。

【図164】18t15-12sで処理した後のNK細胞の解糖の増加を示す一連のグラフである。

【図165】18t15-12sで刺激した後のNK細胞におけるホスホ-STAT4およびホスホ-STAT5レベルの増加を示す一連のグラフである。

【図166】18t15-12sによるNK細胞の一晩刺激が細胞代謝を増強することを示す一連のグラフである。

【図167】図167A～Cは、2t2で処理した後のC57BL/6マウスにおける免疫刺激を示す一連のグラフである。

【図168】図168A～Bは、TGFRt15-TGFRsで処理した後のC57BL/6マウスにおける免疫刺激を示す一連のグラフである。

【図169】図169A～Cは、西洋食を与え、かつTGFRt15-TGFRsまたは2t2で処理したApoE^{-/-}マウスにおけるTreg細胞、NK細胞、およびCD8⁺T細胞のインビボ刺激を示す一連のグラフである。

【図170】図170A～Bは、C57BL/6マウスにおける2t2による脾細胞増殖の誘導を示す一連のグラフである。

【図171】図171A～Cは、TGFRt15-TGFRsで処理した後のC57BL/6マウスにおける免疫刺激を示す一連のグラフである。

【図172】図172A～B西洋食を与え、かつTGFRt15-TGFRsまたは2t2で処理したApoE^{-/-}マウスにおけるNK細胞およびCD8⁺T細胞の増殖のインビボでの誘導を示す一連のグラフである。

【図173】7t15-21、TGFRt15-TGFRs、または2t2で処理した後のNSGマウスにおける7t15-21sおよび抗TF抗体増殖NK細胞の持続性を示す概略図および一連のグラフである。

【図174】図174A～Bは、NK細胞をTGFRt15-TGFRsで処理した後のNK細胞の細胞傷害性の増強を示す一連のグラフである。

【図175】図175A～Bは、NK細胞をTGFRt15-TGFRsで処理した後のNK細胞のADCC活性の増強を示す一連のグラフである。

【図176】TGFRt15-TGFRs/2t2活性化マウスNK細胞による老化B16F10黒色腫細胞のインビトロ死滅のグラフである。

【図177】図177A～Hは、黒色腫マウスモデルにおける化学療法と組み合わせたTGFRt15-TGFRs+抗TRP1抗体（TA99）の抗腫瘍活性を示す一連のグラフである。

【図178】図178A～Cは、2t2によるApoE^{-/-}マウスにおける西洋食誘発性高血糖の改善を示す一連のグラフである。

【図179】18t15-12sで刺激してrhIL15中で培養した後のNK細胞のサイトカイン誘導性メモリー様NK細胞（CIML-NK細胞）への分化を要約した細胞表面染色を示す一連のグラフである。

【図180】CD44メモリーT細胞のアップレギュレーションを示す。上のパネルは、TGFRt15-TGFRsでの処理時のCD44メモリーT細胞のアップレギュレーションを示す。下のパネルは、2t2での処理時のCD44メモリーT細胞のアップレギュレーションを示す。

【図181】図181Aおよび181Bは、2t2またはIL-2で処理したマウスにおける脱毛後の発毛の改善を示す。図181Aは、PBS、2t2、またはIL-2で処理したマウスの脱毛から10日後の皮膚の色素沈着を示す。図181Bは、ImageJソフトウェアを使用して分析した、PBS、2t2、またはIL-2で処理したマウスの色素沈着率を示す。

【図182】PBS、2t2、IL-2で処理したマウスの脱毛から14日後の皮膚の色

10

20

30

40

50

素沈着を示す。

【図183】一本鎖または多鎖キメラポリペプチドでの処理後の第X因子(FX)活性化のグラフを示す。

【図184】プロトロンビン時間(PT)試験における様々な濃度のInnovinを有する緩衝液の凝固時間を示す。

【図185】PTアッセイにおける多鎖キメラポリペプチドの凝固時間を示す。

【図186】32DB細胞と混合した場合のPTアッセイにおける多鎖キメラポリペプチドの凝固時間を示す。

【図187】ヒトPBMCと混合した場合のPTアッセイにおける多鎖キメラポリペプチドの凝固時間を示す。

【図188】7t15-21s137L(ロングバージョン)および7t15-21s137L(ショートバージョン)のCD137(4.1BB)への結合を示す。

【図189】図189A~189Dは、ELISAを使用した7t15-21s137L(ロングバージョン)中のIL7、IL21、IL15、および4.1BBLのそれぞれの抗体による検出を示す。

【図190】IL2R $\alpha\beta\gamma$ 含有CTL2細胞増殖アッセイによって評価された7t15-21s137L(ロングバージョン)および7t15-21s137L(ショートバージョン)のIL-15活性を示す。

【図191】図191A~191Cは、2T2またはIL2での処理に応答した、CD4⁺CD25^高Treg細胞、CD4⁺CD25⁻Tcon細胞、またはCD8⁺Tcon細胞におけるヒト血液リンパ球pSTAT5 α 応答を示す。図191Aは、CD4⁺CD25^高Treg細胞におけるpSTAT5 α 応答を示す。図191Bは、CD4⁺CD25^高Treg細胞におけるpSTAT5 α 応答を示す。図191Cは、CD8⁺Tcon細胞におけるpSTAT5 α 応答を示す。

【図192】図192A~192Eは、IL-2ベースの分子(2t2)による処理が、マウスモデルにおける脱毛後に毛包の形成を誘導し得ることを示す一連の画像である。図192Aは、毛を剃った後に脱毛を行った対照マウスーのみからの画像であり、図192Bは、脱毛の後に低用量のIL-2(1mg/kg)を投与したマウスからの画像であり、図192C~192Eは、脱毛の後に0.3mg/kg、(図192C)、1mg/kg(図192D)、および(図192E)3mg/kgの2t2の投与したマウスからの画像を示す。黒い矢印は、後で真皮に伸び、発毛を促進する、成長期の毛包を示す。

【図193】各処理群の10視野あたりにカウントされた成長期の毛包の総数を示す。

【図194】7t15-21s+抗組織因子(TF)抗体(IgG1)(50nM)で増殖させた後の2体の異なるドナーからのNK細胞におけるDNA脱メチル化が異なるパーセンテージ(非曝露NK細胞と比較して)を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0149】

詳細な説明

加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効数の1つ以上のナチュラルキラー(NK)細胞活性化物質の治療有効量および/または活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、当該対象に、治療有効数の1つ以上のNK細胞活性化物質の治療有効量および/または活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。皮膚および/または毛髪の質感および/または外観の改善を必要とする対象においてある期間にわたって皮膚および/または毛髪の質感および/または外観を改善する方法であって、当該対象に、治療有効数の1つ以上のナチュラルキラー(NK)細胞活性化物質の治療有効量および/または活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。肥満の治療の支援を必要とする対象においてある期

10

20

30

40

50

間にわたって肥満の治療を支援する方法であって、当該対象に、治療有効数の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質の治療有効量および／または活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0150】

活性化されたNK細胞

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態は、対象（例えば、本明細書に記載の例示的な対象のうちのいずれか）に、治療有効数の活性化されたNK細胞（例えば、ヒト活性化されたNK細胞）を投与することを含み得る。活性化されたNK細胞は、例えば、休止NK細胞（例えば、ヒト休止NK細胞）と比較して、CD25、CD69、MTORC1、SREBP1、IFN- γ 、およびグランザイム（例えば、グランザイムB）のうちの2つ以上（例えば、3つ、4つ、5つ、または6つ）の発現レベルの増加を示すNK細胞（例えば、ヒトNK細胞）である。例えば、活性化されたNK細胞は、例えば、休止NK細胞（例えば、ヒト活性化されたNK細胞）と比較して、CD25、CD69、MTORC1、SREBP1、IFN- γ 、およびグランザイム（例えば、グランザイムB）のうちの2つ以上（例えば、3つ、4つ、5つ、または6つ）の発現レベルにおいて、少なくとも10%の増加（例えば、少なくとも15%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも25%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも35%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも45%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも55%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも65%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも75%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも85%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも95%の増加、少なくとも100%の増加、少なくとも120%の増加、少なくとも140%の増加、少なくとも160%の増加、少なくとも180%の増加、少なくとも200%の増加、少なくとも220%の増加、少なくとも240%の増加、少なくとも260%の増加、少なくとも280%の増加、または少なくとも300%の増加）を有し得る（例えば、休止NK細胞（例えば、ヒト活性化されたNK細胞）と比較して）。

【0151】

いくつかの実施形態では、活性化されたNK細胞は、任意に、CD25、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、CD16、KIR2DS1、KIR2DS2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DS1、NKG2C、CCR7、CXCR3、L-セレクチン、CXCR1、CXCR2、CX3CR1、ChemR23、CXCR4、CCR5、S1P5、c-Kit、mTORC1のうちの2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29）の発現レベルにおいて、少なくとも10%の増加（例えば、少なくとも15%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも25%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも35%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも45%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも55%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも65%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも75%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも85%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも95%の増加、少なくとも100%の増加、少なくとも120%の増加、少なくとも140%の増加、少なくとも160%の増加、少なくとも180%の増加、少なくとも200%の増加、少なくとも220%の増加、少なくとも240%の増加、少なくとも260%の増加、少なくとも280%の増加、または少なくとも300%の増加）をさらに有し得る（例えば、休止NK細胞（例えば、ヒト活性化されたNK細胞）と比較して）。

【0152】

例えば、活性化されたNK細胞（例えば、ヒト活性化されたNK細胞）は、CD25、CD69、mTORC1、SREBP1、IFN- γ 、およびグランザイム（例えば、グランザイムB）のうちの2つ以上（例えば、3つ、4つ、5つ、または6つ）の発現レベ

50

～約300%の増加、約140%の増加～約280%の増加、約140%の増加～約260%の増加、約140%の増加～約240%の増加、約140%の増加～約220%の増加、約140%の増加～約200%の増加、約140%の増加～約180%の増加、約140%の増加～約160%の増加、160%の増加～約500%の増加、約160%の増加～約450%の増加、約160%の増加～約400%の増加、約160%の増加～約350%の増加、約160%の増加～約300%の増加、約160%の増加～約280%の増加、約160%の増加～約260%の増加、約160%の増加～約240%の増加、約160%の増加～約220%の増加、約160%の増加～約200%の増加、約160%の増加～約180%の増加、180%の増加～約500%の増加、約180%の増加～約450%の増加、約180%の増加～約400%の増加、約180%の増加～約350%の増加、約180%の増加～約300%の増加、約180%の増加～約280%の増加、約180%の増加～約260%の増加、約180%の増加～約240%の増加、約180%の増加～約220%の増加、約180%の増加～約200%の増加、200%の増加～約500%の増加、約200%の増加～約450%の増加、約200%の増加～約400%の増加、約200%の増加～約350%の増加、約200%の増加～約300%の増加、約200%の増加～約280%の増加、約200%の増加～約260%の増加、約200%の増加～約240%の増加、約200%の増加～約220%の増加、220%の増加～約500%の増加、約220%の増加～約450%の増加、約220%の増加～約400%の増加、約220%の増加～約350%の増加、約220%の増加～約300%の増加、約220%の増加～約280%の増加、約220%の増加～約260%の増加、約220%の増加～約240%の増加、240%の増加～約500%の増加、約240%の増加～約450%の増加、約240%の増加～約400%の増加、約240%の増加～約350%の増加、約240%の増加～約300%の増加、約240%の増加～約280%の増加、約240%の増加～約260%の増加、260%の増加～約500%の増加、約260%の増加～約450%の増加、約260%の増加～約400%の増加、約260%の増加～約350%の増加、約260%の増加～約300%の増加、約260%の増加～約280%の増加、280%の増加～約500%の増加、約280%の増加～約450%の増加、約280%の増加～約400%の増加、約280%の増加～約350%の増加、約280%の増加～約300%の増加、300%の増加～約500%の増加、約300%の増加～約450%の増加、約300%の増加～約400%の増加、約300%の増加～約350%の増加、350%の増加～約500%の増加、約350%の増加～約450%の増加、約350%の増加～約400%の増加、400%の増加～約500%の増加、約400%の増加～約450%の増加、または400%の増加～約500%の増加を有し得る（例えば、休止NK細胞（例えば、ヒト休止NK細胞）と比較して）。

【0153】

いくつかの実施形態では、活性化されたNK細胞は、CD25、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、CD16、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DS1、NKG2C、CCR7、CXCR3、L-セレクチン、CXCR1、CXCR2、CX3CR1、ChemR23、CXCR4、CCR5、S1P5、c-Kit、mTORC1のうちの2つ以上（例えば、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29）の発現レベルにおいて、約10%の増加～約500%の増加（例えば、または本明細書に記載のこの範囲の部分的範囲のうちのいずれか）をさらに有し得る（例えば、休止NK細胞（例えば、ヒト活性化されたNK細胞）と比較して）。

【0154】

CD25、CD69、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、CD16、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DS1、NK

10

20

30

40

50

G2C、CCR7、CXCR3、L-セレクチン、CXCR1、CXCR2、CX3CR1、ChemR23、CXCR4、CCR5、S1P5、c-Kit、mTORC1、SREBP1、IFN- γ 、およびグランザイム（例えば、グランザイムB）の発現レベルを決定するために使用することができるアッセイの非限定的な例には、例えば、免疫ロット法、蛍光支援細胞選別、酵素結合免疫吸着測定法、およびRT-PCRが含まれる。
【0155】

CD25の発現レベルを決定するために使用することができる市販のELISAアッセイの非限定的な例は、Diacclone、Covallab Biotechnology、およびCaltag Medsystemsから入手可能である。成熟ヒトCD25のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

10

成熟ヒトCD25タンパク質（配列番号1）

```
elcdddppe iphatfkama ykegtmlnce ckrgrfrriks gslymlctgn sshsswdnqc  
qctssatrnt tkqvtpqpee qkerkttemq spmqpvdqas lpghcreppp weneateriy  
hfvvgqmvyv qcvqgyralh rgpaesvckm thgktrwtqp qlictgemet sqfpgeekpq  
aspegrpese tsclvttttdf qiqtemaatm etsiftteyq vavagcvfl1 isvlllsglt  
wqrrqrksrr ti
```

ヒトCD25 cDNA（配列番号2）

```
gagctctg tgacgatgac ccgccagaga tcccacacgc cacattcaaa gccatggcct  
acaaggaagg aaccatgttg aactgtgaat gcaagagagg tttccgcaga ataaaaagcg  
ggtcactcta tatgctctgt acaggaaact ctagccactc gtcctgggac aaccaatgtc  
aatgcacaag ctctgccact cggaacacaa cgaaacaagt gacacctcaa cctgaagaac  
agaaagaaag gaaaaccaca gaaatgcaaa gtccaatgca gccagtggac caagcgagcc  
ttccaggtca ctgcagggaa cctccaccat gggaaaatga agccacagag agaatttatc  
atttcgtggg ggggcagatg gtttattatc agtgcggtcca gggatacagg gctctacaca  
gaggtcctgc tgagagcgtc tgcaaaatga cccacgggaa gacaaggtgg acccagcccc  
agctcatatg cacaggtgaa atggagacca gtcagtttcc aggtgaagag aagcctcagg  
caagccccga aggccgtcct gagagtgaga cttcctgcct cgtcacaaca acagattttc  
aaatacagac agaaatggct gcaaccatgg agacgtccat atttacaaca gagtaccagg  
tagcagtggc cggctgtgtt ttctctgtga tcagcgctcct cctcctgagt gggctcacct  
ggcagcggag acagaggaag agtagaagaa caatc
```

20

30

【0156】

CD69の発現レベルを決定するために使用することができる市販のELISAアッセイの非限定的な例は、RayBiotech、Novus Biologicals、およびAviscera Bioscienceから入手可能である。成熟ヒトCD69のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCD69タンパク質（配列番号3）

```
mssencfvae nsslhpesgq endatsphfs trhegsfqvp vlcavmnavf itiliialia  
lsvgqyncpg qytfsmppsds hvsscsedwv gyqrkcyfis tvkrswtsaq nacsehgatl  
avidsekdmn flkryagree hwvglkkeepg hpwkwsngke fnnwfnvtgs dkcvcflnte  
vssmecekn1 ywicnkpky
```

40

ヒトCD69 cDNA（配列番号4）

50

```

atgagctctg aaaattgttt cgtagcagag aacagctctt tgcattccgga gaggggacaa
gaaaatgatg ccaccagtcc ccattttctca acacgtcatg aagggtcctt ccaagttcct
gtcctgtgtg ctgtaatgaa tgtgggtcttc atcaccattt taatcatagc tctcattgcc
ttatcagtgg gccaatacaa ttgtccaggc caatacacat tctcaatgcc atcagacagc
catgtttctt catgctctga ggactgggtt ggctaccaga ggaaatgcta ctttatttct
actgtgaaga ggagctggac ttcagcccaa aatgcttggt ctgaacatgg tgctactctt
gctgtcattg attctgaaaa ggacatgaac tttctaaaac gatacgcagg tagagaggaa
cactgggttg gactgaaaaa ggaacctggt caccatgga agtgggtcaa tggcaaagaa
tttaacaact ggttcaacgt tacagggtct gacaagtgtg tttttctgaa aaacacagag
gtcagcagca tggaatgtga gaagaattta tactggatat gtaacaaacc ttacaaataa

```

10

【0157】

成熟ヒトCD59のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCD59タンパク質（配列番号5）

```

lqcyncpnptadckt avncssdfda clitkagllqv ynkckwfehc nfndvttrlr
eneltyyck kdlcnfneql en

```

ヒトCD59 cDNA（配列番号6）

```

atgggaatcc aaggagggtc tgtcctgttc gggctgctgc tcgtcctggc tgtcttctgc
cattcagggtc atagcctgca gtgctacaac tgtcctaacc caactgctga ctgcaaaaca
gccgtcaatt gttcatctga ttttgatgcy tgtctcatta ccaaagctgg gttacaagtg
tataacaagt gttggaagtt tgagcattgc aatttcaacg acgtcacaac ccgcttgagg
gaaaatgagc taacgtacta ctgctgcaag aaggacctgt gtaactttta cgaacagctt
gaaaatgggt ggacatcctt atcagagaaa acagttcttc tgctgggtgac tccatttctg
gcagcagcct ggagccttca tccctaa

```

20

【0158】

成熟ヒトCD352のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCD352タンパク質（配列番号7）

```

qssltplmv ngilgesvtl plefpagekv nfitwlfnct slafivphet kspeihvtnp
kqgkrlnftq syslqlslnk medtgsyra q istktsakls sytlrlrlql rniqvtnhsq
lfqnmtcelh ltcsvedadd nvsfrwealg ntlssqpnlt vswdprisse qdytciaena
vsnlsfsvsa qklcedvkiq ytdtkmilfm vsgicivfgf iillllvlrk rrdsllslstq
rtqgpaesar nleyvsvspt nntvyasvth snreteiwt p rendtitiys tinhskeskp
tfsrataldn vv

```

30

ヒトCD352 cDNA（配列番号8）

```

atgttggtggc tgttccaatc gtcctctgtt gtccttctgct ttggcccagg gaatgtagtt
tcacaaagca gcttaacccc attgatgggtg aacgggattc tgggggagtc agtaactctt
cccctggagt ttctctgcagg agagaagggtc aacttcatca cttggctttt caatgaaaca
tctcttgctt tcatagtacc ccatgaaacc aaaagtccag aaatccacgt gactaatccg
aaacagggaag agcgactgaa cttcaccagc tcctactccc tgcaactcag caacctgaag
atggaagaca caggctctta cagagcccag atatccacaa agacctctgc aaagctgtcc
agttacactc tgaggatatt aagacaactg aggaacatac aagttaccaa tcacagtcag
ctatttcaga atatgacctg tgagctccat ctgacttgct ctgtggagga tgcagatgac
aatgtctcat tcagatggga ggcccttgga aacacacttt caagtcagcc aaacctcact
gtctcctggg accccaggat ttccagtga caggactaca cctgcatagc agagaatgct
gtcagtaatt tatccttctc tgtctctgcc cagaagcttt gcgaagatgt taaaattcaa
tatacagata ccaaaatgat tctgtttatg gtttctggga tatgcatagt cttcggtttc
atcatactgc tgttactttg tttgaggaaa agaagagatt ccctatcttt gtctactcag
cgaacacagg gccccgagtc cgcaaggaac ctagagtatg tttcagtgtc tccaacgaac
aacactgtgt atgcttcagt cactcattca aacagggaag cagaaatctg gacacctaga
gaaaatgata ctatcacaat ttactccaca attaatcatt ccaaagagag taaacctcact
ttttccaggg caactgcctt tgacaatgtc gtgttaa

```

40

50

【0159】

成熟ヒトNKp80のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトNKp80タンパク質（配列番号9）

mqdeerymtl nvqskkrssa qtsqltfkdy svtlhwykil lgisgtvngi ltltlislil
lvsqgvllkc qkgscsnatq yedtgdlkvn ngtrrnisnk dlcasrsadq tvlcqsewlk
yqgkcywfsn emkswsdsyv yclerkshll iihdqlemaf iqknlrqlny vwiglnftsl
kmtwtwvdgs pidskiffik gpakenscaa ikeskifset cssvfkwicq y

ヒトNKp80 cDNA（配列番号：10）

atgcaagatg aagaaagata catgacattg aatgtacagt caaagaaaag gagttctgcc
caaacatctc aacttacatt taaagattat tcagtgcagt tgcactggta taaaatctta
ctgggaatat ctggaaccgt gaatggtatt ctactttga ctttgatctc cttgatcctg
ttggtactat gccaatcaga atggctcaaa taccaaggga agtggtattg gttctcta
gagatgaaaa gctggagtga cagttatgtg tattgtttgg aaagaaaatc tcatctacta
atcatacatg accaacttga aatggcctttt atacagaaaa acctaagaca attaaactac
gtatggattg ggcttaactt tacctccttg aaaatgacat ggacttgggt ggatggttct
ccaatagatt caaagatatt cttcataaag ggaccagcta aagaaaacag ctgtgctgcc
attaaggaaa gcaaaatttt ctctgaaacc tgcagcagtg ttttcaaag gatttgtcag
tattag

10

【0160】

成熟ヒトDNAM-1のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトDNAM-1タンパク質（配列番号11）

ee vlwhtsvpfa enmslecvyp smgiltqvew fkigtqqdsi aifspthgmw
irkpyaervy flnstmasnn mtlffrnase ddvggyyscsl ytypqgtwqk viqvvsdsf
eaavpsnshi vsepqknvlt tcqpqmtwpv qavrwekiqp rqidlltycn lvhgrnftsk
fprqivsnscs hgrwsvivip dvtvsdsgly rcylqasage netfvmrltv aegktdnqyt
lfvaggtvll llfvisitti iviflnrrrr rerrdlftes wdtqkapnny rspistsqpt
nqsmddtred iyvnyptfsr rpktrv

20

ヒトDNAM-1 cDNA（配列番号12）

atggattatc ctactttact tttggtctctt cttcatgtat acagagctct atgtgaagag
gtgctttggc atacatcagt tccctttgcc gagaacatgt ctctagaatg tgtgtatcca
tcaatgggca tcttaacaca ggtggagtgg ttcaagatcg ggaccagca ggattccata
gccattttca gccctactca tggcatgggc ataaggaagc cctatgctga gaggggttac
tttttgaatt caacgatggc ttccaataac atgactcttt tctttcggaa tgcctctgaa
gatgatgttg gctactattc ctgctctctt tacacttacc cacagggaac ttggcagaag
gtgatacagg tggttcagtc agatagtttt gaggcagctg tgccatcaaa tagccacatt
gtttcggaaac ctggaaagaa tgtcacactc acttgtcagc ctcatgtac gtggcctgtg
caggcagtga ggtgggaaaa gatccagccc cgtcagatcg acctcttaac ttactgcaac
ttggtccatg gcagaaattt cacctccaag ttcccaagac aaatagttag caactgcagc
cacggaaggt ggagcgtcat cgtcatcccc gatgtcacag tctcagactc ggggctttac
cgctgctact tgcaggccag cgcaggagaa aacgaaacct tcgtgatgag attgactgta
gccgagggtta aaaccgataa ccaatataacc ctctttgttg ctggagggac agttttattg
ttgttgtttg ttatctcaat taccaccatc attgtcattt tccttaacag aaggagaagg
agagagagaa gagatctatt tacagagtcc tgggatacac agaaggcacc caataactat
agaagtccca tctctaccag tcaacctacc aatcaatcca tggatgatac aagagaggat
atttatgtca actatccaac cttctctcgc agaccaaaga ctagagttta a

30

40

【0161】

成熟ヒト2B4のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒト2B4タンパク質（配列番号13）

50

gk gcqgsadhvv sisgvplqlq pnsiqtkvds iawkkllpsq ngfhhilkwe
 ngsplsntsn drfsfivknl sllikaacaq dsglyclevt sisgkvqtat fqvfvdvke
 kprlqgggki ldrgrcqval sclvsrdgnv syawyrskl iqtagnltyl deevdingth
 tytcnvsnpv sweshtlnlt qdcqnahqef rfwplviiv ilsalfgtl acfcvrrkr
 kekqsetspk efltiyedvk dlktrrnheq eqtfpggst iysmiqsqss aptsqepayt
 lysliqpsrk sgsrkrnhsp sfnstiyevi gksqpkaqp arlsrkelen fdvys

ヒト 2 B 4 c D N A (配列番号 1 4)

atgctggggc aagtggtcac cctcatactc ctctgtctcc tcaaggtgta tcagggcaaa
 ggatgccagg gatcagctga ccatgtggtt agcatctcgg gagtgcctct tcagttacaa
 ccaaacagca tacagacgaa ggttgacagc attgcatgga agaagttgct gccctcacia
 aatggatttc atcacatatt gaagtgaggag aatggctctt tgctttccaa tactttcaat
 gatagattca gttttatagt caagaacttg agtcttctca tcaaggcagc tcagcagcag
 gacagtggcc tctactgcct ggaggtcacc agtatatctg gaaaagttca gacagccacg
 ttccagggtt ttgtatttga taaagttgag aaacccccgc tacaggggca ggggaagatc
 ctggacagag ggagatgcca agtggctctg tcttgcttgg tctccaggga tggcaatgtg
 tcctatgctt ggtacagagg gagcaagctg atccagacag cagggaacct cacctacctg
 gacgaggagg ttgacattaa tggcactcac acatatacct gcaatgtcag caatcctgtt
 agctgggaaa gccacacctt gaatctcact caggactgtc agaatgcca tcaggaattc
 agattttggc cgttttttgt gatcatcgtg attctaagcg cactgttctt tggcaccctt
 gcctgcttct gtgtgtggag gagaaagagg aaggagaagc agtcagagac cagtcccaag
 gaatttttga caatttacga agatgtcaag gatctgaaaa ccaggagaaa tcacgagcag
 gagcagactt ttcctggagg ggggagcacc atctactcta tgatccagtc ccagtcttct
 gctcccacgt cacaagaacc tgcataatac ttatattcat taattcagcc ttccaggaag
 tctggatcca ggaagaggaa ccacagccct tccttcaata gcactatcta tgaagtgatt
 ggaaagagtc aacctaagc ccagaacctt gctcgattga gccgcaaaga gctggagaac
 tttgatgttt attcctag

10

20

【 0 1 6 2 】

成熟ヒト NK p 3 0 のタンパク質および c D N A 配列を、以下に示す。

成熟ヒト NK p 3 0 タンパク質 (配列番号 1 5)

lw vsqppeirtl egssaflpcs fnasqgrlai gsvtwfrdev vpgkevrngt
 pefrgrlapl assrflhdhq aelhirdvrg hdasiyvcrv evlglvgvtg ngtrlvveke
 hpqlgagtv1 llragfyavs flsvavgstv yyqgkcltwk gprrrlpavv paplpppcgs
 sahlppvpvg g

30

ヒト NK p 3 0 c D N A (配列番号 1 6)

atggcctgga tgctgttgct catcttgatc atgggtccatc caggatcctg tgctctctgg
 gtgtcccagc cccctgagat tcgtaccctg gaaggatcct ctgccttctt gccctgctcc
 ttcaatgcca gccaaaggag actggccatt ggctccgtca cgtggttccg agatgaggtg
 gttccaggga aggaggtgag gaatggaacc ccagagttca ggggccgcct ggccccactt
 gcttcttccc gtttcttcca tgaccaccag gctgagctgc acatccggga cgtgcgaggc
 catgacgcca gcacttacgt gtgcagagtg gaggtgctgg gccttggtgt cgggacaggg
 aatgggactc ggctggtggt ggagaaagaa catcctcagc taggggctgg tacagtcttc
 ctcttctggg ctggattcta tgctgtcagc tttctctctg tggccgtggg cagcaccgtc
 tattaccagg gcaaatgcca ctgtcacatg ggaacacact gccactcttc agatgggccc
 cgaggagtga ttccagagcc cagatgtccc tag

40

【 0 1 6 3 】

成熟ヒト NK p 4 4 のタンパク質および c D N A 配列を、以下に示す。

成熟ヒト NK p 4 4 タンパク質 (配列番号 1 7)

50

qskaqvlqs vagqtltvrc qypptgslye kkgwckeasa lvcirlvtss kprtmawtsr
ftiwdpdag fftvtmtdlr eedsghywr iyrpsdsvs ksvrfylvvs pasastqtsw
tprdlvssqt qtqscvppta garqapesps tipvpsqpqn stlrpgpaap ialvpvfcgl
lvakslvlssa llvwgdiww ktmmlrsls tqkatchlqg vtdlpwtsvs spvereilyh
tvartkisdd ddehtl

ヒトNKp44 cDNA (配列番号18)

atggcctggc gagccctaca cccactgcta ctgctgctgc tgctgttccc aggctctcag
gcacaatcca aggctcaggt acttcaaagt gtggcagggc agacgctaac cgtgagatgc
cagtaccgcg ccacgggcag tctctacgag aagaaaggct ggtgtaagga ggcttcagca
cttgtgtgca tcaggtagt caccagctcc aagcccagga cgatggcttg gacctctcga
ttcacaatct gggacgacct tgatgctggc ttcttctactg tcaccatgac tgatctgaga
gaggaagact caggacatta ctggtgtaga atctaccgcc cttctgacaa ctctgtctct
aagtccgtca gattctatct ggtggtatct ccagcctctg cctccacaca gacctcctgg
actccccgag acctggtctc ttcacagacc cagaccagga gctgtgtgcc tccactgca
ggagccagac aagcccctga gtctccatct accatccctg tcccttcaca gccacagaac
tccacgctcc gccctggccc tgcagccccc attgccctgg tgcctgtgtt ctgtggactc
ctcgtagcca agagcctggt gctgtcagcc ctgctcgtct ggtgggtttt aaggaatcgg
cacatgcagc atcaaggag gtctctgctg caccagctc agcccaggcc ccaggcccat
agacacttcc cactgagcca cagggcacca ggggggacat atggtggaac accatga

10

20

【0164】

成熟ヒトNKp46のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトNKp46タンパク質 (配列番号19)

qqqtlpkpf iwaephfmvp kekqvcticq gnygaveyql hfegslfavd rpkpperink
vqfyipdmns rmagqysciy rvgelwseps nllldlvtem ydtpslsvhp gpevisgekv
tfycrldtat smflllkegr sshvqrgygk vqaefplgpv ttahrgtyrc fgsynnhaws
fpsepvkllv tgdientsla pedptfpadt wgtyllttet glqkdhalwd htaqnllrmg
lafllvlvalv wflvedwlsr krtrerasra stwegrrrln tqtl

ヒトNKp46 cDNA (配列番号20)

atggcctggc gagccctaca cccactgcta ctgctgctgc tgctgttccc aggctctcag
gcacaatcca aggctcaggt acttcaaagt gtggcagggc agacgctaac cgtgagatgc
cagtaccgcg ccacgggcag tctctacgag aagaaaggct ggtgtaagga ggcttcagca
cttgtgtgca tcaggtagt caccagctcc aagcccagga cgatggcttg gacctctcga
ttcacaatct gggacgacct tgatgctggc ttcttctactg tcaccatgac tgatctgaga
gaggaagact caggacatta ctggtgtaga atctaccgcc cttctgacaa ctctgtctct
aagtccgtca gattctatct ggtggtatct ccagcctctg cctccacaca gacctcctgg
actccccgag acctggtctc ttcacagacc cagaccagga gctgtgtgcc tccactgca
ggagccagac aagcccctga gtctccatct accatccctg tcccttcaca gccacagaac
tccacgctcc gccctggccc tgcagccccc attgccctgg tgcctgtgtt ctgtggactc
ctcgtagcca agagcctggt gctgtcagcc ctgctcgtct ggtgggtttt aaggaatcgg
cacatgcagc atcaaggag gtctctgctg caccagctc agcccaggcc ccaggcccat
agacacttcc cactgagcca cagggcacca ggggggacat atggtggaac accatga

30

40

【0165】

成熟ヒトNKG2Dのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトNKG2Dタンパク質 (配列番号21)

mgwirgrsr hswemsefhn ynldlkksdf strwqkqrcp vvkskcrena spfffcfia
vamgirfiim vaiwsavfln slfnqevqip ltesycgpcp knwicyknc yqffdesknw
yesqascmsq nasllkvysk edqdllklvk syhwmglvhi ptngswqwed gsilspnllt
iiemqkgdca lyassfkgyi encstpnityi cmqrvtv

50

ヒトNKG2D cDNA (配列番号22)

atggggtgga ttcgtggtcg gaggtctcga cacagctggg agatgagtga atttcataat
 tataacttgg atctgaagaa gagtgatttt tcaacacgat ggcaaaagca aagatgtcca
 gtagtcaaaa gcaaatgtag agaaaatgca tctccatttt ttttctgctg cttcatcgct
 gtagccatgg gaatccgttt cattattatg gtaacaatat ggagtgtgtg attcctaacc
 tcattattca accaagaagt tcaaatccccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct
 aaaaactgga tatgtttacaa aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg
 tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa
 gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt
 ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctcacccaa cctactaaca
 ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgcct cgagctttaa aggctatata
 gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcattgcaa ggactgtgta a

10

【0166】

成熟ヒトCD16aのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCD16aタンパク質 (配列番号23)

maegtllwqil cvssdaqpqt fegvkgadpp tlppgsflpg pvlwvgsllar lqteksdevs
 rkgnwvtem gggagerlft ssclvglvpl glrslvtcp lqcgimwql lptallllvs
 agmrtdlpk avvflepqwy rvlekdsvtl kcggaysped nstqwfhn lissqassyf
 idaatvddsg eyrcqtnlst lsdpvqlevh igwlllqapr wvfkeedpih lrchswknta
 lhkvtylqng kgrkyfhhns dfyipkatlk dsqsyfcrgl fgsknvsset vnititqgla
 vstissffpp gyqvsfclvm vllfavdtgl yfsvktnirs strdwkdhkf kwrkdpqdk

20

ヒトCD16a cDNA (配列番号24)

atggctgagggcacactctggcagattctgtgtgtgtcctcagatgctca
 gccacagacctttgagggagtaaagggggcagaccacccaccttgccctc
 caggctctttccttctctggctcctgttctatggtggggctcccttgccaga
 cttcagactgagaagtcagatgaagtttcaagaaaaggaaattggtgggt
 gacagagatgggtggaggggctggggaaaggctgtttacttctcctgtc
 tagtcggttttggtcccttttagggctccggatatctttggtgacttgtcca
 ctccagtgtggcatcatgtggcagctgctcctcccaactgctctgctact
 tctagtttcagctggcatgcggactgaagatctcccaaaggctgtggtgt
 tcttgagacctcaatgggtacaggggtgctcgagaaggacagtgtgactctg
 aagtgccaggagcctactcccctgaggacaattccacacagtggtttca
 caatgagagcctcatctcaagccaggcctcgagctacttcattgacgctg
 ccacagtcgacgacagtggagagtagcaggtgccagacaaacctctccacc
 ctgagtgacctgggtgcagctagaagtccatatcggtggtgtgtgtcca
 ggccccctcggtgggtgttcaaggaggaagaccctattcacctgaggtgtc
 acagctggaagaactgctctgcataaggtcacatatattacagaatggc
 aaaggcaggaagtattttcatcataattctgacttctacattccaaaagc
 cacactcaaagacagcggctcctacttctgcagggggctttttgggagta
 aaaatgtgtcttcagagactgtgaacatcaccatcactcaagggtttggca
 gtgtcaaccatctcatcattctttccacctgggtaccaagtctctttctg
 ctgtgtgatgggtactcctttttgcagtggtgacacaggactatatttctctg
 tgaagacaaacattcgaagctcaacaagagactggaaggaccataaattt
 aatggagaaaggacctcaagacaaatga

30

40

【0167】

成熟ヒトCD16bのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCD16bタンパク質 (配列番号25)

mwqlllptal lllvsagmrt edlpkavvfl epqwysvlek dsvtlkcqga yspednstqw
 fhneslissq assyfidat vndsgeyrcq tnstlsdpv qlevhigwll lqaprwwfke
 edpihlrchs wkntalhkvt ylnqgkdrky fhhnsdfhip katlkdsqsy fcrglvgskn
 vssetvniti tqglavstis sfsppgyqvs fclvmvllfa vdtglyfsvk tni

50

ヒトCD16b cDNA (配列番号26)

atgtggcagctgctcctcccaactgctctgctacttctagtttcagctgg
 catgcggaactgaagatctcccaaaggctgtggtgttcctggagcctcaat
 ggtacagcgtgcttgagaaggacagtgtgactctgaagtgccagggagcc
 tactccctgaggacaattccacacagtggtttcacaatgagaacctcat
 ctcaagccaggcctcgagctacttcattgacgctgccacagtcaacgaca
 gtggagagtacaggtgccagacaaacctctccaccctcagtgacccggtg
 cagctagaagtccatatcggtgtggtgttgcctcaggccccctcggtgggt
 gttcaaggaggaagacctattcacctgaggtgtcacagctggaagaaca
 ctgctctgcataagggtcacatatattacagaatggcaaagacaggaagtat
 ttcatcataaattctgacttccacattccaaaagccacactcaaagatag
 cggctcctacttctgcagggggcttgttgggagtaaaaatgtgtcttcag
 agactgtgaacatcaccatcactcaagggttggtcagtgtaaccatctca
 tcattctctccacctgggtaccaagtctcttctgcttggtgatgggtact
 cctttttgcagtggaacaggaactatatttctctgtgaagacaaacattt
 ga

10

【0168】

成熟ヒトKIR2DS1のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

ヒトKIR2DS1タンパク質 (配列番号27)

msltvvsmae vgfllqgaw phegvhrkps llahpgrlvk seetvilqcw sdvmfehfl
 hregmfndtl rligehhdgv skanfsism kqdlagtyrc ygsvthspyq vsapsdpldi
 viiglyekps lsagpgptvl agesvtlscs srssydmhyl sregeaherr lpagtkvngt
 fqanfplgpa thggtyrcfg sfrdspyews kssdpllvsv tgnpsnswps ptepssetgn
 prhlhvligt svvkipftil lffllhrwcs dknaavmdq epagnrtvns edsdeqdhqe
 vsya

20

ヒトKIR2DS1 cDNA (配列番号28)

atgtcgctcacggctcgtcagcatggcgtgtgttgggttcttcttgcctgca
 gggggcctggccacatgaggagtcacagaaaaccttccctcctggccc
 acccaggtcgctgtgaaatcagaagagacagtcactcctgcaatgttgg
 tcagatgtcatgtttgaacacttcttctgcacagagaggggatgtttaa
 cgacactttgcgctcattggagaacaccatgatgggggtctccaaggcca
 acttctccatcagtcgcatgaagcaagacctggcagggacctacagatgc
 tacgggttctgttactcactccccctatcagttgtcagctcccagtgacc
 tctggacatcgatcataggtctatatgagaaaccttctctctcagccc
 agccggggccccacggttctggcaggagagaatgtgacctgtcctgcagc
 tcccggagctcctatgacatgtaccatctatccaggggaagggaggccca
 tgaacgtaggctccttgcagggaaccaaggtcaacggaacattccaggcca
 actttcctctggggcctgccacccatggagggacctacagatgcttcggc
 tctttccgtgactctccatacagatgggtcaaagtcaagtgaacctgct
 tgtttctgtcacaggaaaccttcaaatagttggccttcacccactgaac
 caagctccgaaaccggttaacccagacacctacatgttctgattgggacc
 tcagtggtcaaaaatccctttcaccatcctcctcttcttctccttcacg
 ctggtgctccgacaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcag
 ggaacagaacagtgaacagcgaggattctgatgaacaagaccatcaggag
 gtgtcatacgcataa

30

40

【0169】

成熟ヒトKIR2DS2のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

ヒトKIR2DS2タンパク質 (配列番号29)

50

mslmvsvmc vgffllqgaw phégvhrkps lla hp gplvk seetvilqcw sdvrfehfl
hregkykdtl hligehhdgv skanfsigpm mqdlagtyrc ygsvthspyq lsapsdpldi
vitglyekps lsagpgptvl agesvtlscs srssydmuhl sregeaherr fsagpkvngt
fqadfp l gpa thggtyrcfg sfrdspyews nssdp llvsv tgnpsnswps ptepssktgn
prhlhvligt svvkipftil lffllhrwcs nkknaavmdq epagnrtvns edsdeqdhqe
vsya

ヒト K I R 2 D S 2 c D N A (配列番号 : 3 0)

atgtcgctcatggctcgtcagcatggcgtgtgttgggttcttcttgc
gggggcctggccacatgaggagtcacagaaaaccttccctcctggccc
accaggtcccctggtgaaatcagaagagacagtcacctgcaatgttg
tcagatgtcaggtttgagcacttcttctgcacagagaggggaagtataa
ggacactttgcacctcattggagagcaccatgatggggtctccaaggcca
acttctccatcggtcccacatgatgaagaccttgcagggacctacagatgc
tacggttctgttactcactccccctatcagttgtcagctcccagtgaccc
tctggacatcgtcacacaggtctatatgagaaaccttcttctcagccc
agccggggcccccacggttttggcaggagagagcgtgaccttgtcctgcagc
tcccggagctcctatgacatgtaccatctatccaggaggaggaggccca
tgaacgtaggttcttgcagggcccaagggtcaacggaacattccaggccg
actttcctctggggccctgccacccacggagggaacctacagatgcttcggc
tctttccgtgactctccctatgagtggtcaaactcgagtgacccactgct
tgtttctgtcacaggaaaccccttcaaatagttggccttcacccactgaac
caagctccaaaacccggttaaccccagacacctgcatgttctgattgggacc
tcagtggtcaaaaatccctttcaccatcctccttcttcttctccttcacg
ctggtgctccaacaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcag
ggaacagaacagtgaaacagcgaggactctgatgaacaagaccctcaggag
gtgacatacacacagttgaatcactgcgttttcacacagagaaaaatcac
tcgcccttctcagaggcccaagacaccccccaacagatatcatcgtgtaca
cggaacttccaaatgctgagtcaga

10

20

【 0 1 7 0 】

成熟ヒト K I R 2 D S 3 のタンパク質および c D N A 配列を、以下に示す。

成熟ヒト K I R 2 D S 3 タンパク質 (配列番号 3 1)

mslmvismac vgffwlqgaw phégfrrkps lla hp gplvk seetvilqcw sdvmfehfl
hregtfndtl rligehidgv skanfsigrm rqdlagtyrc ygsvphspyq fsapsdpldi
vitglyekps lsagpgptvl agesvtlscs swssydmuhl stegeaherr fsagpkvngt
fqadfp l gpa tqggtyrcfg sfhdspyews kssdp llvsv tgnpsnswps ptepssktgn
prhlhvligt svvklpftil lffllhrwcs dkknasvmdq gpagnrtvnr edsdeqdhqe
vsya

30

ヒト K I R 2 D S 3 c D N A (配列番号 3 2)

40

50

atgtcgctcatggctcatcagcatggcatgtgttgggttcttctggctgca
gggggcctggccacatgagggattccgcagaaaaccttccctcctggccc
accaggtcgctgtgaaatcagaagagacagtcacctgcaatgttgg
tcagatgtcatgtttgagcacttcttctgcacagagaggggacgttta
cgacactttgcgctcattggagagcacattgatgggttctccaaggcca
acttctccatcggtcgcatgaggcaagacctggcagggacctacagatgc
tacggttctgttctcactccccctatcagttttcagctcccagtgaccc
tctggacatcgtgatcacaggctctatatgagaaaccttctctctcagccc
agccggggccccacggttctggcaggagagagcgtgaccttgtcctgcagc
tcctggagctcctatgacatgtaccatctatccacggagggggaggccca
tgaacgtaggttctctgcagggcccaagggtcaacggaacattccaggccg
actttcctctggggcctgccacccaaggaggaacctacagatgcttcggc
tctttccatgactctccctacgagtgggtcaaagtcaagtgaccactgct
tgtttctgtcacaggaaacccttcaaatagttggccttcacccactgaac
caagctccaaaaccggtaaccccagacacctacacgttctgattgggacc
tcagtgggtcaaactccctttcaccatcctcctcttcttctccttcacg
ctggtgctccgacaaaaaaaaatgcatctgtaatggaccaagggcctgcgg
ggaacagaacagtgaacagggaggattctgatgaacaggaccatcaggag
gtgtcatacgcataa

10

【 0 1 7 1 】

成熟ヒトKIR2DL4のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

20

成熟ヒトKIR2DL4タンパク質（配列番号33）

hvggqdk pfcsawpsav vpqgghatlr chcrrgfnif tlykkdgvvp pelynrifwn
sflispvtpa hagtyrcrgf hphsptewsa psnplvimvt glyekpslta rpgptvrage
nvtlscssqs sfdiyhlrsre geahelrlpa vpsingtfqa dfplgpathg etyrcfgsfh
gspyewsdps dplpvsvtgn pssswpspte psfktgiarh lhavirysva iilftilpff
llhrwscskkk naavmnqepa ghrtvnreds deqdpqevty aqldhciftq rkitgpsqrs
krpstdtsvc ielpnaepa lspahehhsq almgssrett alsqtqllass nvpaagi

ヒトKIR2DL4 cDNA（配列番号34）

30

40

50

atgtcccttccacatgttgtgtggtcaatgtgtcaactgcacgatccgggcc
cctcaccacatcctctgcaccggtcagtcgagccgagtcactgcgtcctg
gcagcagaagctgcaccatgtccatgtcaccacggtcatcatcctggca
tgtcttgggttcttcttggaccagagtgtgtgggcacacgtgggtggtca
ggacaagcccttctgctctgcttggccagcgctgtggtgcctcaaggag
gacacgtgactcttcggtgtcactatcgctcggtgtttaaactcttcacg
ctgtacaagaaagatgggggtccctgtccctgagctctacaacagaatatt
ctggaacagtttctcatttagccctgtgacccagcacacgcagggacct
acagatgtcgaggttttaccgcactccccactgagtggtcggcacc
agcaacccctggtgatcatggtcacaggtctatatgagaaaccttcgct
tacagcccggccgggccccacggttcgcgcaggagagaacgtgacctgt
cctgcagctcccagagctcctttgacatctaccatctatccagggagggg
gaagcccacgaacttaggctccctgcagtgccagcatcaatggaacatt
ccaggccgacttccctctgggtcctgccaccacggagagacctacagat
gcttcggctctttccatggatctccctacgagtggtcagaccgagtgac
ccactgcctgtttctgtcacaggaaccccttctagtagttggccttcacc
cactgaaccaagcttcaaaactggtatcgccagacacctgcatgctgtga
ttaggtactcagtggtccatcatcctctttaccatccttcccttctttctc
cttcatcgctggtgtctcaaaaaaaaaagatgctgctgtaatgaaccaaga
gcctgcgggacacagaacagtgaacaggaggactctgatgaacaagacc
ctcaggaggtgacatacgacagttggatcactgcattttcacacagaga
aaaatcactggcccttctcagaggagcaagagaccctcaacagataccag
cgtgtgtatagaacttccaaatgctgagcccagagcggtgtctcctgcc
atgagcaccacagtcaggccttgatgggatcttctagggagacaacagcc
ctgtctcaaaccagcttgccagctctaatagtaccagcagctggaatctg
a

10

20

【 0 1 7 2 】

成熟ヒトKIR2DS4のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトKIR2DS4タンパク質（配列番号35）

qegvhrkps flalpghlvk seetvilqcw sdvmfehll hregkfnntl hligehhdgv
skanfsigpm mpvlagtyrc yssvphspyq lsapsdpldm viiglyekps lsaqpgptvq
agenvslscs siypgrgrpm nvgsllqcaas tehsrptflw alpptegptd asalsvtlpt
sgqtrvihcl fpsqetlqiv glhplnqapk pvtptdymf

30

ヒトKIR2DS4 cDNA（配列番号36）

atgtcgctcatggtcatcatcatggcggtgtgttgggttcttcttgctgca
gggggcctggccacaggaggagtcacagaaaaccttcttctcctggccc
tcccaggtcacctggtgaaatcagaagagacagtcacctgcaatgttgg
tcggatgtcatgtttgagcacttcttctgcacagagaggggaagttaa
caacactttgcacctcattggagagcaccatgatgggggttccaaggcca
acttctccattggtcccatgatgcctgtccttgcaggaaacctacagatgc
tacggttctgttctcactccccctatcagttgtcagctcccagtgacc
tctggacatggtgatcataggtctatatgagaaaccttctctctcagccc
agccggggccccacggttcaggcaggagagaatgtgacctgtcctgcagc
tccatctatccagggaaggggagggccatgaacgtaggctccctgcagtg
cgagcatcaacggaacattccaggccgactttcctctgggccctgccac
ccacggagggacctacagatgcttcggctctttccgtgacgctccctacg
agtggtaaactcgagtgatccactgcttgtttccgtcacaggaaaccc
tcaaatagttggccttccaccactgaaccaagctccaaaaccggttaacc
cagacacctacatgttctgattgggacctcagtggtcaaaatccctttca
ccatcctcctcttcttctccttcatcgctgggtgctccgacaaaaaaaaat
gctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaacagaacagtgaacagcga
ggattctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatacgcataa

40

50

【0173】

成熟ヒトKIR2DS5のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトKIR2DS5（配列番号37）

hegfrrkps llaahpgplvk seetvilqcw sdvmfehfl l hregtnhtl rligehidgv
skgnfsigrm tqdlagtyrc ygsythspyq lsapsdpldi vitglyekps lsaqpgptvl
agesvtlscs srssydmhl sregeaherr lpagtkvngt fqadfpldpa thggtyrcfg
sfrdspyews kssdpllvsv tgntsnswps ptepssktgn prhlhvligt svvklpftil
lffllhrwcs nkknasvmdq gpagnrtvnr edsdeqdhqe vsya

ヒトKIR2DS5 cDNA（配列番号38）

atgtcgctcatgggtcatcagcatggcgtgtgttgcttcttcttctgctgca
gggggctggccacatgaggattccgcagaaaaccttccctcctggccc
accaggtcccctggtgaaatcagaagagacagtcacctgcaatggttg
tcagatgtcatgtttgagcacttcttctgcacagagaggggacgttta
ccacacttttgcgcctcattggagagcacattgatggggtctccaaggga
acttctccatcggtcgcatgacacaagacctggcagggacctacagatgc
tacggttctgttactcactccccctatcagttgtcagcgcccagtgaccc
tctggacatcgatgacaggtctatatgagaaaccttctctctcagccc
agccggggccccacggttctggcaggagagagcgtgacctgtctctgcagc
tcccggagctcctatgacatgtaccatctatccagggaaggggagggcca
tgaacgtaggctccctgcagggcccaagggtcaacagaacattccaggccg
actttcctctggacctgtccacccacggaggacctacagatgcttcggc
tctttccgtgactctccatacagagtgggtcaaagtcaagtgacctactgct
tgtttctgtcacaggaaactcttcaaatagttggccttcacctactgaac
caagctccgaaaccggttaacccagacacctacacgttctgattgggacc
tcagtggtcaaactccctttcaccatcctcctcttcttctccttcatcg
ctggtgctccaacaaaaaaaaatgcatctgtaattggaccaagggcctgcgg
ggaacagaacagtgaacagggaggattctgatgaacaggaccatcaggag
gtgtcatacgcataa

10

20

【0174】

成熟ヒトKIR3DS1のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトKIR3DS1 cDNA（配列番号39）

hmggqdkpf lsawpsavvp rgghvtlrch yrhrfnnfml ykedrihvpi fhgrifqegf
nmspvttaha gnytcrgshp hsptgwsaps npmvimvtgn hrkpsllahp gplvksgerv
ilqcwsdimf ehfflhkegi skdpsrlvgq ihdgvskanf sigsmmralla gtyrcygsvt
htpyqlsaps dpldivvtgl yekpslsaqp gpkvqagesv tlscssrssy dmyhlsregg
aherrlpavr kvnrftqadf plgpathggt yrcfgsfrhs pyewsdpsdp llvsvtgnps
sswpspteps sksgnlrhlh iligtsvski pftillfll hrwcsnkklc ccngpracre
qk

30

ヒトKIR3DS1 cDNA（配列番号40）

40

atgttgctcatggctcgtcagcatggcgtgtgttgggttgttcttgggtcca
gagggccggtccacacatgggtgggtcaggacaagcccttctgtctgcct
ggcccagcgtgtgttgctcgcggaggacacgtgactcttcggtgtcac
tatcgtcataggtttaacaatttcatgctatacaaagaagacagaatcca
cgttcccatcttccatggcagaatattccaggagggttcaacatgagcc
ctgtgaccacagcacatgcagggaactacacatgtcggggttcacaccca
cactccccactgggtggtcggcaccagcaaccccatggtgatcatggt
cacaggaaaccacagaaaaccttccctcctggcccaccaggtccctgg
tgaaatcaggagagagagtcacctgcaatgttggtcagatatcatgttt
gagcacttctttctgcacaaagagtggatctctaaggacccctcacgcct
cgttggacagatccatgatggggctccaaggccaatttctccatcggtt
ccatgatgctgctgccttgcagggaacctacagatgctacggttctgttact
cacacccctatcagttgtcagctcccagtgatccctggacatcgtggt
cacaggtctatatgagaaaccttctctctcagcccagccgggccccaaagg
ttcaggcaggagagagcgtgaccttgtcctgtagctcccggagctcctat
gacatgtaccatctatccaggagggggggagcccatgaacgtaggctccc
tgcagtgcgcaaggtcaacagaacattccaggcagatttccctctgggcc
ctgccaccacaggagggaacctacagatgcttcggctctttccgtcactct
ccctacgagtggtcagacccgagtgaacccactgcttgtttctgtcacagg
aaaccccttaagtagttggccttcacccacagaaccaagctccaaatctg
gtaacctcagacacctgcacattctgattgggacctcagtggtcaaaatc
cctttcaccatcctcctcttcttctccttcacgctgggtgctccaacaa
aaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaacagaagtga

10

20

【 0 1 7 5 】

成熟ヒトNKG2Cのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトNKG2Cタンパク質（配列番号41）

mskqrgrtfse vslaqdpkrq qrkpkgnkss isgteqeifq velnlqnpsl nhqgidkiyd
cqgllpppek ltaevlgiic ivlmatvlkt ivlipflegn nsspnrtrtk arhcgchcpee
witysnscyy igkerrtwee sllactskns sllsidneee mkflasilps swigvfrnss
hhpwvtingl afkhkikdsd naelncaavlq vnrlksaqcg ssmiyhckhk l

ヒトNKG2C cDNA（配列番号42）

atgaataaacaagaggaaccttctcagaagtgagtctggcccaggaccc
aaagcggcagcaaaggaaacctaaaggcaataaaagctccatttcaggaa
ccgaacaggaaatattccaagtagaattaaatcttcaaaatccttccctg
aatcatcaagggttgataaaatatgactgccaaagggttactgccacc
tccagagaagctcactgccgaggtcctaggaatcatttgcattgtcctga
tggccactgtgttaaaaacaatagttcttattcctttcctggagcagaac
aatttttcccgaaatacaagaacgcagaaagcacgtcattgtggccattg
tcctgaggagtggattacatatccaacagttgttattacattggttaagg
aaagaagaacttgggaagagagtttgctggcctgtacttcgaagaactcc
agtctgctttctatagataatgaagaagaaatgaaatttctggccagcat
tttaccttcctcatggattgggtgtgtttcgtaacagcagtcattcatccat
gggtgacaataaatggtttggctttcaaacataagataaaagactcagat
aatgctgaacttaactgtgcagtgctacaagtaaatcgacttaaatcagc
ccagtggtgatcttcaatgatataatcattgtaagcataagcttttag

30

40

【 0 1 7 6 】

成熟ヒトCCR7のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCCR7タンパク質（配列番号43）

50

qdevtd dyigdnntvd ytlfeslcsk kdvrnfkawf lpimysiicf vgllngnlvv
ltyiyfkrllk tmtdyllnl avadilfllt lpfwaysaak swvfgvhfck lifaiykmsf
fsgmllllci sidryvaivq avsahrhrar vllisklscv giwilatvls ipellysdlq
rssseqamrc slitehveaf itiqvaqmvi gflvpllams fcylviirtl lgarnfernk
aikviiavvv vfivfqlpyn gvvlaqtvan fnitsstcel skqlniaydv tyslacvrcc
vnpflyafig vkfrndlfkl fkdldgclsqe qlrqwsscrh irrssmsvea ettttfsf

ヒトCCR7 cDNA (配列番号44)

atggacctggggaaaccaatgaaaagcgtgctggtggtggtgctctccttgt
cattttccaggatgctgtgtcaagatgaggtcacggacgattacatcg
gagacaacaccacagtggactacactttgttcgagtccttgtgctccaag
aaggacgtgcggaactttaagcctggttcctccctatcatgtactccat
catttgtttcgtgggcctactgggcaatgggctggtcgtgttgacctata
tctatttcaagaggctcaagaccatgaccgatacctacctgctcaacctg
gcggtggcagacatcctcttctcctgacccttcccttctgggcctacag
cgcgccaagtctgggtcttcggtgtccacttttgcaagctcatctttg
ccatctacaagatgagcttcttcagtggcatgctcctacttctttgcatc
agcattgaccgctacgtggccatcggtccaggctgtctcagctcaccgcca
ccgtgcccgcgtccttctcatcagcaagctgtcctgtgtgggcatctgga
tactagccacagtgtctccatcccagagctcctgtacagtacacctcag
aggagcagcagtgtgcaagcgatgcatgctctctcatcacagagcatgt
ggaggcctttatcaccatccagggtggcccagatggtgatcggctttctgg
tccccctgctggccatgagcttctgttaccttgtcatcatccgcaccctg
ctccaggcacgcaactttgagcgcaacaaggccatcaaggatcatcg
tgtggtcgtggtcttcatagtcttccagctgccctacaatggggtggtcc
tggcccagacggtggccaacttcaacatcaccagtagcacctgtgagctc
agtaagcaactcaacatcgccctacgacgtcacctacagcctggcctgcgt
ccgctgctgcgtcaaccctttctgtacgccttcatcggcgtcaagttcc
gcaacgatctcttcaagctcttcaaggacctgggctgcctcagccaggag
cagctccggcagtggtcttccctgtcggcacatccggcgctcctccatgag
tgtggaggccgagaccaccaccaccttctcccatag

10

20

【0177】

成熟ヒトCXCR3のタンパク質とcDNAの配列を、以下に示す。

成熟ヒトCXCR3タンパク質 (配列番号45)

mvlevsdhqv lndaevaall enfsssydyg enesdscts ppcpqdfsln fdraflpaly
slflllgllg ngavaavlls rrtalsstdt flhlavadt llvltlplwa vdaavqvwfg
sglckvagat fninfyagal llacisfdry lnivhatqly rrgpparvtl tclavwglcl
lfalpdfifl sahhderlna thcqynfpqv grtalrvlql vagfllpllv maycyahila
vllvsrgqrr lramrlvvvv vvafalcwtp yhlvvlvdil mdlgalarnc gresrvdvak
svtsglgymh cclnpllyaf vgvkfrermw mlllrlgcpn qrglqrqpss srrdsswset
seasyagl

30

ヒトCXCR3 cDNA (配列番号46)

40

atggagttgaggaagtacggccctggaagactggcggggacagttatagg
aggagctgctcagagtaaatacacagactaaatcagactcaatcacaaaag
agttcctgccaggcctttacacagcccccttctccccgttcccgccctca
caggtgagtgaccaccaagtgtataatgacgccgaggttgccgccctcct
ggagaacttcagctcttcctatgactatggagaaaacgagagtgactcgt
gctgtacctccccgccctgccacaggacttcagcctgaacttcgaccgg
gccttcctgccagccctctacagcctcctctttctgctggggctgctggg
caacggcgcggtggcagccgtgctgctgagccggcgacagccctgagca
gcaccgacaccttcctgctccacctagctgtagcagacacgctgctggtg
ctgacactgccgctctgggcagtggacgctgccgtccagtgggtctttgg
ctctggcctctgcaaagtggcaggtgccctcttcaacatcaacttctacg
caggagccctcctgctggcctgcatcagctttgaccgctacctgaacata
gttcatgccaccagctctaccgccggggggcccccgcccgctgaccct
cacctgcctggctgtctgggggctctgcctgcttttcgccctcccagact
tcatcttctgtcggcccaccacgacgagcgctcaacgccaccactgc
caatacaacttcccacaggtgggcgcacggctctgcgggtgctgcagct
ggtggctggctttctgctgccctgctggtcatggcctactgctatgcc
acatcctggcgtgctgctggtttccagggggccagcgcgctgcggggc
atgcggctggtggtggtggtcgtggtggcctttgccctctgctggacccc
ctatcacctggtggtgctggtggacatcctcatggacctgggcgctttgg
cccgcaactgtggccgagaaagcagggtagacgtggccaagtgcgtcacc
tcaggcctgggctacatgcaactgctgcctcaaccgctgctctatgcctt
tgtaggggtcaagttccgggagcggatgtggatgctgctcttgccgctgg
gctgcccccaaccagagagggtccagaggcagccatcgtcttcccgccgg
gattcatcctggtctgagacctcagaggcctcctactcgggcttgtga

10

20

【 0 1 7 8 】

成熟ヒト L-セレクチンのタンパク質および cDNA 配列を、以下に示す。

成熟ヒト L-セレクチンタンパク質（配列番号 47）

df lahhgtdcwt yhysekpmnw qrarrfcrdn ytdlvaiqnk aeieylektl
pfsrsyywig irkiggiwtw vgtknsltee aenwgdgepn nkknkedcve iyikrnkdag
kwnddachkl kaalcytasc qpwsccshge cveiinnnyc ncdvgyygpq cqfviqcepl
eapelgtmdc thplgnfsfs sqcafscseg tnltgieett cgpfgnwssp eptcqvique
plsapdlgim ncshplasfs ftsactfics egteligkkk ticessgiw npspicqkld
ksfsmikegd ynplfipvav mvtafsglaf iiwlarrlkk gkkskrsmnd py

30

ヒト L-セレクチン cDNA（配列番号 48）

40

50

atgggctgcagaagaactagagaaggaccaagcaaagccatgatatttcc
atggaaatgtcagagcaccagagggacttatggaacatcttcaagttgt
gggggtggacaatgctctgttgatttctggcacatcatggaaccgac
tgctggacttaccattattctgaaaaacccatgaactggcaaagggctag
aagattctgccgagacaattacacagatttagttgccatacaaaaacaagg
cggaaattgagtatctggagaagactctgcctttcagtcgttcttactac
tgataggaatccggaagataggaggaatatggacgtgggtgggaacca
caaatctcttactgaagaagcagagaactggggagatggtgagcccaaca
acaagaagaacaaggaggactgcgtggagatctatatcaagagaaacaaa
gatgcaggcaaatggaacgatgacgcctgccacaaactaaaggcagccct
ctgttacacagcttcttgccagccctggtcatgcagtggccatggagaat
gtgtagaaatcatcaataattacacctgcaactgtgatgtgggtactat
gggccccagtgctcagtttgtgattcagtgtagcctttggaggccccaga
gctgggtaccatggactgtactcaccctttgggaaacttcagcttcagct
cacagtgtgccttcagctgctctgaaggaacaaacttaactgggattgaa
gaaaccacctgtggaccatttggaaactggtcatctccagaaccaacctg
tcaagtgattcagtgtagcctctatcagcaccagatttggggatcatga
actgtagccatcccctggccagcttcagctttacctctgcatgtaccttc
atctgctcagaaggaactgagttaattgggaagaagaaaaccatttgtga
atcatctggaatctggtcaaactcctagtccaatatgtcaaaaattggaca
aaagtttctcaatgattaaggaggggtgattataaccccctcttcattcca
gtggcagtcatggttactgcattctctgggttggcatttatcatttggct
ggcaaggagattaaaaaaaggcaagaaatccaagagaagtatgaatgacc
catattaa

10

20

【 0 1 7 9 】

成熟ヒトCXCRIのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCXCRIタンパク質（配列番号49）

msnitdpqmw dfddlnftgm ppadedyspc xletetlnky vviiayalvf llslilgnsly
mlvilysrvq rsvtdvylln laladllfal tlpwaaskv ngwifgtflc kvvsllkevn
fysgillllac isvdrylaiv hatrtltqkr hlvkfvelgc wglsmnlslp fflfrqayhp
nnsspvcyev lgndtakwrm vlrlphtfg fivplfvmlf cygftlrltf kahmgqkhra
mrvifavvli flldwlpynl vlladtlmrt qviescerra nnigraldat eilgflhscl
npiiyafiqg nfrhgflkil amhglvskef larhrvtsyt sssvvnssnl

30

ヒトCXCRI cDNA（配列番号50）

40

50

atgtcaaataattacagatccacagatgtgggattttgatgatctaaattt
cactggcatgccacctgcagatgaagattacagccccgtatgctagaaa
ctgagacactcaacaagtatgttgtgatcatcgccctatgccctagtgttc
ctgctgagcctgctgggaaactccctggatgctggtcatcttatacag
cagggtcggccgctccgtcactgatgtctacctgctgaacctggccttg
ccgacctactctttgccctgaccttgcccatctgggcccgcctccaagggtg
aatggctggatttttggcacattcctgtgcaagggtggtctcactcctgaa
ggaagtcaacttctacagtggcatcctgctgttgccctgcatcagtgtgg
accgttacctggccattgtccatgccacacgcacactgaccagaagcgt
cacttggtaagtttgtttgtcttggctgctggggactgtctatgaatct
gtccctgcccttcttcccttttccgcccaggcttaccatccaaacaattcca
gtccagtttgcctatgaggtcctgggaaatgacacagcaaatggcggatg
gtgttgccgcatcctgcctcacacctttggcctcatcgtgccgctgtttgt
catgctgttctgctatggattcacctgctgtaactgtttaaggcccaca
tggggcagaagcaccgagccatgagggtcatctttgctgtcgtcctcatc
ttcctgctttgctggctgccctacaacctggcctgctggcagacacct
catgaggaccaggtgatccaggagagctgtgagcgccgcaacaacatcg
gccggggccctggatgccactgagattctgggatttctccatagctgcctc
aaccatcatctacgccttcatcgcccaaattttgcctatggattcct
caagatcctggctatgcatggcctggctcagcaaggagttcttggcacgtc
atcgtgttacctcctacacttcttctgtctgcaatgtctcttccaacctc
tga

10

20

【0180】

成熟ヒトCXC R 2のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCXC R 2タンパク質（配列番号51）

medfnmesds fedfwkgedl snsysstlp pflldaapce pesleinkyf vviiyalvfl
lsllgnsllvm lvilysrvgr svtdvyllnl aladlllfalt lpiwaaskvn gwifgtflck
vvsllkevnf ysgillllaci svdrylaivh atrtltqkry lvkficlsiw glslllalpv
llfrtvyss nvspacyedm gnntanwrml lrilpqsfgr ivpllimlfc ygftlrltlfk
ahmgqkhram rvifavvlif llcwlpynlv lladtlmrtq viqetcern hidraldate
ilgilhscln pliyafiqqk frhgllkila ihgliskdsl pkdsrpsfvg sssghtsttl

ヒトCXC R 2 cDNA（配列番号52）

atggaagattttaacatggagagtgcagccttgaagatttctggaaagg
tgaagatcttagtaattacagttacagctctaccctgcccccttttctac
tagatgccgccccatgtgaaccagaatccctggaaatcaacaagtatttt
gtggtcattatctatgccctggtattcctgctgagcctgctgggaaactc
cctcgtgatgctggtcatcttatacagcagggtcggccgctccgtcactg
atgtctacctgctgaacctagccttggccgacctactctttgccctgacc
ttgcccatctgggcccgcctccaagggtgaatggctggatttttggcacatt
cctgtgcaagggtggtctcactcctgaaggaagtcaacttctatagtggca
tctgtctactggcctgcatcagtgtggaccgttacctggccattgtccat
gccacacgcacactgaccagaagcgctacttgggtcaaattcatatgtct
cagcatctggggctgtgtccttgtccttggccctgctgtcttacttttcc
gaaggaccgtctactcatccaatgttagcccagcctgctatgaggacatg
ggcaacaatacagcaaaactggcggatgctgttacggatcctgccccagtc
ctttggcttcatcgtgccactgctgatcatgctgttctgctacggattca
ccctgcgtacgctgtttaaggcccacatggggcagaagcaccgggccatg
cgggtcatctttgctgtcgtcctcatcttccctgctctgctggctgccta
caacctggctcctgctggcagacacctcatgaggaccaggtgatccagg
agacctgtgagcgccgcaatcacatcgaccgggctctggatgccaccgag
attctgggcatccttcacagctgcctcaaccctcatctacgccttcat
tggccagaagtttgcctatggactcctcaagattctagctatacatggct
tgatcagcaaggactccctgcccgaagacagcaggccttcccttgttggc
tcttcttcagggcacacttccactactctctaa

30

40

50

【0181】

成熟ヒトCX3CR1のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCX3CR1タンパク質（配列番号53）

mdqfpesvte nfeyddlaea cyigdivvfg tvflsifysv ifaiglvgnl lvvfaltnsk
kpksvtdiyl lnlaalsdllf vatlpfwthy linekglhna mckfttafff igffgsiffi
tvisidryla ivlaansmn rtvqhgvts lgvwaaailv aapqfmftkq kenecldgyp
evlqeipvl rnvetnflgf llpllimsys yfriiqtlfs cknhkkakai klillvvivf
flfwtpynvm ifletlklyd ffpscdmrkd lrlalsvtet vafshcclnp liyafagekf
rrylyhlygk clavlcgrsv hvdfsssesq rsrhgsvlss nftyhtsdgd allll

ヒトCX3CR1 cDNA（配列番号54）

atggatcagttccctgaatcagtgacagaaaactttgagtacgatgattt
ggctgaggcctgttatattggggacatcgtggtctttgggactgtgttcc
tgtccatattctactccgtcatctttgccattggcctggtgggaaatttg
ttggtagtgtttgcctcaccaacagcaagaagcccaagagtgtcaccga
catttacctcctgaacctggccttgtctgatctgctgtttgtagccactt
tgcccttctggactcactatgtgataaatgaaaagggcctccacaatgcc
atgtgcaaattcactaccgccttcttcttcatcggttttttgaagcat
attcttcatcacctcatcagcattgataggtacctggccatcgtcctgg
ccgccaactccatgaacaaccggaccgtgcagcatggcggtcaccatcagc
ctaggcgctctgggcagcagccattttggtggcagcaccagttcatgtt
caciaagcagaaagaaaatgaatgccttgggtgactaccccgaggtcctcc
aggaaatctggcccggtgctccgcaatgtggaaacaaattttcttggttc
ctactccccctgctcattatgagttattgctacttcagaatcatccagac
gctgttttctgcaagaaccacaagaaagccaaagccattaaactgatcc
ttctggtggtcatcgtgttttctcttctggaaccctacaacgttatg
attttcctggagacgcttaagctctatgacttcttccagttgtgacat
gaggaaggatctgaggctggccctcagtggtgactgagacggttgcattha
gccattgttgctgaatcctctcatctatgcatttgctggggagaagtcc
agaagatacctttaccacctgtatgggaaatgcctggctgtcctgtgtgg
gcgctcagtcacggttgatttctcctcatctgaatcacaaaggagcaggc
atggaagtgttctgagcagcaattttacttaccacacgagtgtgagat
gcattgctccttctctga

【0182】

成熟ヒトChemR23のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトChemR23タンパク質（配列番号55）

mrmededynt sisygdeypd yldsivvled lsplearvtr iflvvvsiv cflgilngnl
viiiatfkmk ktvnmvwfln lavadflfnv flpihityaa mdyhvwfgta mckisnflli
hnmftsvfll tiissdrctis vllpvwsqnh rsvrlaymac mviwvlaffl sspslvfrdt
anlhgkiscf nnfslstpgs sswpthsqmd pvgysrhmvv tvtrflcgfl vpvliitacy
ltivcklqrn rlaktkkpfk iivtiiiitff lcwcpyhtln llelhhtamp gsvfslglpl
atalaiansc mnpilyvfmq qdfkkfkval fsrlvnalse dtghssypsh rsftkmssmn
ertsmneret gml

ヒトChemR23 cDNA（配列番号56）

10

20

30

40

50

atgagaatggaggatgaagattacaacacttccatcagttacggtgatga
ataccctgattattagactccattgtggttttggaggacttatccccct
tggaagccagggtgaccaggatcttccctgggtggtggtctacagcatcgtc
tgcttccctcgggattctgggcaatgggtctggtgatcatcattgccacctt
caagatgaagaagacagtgaacatgggtctggttcctcaacctggcagtgg
cagatttccctgttcaacgtcttccctcccaatccatatcacctatgccgcc
atggactaccactgggttttccggacagccatgtgcaagatcagcaactt
ccttctcatccacaacatgttcaccagcgtcttccctgctgaccatcatca
gctctgaccgctgcatctctgtgctcctccctgtctgggtcccagaaccac
cgcagcgttcgcctggccttacatggcctgcatgggtcatctgggtcctggc
tttcttcttgagttccccatctctcgtcttccgggacacagccaacctgc
atgggaaaatatcctgcttcaacaacttcagcctgtccacacctgggtct
tcctcgtggccactcactcccaaattggaccctgtgggggtatagccggca
catgggtggtgactgtcaccgcgttccctctgtggcttccctggtcccagtcc
tcatcatcacagcttgctacctcaccatcgtgtgcaaactgcagcgcaac
cgctggccaagaccaagaagcccttcaagattattgtgaccatcatcat
taccttcttccctctgctgggtgccctaccacacactcaacctcctagagc
tccaccacactgccatgcctggctctgtcttcagcctgggtttgccctg
gccactgcccttgccattgccaacagctgcatgaacccattctgtatgt
tttcatgggtcaggacttcaagaagttcaaggtggccctcttctctcgcc
tggtcaatgctctaagtgaagatacaggccactcttccctaccccagccat
agaagctttaccaagatgtcatcaatgaatgagaggacttctatgaatga
gagggagaccggcatgctttga

10

20

【 0 1 8 3 】

成熟ヒトCXC R 4のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトCXC R 4タンパク質（配列番号57）

megisiytsd nyteemgsd ydsmkepcfr eenanfknif lptiysiifl tgivgnglvi
lvmgyqkklr smtdkyrlhl svadllfvit lpfwavdava nwyfgnflck avhvitytnl
yssvlilafi sldrylaivh atnsqrprkl laekvvvyvgv wipallltip dfifanvsea
ddryicdrfy pndlwwvvfq fqhimvglil pgivilscyc iiisklshsk ghqkrkalkt
tvililaffa cwlpyyigis idsfilleii kggcefentv hkwisiteal affhcclnpi
lyafllgakfk tsaqhaltsv srgsslkils kgkrgghssv stesesssfh ss

30

ヒトCXC R 4 cDNA（配列番号58）

40

50

atgtccattcctttgctcttttgcagatatatacacttcagataactacac
cgaggaaatgggctcaggggactatgactccatgaaggaaccctgtttcc
gtgaagaaaatgctaatttcaataaaaatcttcctgccaccatctactcc
atcatcttcttaactggcattgtgggcaatggattgggtcatcctgggtcat
gggttaccagaagaaaactgagaagcatgacggacaagtacaggctgcacc
tgtcagtgggcgacctcctctttgtcatcacgcttccttctgggcagtt
gatgccgtggcaaaactggtactttgggaacttcctatgcaaggcagtgcca
tgtcatctacacagtcacacctctacagcagtggtcctcatcctggccttca
tcagtcctggaccgctacctggccatcgtccacgccaccaacagtcagagg
ccaaggaagctgttggctgaaaaggtggtctatgttggcgtctggatccc
tgccctcctgctgactattcccgaacttcattctttgccaacgtcagtgagg
cagatgacagatatatctgtgaccgcttctaccccaatgacttgtgggtg
gttgtgtttccagtttccagcacatcatggttggccttatcctgctggtat
tgtcatcctgtcctgctattgcattatcatctccaagctgtcacactcca
agggccaccagaagcgcaaggccctcaagaccacagtcattcctcatcctg
gctttcttcgctgttggctgccttactacattgggatcagcatcgactc
cttcatcctcctggaaatcatcaagcaagggtgtgagtttgagaacactg
tgcacaagtggatttccatcacaggagccctagctttcttccactgttgt
ctgaaccccatcctctatgctttccttggagccaaatttaaaacctctgc
ccagcacgcactcacctctgtgagcagagggtccagcctcaagatcctct
ccaaaggaaagcgaggtggacattcatctgtttccactgagtcctgagtc
tcaagttttccactccagctaa

10

20

【 0 1 8 4 】

成熟ヒトCCR5のタンパク質およびcDNAの配列を、以下に示す。

成熟ヒトCCR5タンパク質（配列番号59）

mdyqvsspiy dinyytsepc qkinvkqiaa rllpplyslv fifgfvgnml vililincrk
lksmtdiy11 nlaisdlffl ltvpfwahya aaqwdfgntm cqlltglyfi gffsgiffii
lltidrylav vhavfalkar tvtfgvvtsv itwvvavfas lpgiiftrsq keglhytcss
hfpysqyqfw knfqtlkivi lglvlp11vm vicysgilkt llrcrnekkh hravrlifti
mivyflfwap ynivlllntf qeffgl1nncs ssnrldqamq vtetlgmthc cinpiiyafv
gekfrnyllv ffqkhiakrf ckccsifqqe aperassvyt rstgeqeisv gl

30

ヒトCCR5 cDNA（配列番号60）

atggattatcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatc
ggagccctgccaaaaaatcaatgtgaagcaaatcgagcccgccctcctgc
ctccgctctactcactgggtgttcatccttgggtttgtgggcaacatgctg
gtcatcctcatcctgataaaactgcaaaaggctgaagagcatgactgacat
ctacctgctcaacctggccatctctgacctgttttcccttcttactgtcc
ccttctgggctcactatgctgccgcccagtgaggactttggaaatacaatg
tgtcaactcttgacagggtctat11tataggcttcttctctggaatctt
cttcatcatcctcctgacaatcgataggtacctggctgtcgtccatgctg
tgtttgctttaaaagccaggacgggtcacctttggggtgggtgacaagtgtg
atcacttgggtgggtggtgtgtttgctctctcccaggaatcatctttac
cagatctcaaaaagaaggcttcttaccacctgcagctctcattttccat
acagtcagtatcaattctggaagaatttccagacattaaagatagtcac
ttggggctgggtcctgcccgtgcttgtcatggtcatctgctactcggaat
cctaaaaactctgcttcgggtgtcgaaatgagaagaagaggcacagggtg
tgaggcttatcttaccatcatgattgtttat11tcttcttctgggctccc
tacaacattgtccttctcctgaacaccttccaggaattcttggcctgaa
taattgcagtagctctaacagggttgacccaagctatgcaggtgacagaga
ctcttgggatgacgcactgctgcatcaaccccatcatctatgcctttgtc
ggggagaagttcagaaactacctcttagtcttcttccaaaagcacattgc
caaacgcttctgcaaatgctgttctat11tccagcaagaggctcccagagc
gagcaagctcagtttacacccgatccactggggagcaggaaatatctgtg
ggcttgtga

40

50

【0185】

成熟ヒトS1P5のタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトS1P5タンパク質（配列番号61）

mesgllrpap vsevivlhyn ytgklrgary qpgaglrada vvclavcafi vlenlavllv
lgrhprfhap mfillgsltl sdllagaaya anillsgplt lklspalwfa reggvfvalt
asvlsllaia lersltmarr gpapvssrgr tlamaaaawg vslllgllpa lgwnclgrld
acstvlplya kayvlfcvla fvgilaaica lyariycqvr anarrlparp gtagttstra
rrkprslall rtlsvllaf vacwgplfll lllldvacpar tcpvllqadp flglamansl
lnpiiytltn rdldrhallrl vccgrhscgr dpsgsqqsas aaeasgglrr clppgldgsf
sgsersspqr dgldtsgstg spgaptart lvsepaad

10

ヒトS1P5 cDNA（配列番号62）

atggagtcggggctgctgcggccggcgccggtgagcgaggtcatcgtcct
gcattacaactacaccggcaagctccgcggtgcgcgctaccagccgggtg
ccggcctgcgcgccgacgccgtggtgtgcctggcggtgtggccttcac
gtgctagagaatctagccgtgtgttggtgctcggacgccaccgcgctt
ccacgctcccatgttcctgctcctgggcagcctcacgttgctcgatctgc
tggcaggcgccgcctacgccgccaacatcctactgtcggggccgctcacg
ctgaaactgtccccgcgctctggttcgcacgggaggaggcgctcttcgt
ggcactcactgcgtccgtgctgagcctcctggccatcgcgctggagcgca
gcctcaccatggcgcgagggggcccgccgctctccagtcggggggcg
acgtggcgatggcagccgcggcctggggcggtgctcgctgctcctcgggct
cctgccagcgctgggctggaattgcctgggtcgcttgacgcttgctcca
ctgtcttgccgctctacgccaaaggcctacgtgctcttctgctgctcgcc
ttcgtgggcatcctggccgctatctgtgcaactctacgcgcgcatctactg
ccaggtacgcgccaaacgcgcggcgccctgccggcacggcccgggactgcg
ggaccacctcgaccggggcgcgctcgcaagccgcgctcgctggccttgctg
cgcacgctcagcggtgtgctcctggcctttgtggcatgttggggccccct
cttctgctgctgttgctcgacgtggcggtgccggcgcgcacctgtcctg
tactcctgcaggccgatcccttctgggactggccatggccaactcactt
ctgaaccccatcatctacacgctcaccaaccgcgacctgcgccacgcgct
cctgcgcctggtctgctgcggacgccactcctgcggcagagaccgagtg
gctcccagcagtcggcgagcgcggtgaggcttccgggggctgcgccgc
tgctgcccccgggccttgatgggagcttcagcggtcggagcgctcatc
gccccagcgcgacgggctggacaccagcggtccacaggcagccccgggtg
caccacagccgcccggactctggtatcagaaccggctgcagactga

20

30

【0186】

成熟ヒトC-kitのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトC-kitタンパク質（配列番号63）

40

50

qpsvs pgepsppsih pgksdlivrv gdeirllctd pgfvkwtfei ldetnenkqn
ewitekaeat ntgkytctnk hglnsniyvf vrdpaklflv drslygkedn dtlvrclpltd
pevtnyslkg cggkplpkdl rfipdpkagi miksvkayh rlcclhcsvdq egksvlsekf
ilkvrapafa vpvsvskas yllregeeft vtctikdvss svystwkren sqtklqekyn
swhhgdfnye rqatltissa rvndsgvfmc yanntfgsan vtttlevvdk gfinifpmin
ttvfvndgen vdliveyeaf pkpehqqwi y mnrtftdkwe dypksenese uryvselhlt
rlkgteggty tflvsnsdvn aaiafnvyvn tkpeiltydr lvngmlqcva agfpeptidw
yfcpgteqrc sasvlpvdvq tlnssgppfg klvvqssids safkhngtve ckayndvgkt
sayfnafkg nnkeqihpht lftplligfv ivagmmciiv miltkyklqk pmyevqwkvv
eeingnnyvy idptqlpydh kwefprnrls fgktlgagaf gkvveatayg likdaamt
avkmlkpsah lteralmse lkvlsylgnh mnivnllgac tiggptlvt eyccygdlln
flrrkrdsfi cskqedhaea alyknllhsk esscsdstne ymdmkpgvsy vvptkadr
svrigsyier dvtpaimedd elaldledll sfsyqvakgm aflaskncih rdlaarnll
thgrtkicd fglardiknd snyvvkgnar lpvkwmapes ifncvytfes dvwsygiflw
elfslgsspy pgmpvdsfky kmikegfrml spehapaemy dimktcwad plkrptfkqi
vqliekqise stnhiysnla ncsprnqkp vdhsvrinsv gstasssqpl lvhddv

ヒトC-kit cDNA (配列番号64)

10

20

30

40

50

atgagagggcgctcgcggcgccctgggattttctctgcggttctgctcctact
gcttcgcgtccagacaggctcttctcaaccatctgtgagtccaggggaac
cgtctccaccatccatccatccaggaaaatcagacttaatagtccgcgtg
ggcgacgagattaggctgttatgcactgatccgggctttgtcaaattggac
ttttgagatcctggatgaaacgaatgagaataagcagaatgaatggatca
cggaaaaggcagaagccaccaacaccggcaaatacacgtgcaccaaaaa
cacggcttaagcaattccattttatgtgtttgtagagatcctgccaaagct
tttccttggtgaccgctccttgatgggaaagaagacaacgcacgctgg
tccgctgtcctctcacagaccagaagtgaccaattattccctcaagggg
tgccaggggaagcctcttcccaaggacttgaggtttattcctgacccaa
ggcgggcatcatgatcaaaagtgtgaaacgcgcctaccatcggctctgtc
tgcattgttctgtggaccaggagggaagtgcagtgtgtcggaaaaattc
atcctgaaagtgaggccagccttcaaagctgtgcctgttgtgtctgtgtc
caaagcaagctatcttcttagggaaggggaagaattcacagtgcgtgca
caataaaagatgtgtctagtgtgtgtactcaacgtggaaaagagaaaac
agtcagactaaactacaggagaaatataatagctggcatcacggtgactt
caattatgaacgtcaggcaacggtgactatcagttcagcgagagttaatg
attctggagtgttcattgtgttatgccaataatacttttgatcagcaaat
gtcacaacaaccttggagtagtagataaaggattcattaatatcttccc
catgataaaactacagtatttgtaaacgatggagaaaatgtagatttga
ttgttgaaatgaagcattccccaaacctgaacaccagcagtggatctat
atgaacagaaccttcactgataaatgggaagattatcccaagtctgagaa
tgaaagtaatatcagatacgtgaagtgaacttcattctaacgagattaaaag
gcaccgaaggaggcacttacacattcctagtgtccaattctgacgtcaat
gctgccatagcatttaattgtttatgtgaatacaaaaaccagaaatcctgac
ttacgacaggctcgtgaatggcatgctccaatgtgtggcagcaggattcc
cagagcccacaatagattgggtatttttgtccaggaactgagcagagatgc
tctgcttctgtactgccagtggatgtgcagacactaaactcatctgggcc
accgtttggaagctagtgggttcagagttctatagattctagtgcattca
agcacaatggcacggttgaatgtaaggcttacaacgatgtgggcaagact
tctgcctatttttaactttgcatttaaggtaacaacaaagagcaaatcca
tccccacaccctgttcaactcctttgctgattgggttcgtaatcgtagctg
gcatgatgtgcattattgtgatgattctgacctacaaatatttacagaaa
cccatgtatgaagtacagtgggaaggttggttgaggagataaatggaaacaa
ttatgtttacatagacccaacacaacttccttatgatcacaatgggagt
ttccagaaaacaggctgagttttgggaaaaccctgggtgctggagctttc
gggaaggttggttgaggcaactgcttatggcttaattaagtcatgctgctgc
catgactgtcgtgtgaaagatgctcaagccgagtgcccatttgacagaaac
gggaagccctcatgtctgaactcaaagtcctgagttaccttggtaatcac
atgaatattgtgaatctacttgagcctgcaccattggaggggccaccct
ggtcattacagaatattgttgctatgggtgatcttttgaattttttgagaa
gaaaacgtgattcattttatttgttcaaagcaggaagatcatgcagaagct

10

20

30

40

50

gcactttataagaatcttctgcattcaaaggagtcttcctgcagcgatag
tactaatgagtacatggacatgaaacctggagtttcttatgttggtcccaa
ccaaggccgacaaaaggagatctgtgagaataggctcatacatagaaaga
gatgtgactcccgccatcatggaggatgacgagttggccctagacttaga
agacttgctgagcttttcttaccaggtggcaaagggcatggctttcctcg
cctccaagaattgtattcacagagacttggcagccagaaatatcctcctt
actcatggtcggatcacaagatttgtgattttgggtctagccagagacat
caagaatgattctaattatgtggttaaaggaaacgctcgactacctgtga
agtggatggcacctgaaagcattttcaactgtgtatacacgtttgaaagt
gacgtctggtcctatgggatttttcttgggagctgttctcttttaggaag
cagccccatcctggaatgccggtcgattctaagttctacaagatgatca
aggaaggcttccggatgctcagccctgaacacgcacctgctgaaatgtat
gacataatgaagacttgctgggatgcagatcccctaaaaagaccaacatt
caagcaaattgttcagctaattgagaagcagatttcagagagcaccaatc
atatttactccaacttagcaaactgcagccccaaccgacagaagcccggtg
gtagaccattctgtgcggatcaattctgtcggcagcaccgcttcctcctc
ccagcctctgcttgtgcacgacgatgtctga

10

【 0 1 8 7 】

成熟ヒトmTORのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。
成熟ヒトmTORタンパク質（配列番号65）

20

30

40

50

mlgtgpaaat taattssnvs vlqqfasglk srneetraka akelqhyvtm elremsqees
 trfydqlnhh ifelvsdda nerkggilai asligvegn atrigrfany llnllpsndp
 vvmemaskai grlamagdtf taeyvefevk ralewlgadr negrrhaavl vlrelaisvp
 tfffqgvqpf fdnifavwd pkqairegav aalraclilt tqrepkemqk pqwyrhtfee
 aekgfdetla kekgnrddr ihgallilne lvrissemege rlreemeeit qqqlvhdkeyc
 kdmgfgtkp rhitpftsfg avqpqqsnal vgllygsshq glmgfgtspk pakstlvesr
 ccdlmeekf dqvcqwlkc rnsksliqm tilnllprla afrpsaftdt qylqdtmnhv
 lscvkkeker taafqalgl svavrsefkv ylprvldiir aalppkdfah krqkamqvda
 tvftcismia ramgpgiqqd ikellepmla vglspaltav lydlrqrqpq lkkdiqdgll
 kmllslvlmhk plrhpgmpkg lahqlaspgl ttlpeasdvq sitlalrtlg sfefeghslt
 qfvrhcadhf lnsehkeirm eaartcsrll tpsihlisgh ahvvsqtavq vvadvlskll
 vvgitdpdpd istrycvlasld erfdahlaqa enlqalfval ndqvfeirel aictvgrlss
 mnpafvmpfl rkmlilqilte lehsgigrik eqsarmighl vsnaprlirp ymepilkali
 lklkdpdpdp npgvinnvla tigelaqvsq lemrvkwvdel fiiimdmlqd sslakrqva
 lwtlglqlvas tgyvvepyrk yptllelln flkteqnggt rreairvlg lgalpykhk
 vnigmidqsr dasavslses kssqdssdys tsemvlvmgn lpldefypav smvalmrifr
 dqslshhhtm vvqaitfifk slglkcvqfl pqvmptflnv irvcdgaire flfqqlgmlv
 sfvkshirpy mdeivtlmre fwvmtsiqs tiillieqiv valggefkly lpqliphmlr
 vfmhdnspgr ivsikllaai qlfganlddy lhlllppivk lfdapeaplp srkaaletvd
 rltelldftd yasriihpiv rtldqspelr stamdtlssl vfqlgkkyqi fipmvnkvlv
 rhrinhqryd vlicrivkgy tladeeedpl iyqhrmlrsg qgdalasgpv etgpmkklhv
 stinlqkawg aarrvskddw lewlrrlsle llkdsssspsl rscwalaqay nrmardlfna
 afvscwseln edqqdelirs ielaltsqdi aevtqtllnl aefmehsdkg plplrddngi
 vllgeraakc rayakalhyk elefqkgptp aileslisin nklqqpeaaa gvleyamkhf
 geleiqatwy eklhewedal vaydkkmdtn kddpelmlgr mrclealgew gqhqcccek
 wtlvndetqa kmarmaaaaa wglgqwsme eytcmiprtd hdgafyravl alhqdlfsla
 qqcidkardl ldaeltamag esysraygam vschmlsele eviqyklvpe rreiirqiww
 erlqgcqriv edwqkilmvr slvvsphedm rtwlkyasl gksgrlalah ktlvlllgvd
 psrqldhplp tvhpqvtyay mknmwksark idafqhmghf vqtmqqqagh aiatedqqhk
 qelhkmlarc flklgewqln lqginestip kvlyqysaat ehdrswykaw hawavmnefa
 vlhykhqnga rdekkklrha sgantitnatt aattaatatt tastegsnse seaestensp
 tpsplqkkvt edlsktllmy tvpavqgffr sislsrgnnl qdtrlvltlw fdyghwpdvn
 ealvegkai qidtwlqvip qliaridtp plvgrlihl ltdigryhpq aliyppltvas
 kstttarhna ankilknmce hsntlvqqam mvseelirva ilwhemwheg leeasrlyfg
 ernvkgmfev leplhammer gpqtlketsf nqaygrdlme agewcrkymk sgnvkdltqa
 wdlyyhvfrf iskqlpqlts lelqyvspkl lmcrdlelav pgtydpnqpi iriqsiapsl
 qvitskqrpr ktlmgsnghe efvllkghe dlrqdervmq lfglvntlla ndptsrlknl
 siqryavipl stnsgligwv phcdtlhali rdyrekkkil lniehrimlr mapdydhltl
 mqkvevfeha vnntagddla kllwlkspss evwfdrrtny trslavmsmv gyilglgdrh
 psnlmlrls gkilhidfgd cfvamtrek fpekipfrlt rmltnamevt gldgnyritc
 htvmelreh kdsvmavlea fvydpllnwr lmdtnkgnk rsrttrtdsys agqsveildg
 velgepahkk tgttvpesih sfigdglvkv ealnkkaiqi inrvrdklgt rdfsddtld
 vptqvellik qatshenlcq cyigwcpfw

10

20

30

ヒトmTOR cDNA (配列番号66)

40

atgcttgga accggacctg ccgccgccac caccgctgcc accacatcta gcaatgtgag
cgtcctgcag cagtttgcca gtggcctaaa gagccggaat gaggaaacca gggccaaagc
cgccaaggag ctccagcact atgtcaccat ggaactccga gagatgagtc aagaggagtc
tactcgcttc tatgaccaac tgaaccatca catttttgaa ttggtttcca gctcagatgc
caatgagagg aaaggtggca tcttggccat agctagcctc ataggagtgg aaggtgggaa
tgccacccga attggcagat ttgccaacta tcttcggaac ctccctcccct ccaatgaccc
agttgtcatg gaaatggcat ccaaggccat tggccgtctt gccatggcag gggacacttt
taccgctgag tacgtggaat ttgaggtgaa gcgagccctg gaatggctgg gtgctgaccg
caatgagggc cggagacatg cagctgtcct ggttctccgt gagctggcca tcagcgtccc
taccttcttc ttccagcaag tgcaaccctt ctttgacaac atttttgtgg ccgtgtggga
ccccaaacag gccatccgtg agggagctgt agccgccctt cgtgcctgtc tgattctcac
aaccagcgt gagccgaagg agatgcagaa gcctcagtgg tacaggcaca catttgaaga
agcagagaag ggatttgatg agaccttggc caaagagaag ggcataatc gggatgatcg
gatccatgga gccttgttga tccttaacga gctgggtccga atcagcagca tggagggaga
gcgtctgaga gaagaaatgg aagaaatcac acagcagcag ctggtacacg acaagtactg
caaagatctc atgggcttcg gaacaaaacc tcgtcacatt acccccttca ccagtttcca
ggctgtacag cccagcagt caaatgcctt ggtggggctg ctgggttaca gctctacca
aggcctcatg ggatttgga cctccccag tccagctaag tccaccctgg tggagagccg
gtgttgcaga gacttgatgg aggagaaatt tgatcaggtg tgccagtggg tgctgaaatg
caggaatagc aagaactcgc tgatccaaat gacaatcctt aatttgttgc ccgcttggc
tgcattccga cttctgcct tcacagatac ccagtatctc caagatacca tgaaccatgt
cctaagctgt gtcaagaagg agaaggaacg tacagcggcc ttccaagccc tggggctact
ttctgtggct gtgaggtctg agtttaaggt ctatttgcct cgcgtgctgg acatcatccg

10

20

30

40

50

agcgggccctg cccccaaggg acttcgcccc taagaggcag aaggcaatgc aggtggatgc
 cacagtcttc acttgcatca gcatgctggc tcgagcaatg gggccaggca tccagcagga
 tatcaaggag ctgctggagc ccatgctggc agtgggacta agccctgccc tcaactgcagt
 gctctacgac ctgagccgtc agattccaca gctaaagaag gacattcaag atgggctact
 gaaaatgctg tccctgggtcc ttatgcacaa accccttgcg caccaggca tgcccaaggg
 cctggcccat cagctggcct ctctggcct cagaccctc cctgaggcca gcgatgtggg
 cagcatcact cttgccctcc gaacgcttg cagctttgaa tttgaaggcc actctctgac
 ccaatttggt cgccactgtg cggatcattt cctgaacagt gagcacaagg agatccgcat
 ggaggctgcc cgcacctgct ccgcctgct cacaccctcc atccacctca tcagtggcca
 tgctcatgtg gtttagccaga ccgcagtgc aagtgtggca gatgtgctta gcaaactgct
 cgtagtggg ataacagatc ctgacctga cattcgctac tgtgtcttg cgtccctgga
 cgagcgcttt gatgcacacc tggcccaggc ggagaacttg caggccttgt ttgtggctct
 gaatgaccag gtgtttgaga tccgggagct ggccatctgc actgtgggccc gactcagtag
 catgaaccct gcctttgtca tgcctttcct gcgcaagatg ctcatccaga ttttgacaga
 gttggagcac agtgggattg gaagaatcaa agagcagagt gcccgcagtc tggggcacct
 ggtctccaat gcccccgac tcatccgccc ctacatggag cctattctga aggcattaat
 tttgaaactg aaagatccag accctgatcc aaaccagggt gtgatcaata atgtcctggc
 aacaatagga gaattggcac aggttagtg cctggaaatg aggaaatggg ttgatgaact
 ttttattatc atcatggaca tgctccagga ttctctttg ttggccaaa ggcaggtggc
 tctgtggacc ctgggacagt tgggtggccag cactggctat gtagtagagc cctacaggaa
 gtaccctact ttgcttgagg tgctactgaa ttttctgaag actgagcaga accagggtac
 acgcagagag gccatccgtg tgttagggct ttaggggct ttggatcctt acaagcacia
 agtgaacatt ggcatgatag accagtccg ggatgcctct gctgtcagcc tgtcagaatc
 caagtcaagt caggattcct ctgactatag cactagtga atgtgtgtca acatgggaaa
 cttgcctctg gatgagttct acccagctgt gtccatgggt gccctgatgc ggatcttccg
 agaccagtca ctctctcatc atcacaccat ggtgtgcccag gccatcacct tcatcttcaa
 gtccttgga ctcaaatgtg tgcagttcct gcccagggtc atgcccacgt tcttaacgt
 cattcgagtc tgtgatggg ccatccggga atttttgttc cagcagctgg gaatgttggt
 gtcctttgtg aagagccaca tcagacctta tatggatgaa atagtcaccc tcatgagaga
 attctgggtc atgaacacct caattcagag cagatcatt cttctcattg agcaaattgt
 ggtagctctt ggggggtgaat ttaagctcta cctgccccag ctgatccac acatgctgag
 tgtcttcatg catgacaaca gcccaggccg cattgtctct atcaagttac tggctgcaat
 ccagctgttt ggcgccaacc tggatgacta cctgcattta ctgctgcctc ctattgttaa
 gttgtttgat gcccctgaag ctccactgcc atctcgaaag gcagcgctag agactgtgga
 ccgcctgacg ggtcccttg atttcaactga ctatgcctcc cggatcattc accctattgt
 tcgaacactg gaccagagcc cagaactgcg ctccacagcc atggacacgc tgtcttcaact
 tgtttttcag ctggggaaga agtaccaaat tttcattcca atggatgaata agttctgtgt
 gcgacaccga atcaatcatc agcgctatga tgtgctcatc tgcagaattg tcaagggata
 cacacttgct gatgaagagg aggatccttt gatttaccag catcgatgc ttaggagtg
 ccaaggggat gcattggcta gtggaccagt ggaaacagga cccatgaaga aactgcacgt

10

20

30

40

50

cagcaccatc aacctccaaa aggcctgggg cgctgccagg agggctctcca aagatgactg
 gctggaatgg ctgagacggc tgagcctgga gctgctgaag gactcatcat cgccctccct
 gcgctcctgc tgggccctgg cacaggccta caaccgatg gccagggatc tcttcaatgc
 tgcatttgtg tcctgctggt ctgaactgaa tgaagatcaa caggatgagc tcatcagaag
 catcgagttg gccctcacct cacaagacat cgctgaagtc acacagaccc tcttaaaactt
 ggctgaattc atggaacaca gtgacaaggg cccctgcca ctgagagatg acaatggcat
 tgttctgctg ggtgagagag ctgccaagtg ccgagcatat gccaaagcac tacactacaa
 agaactggag ttccagaaaag gccccacccc tgccattcta gaatctctca tcagcattaa
 taataagcta cagcagccgg aggcagcggc cggagtgtta gaatatgcc a gaaacactt
 tggagagctg gagatccagg ctacctggta tgagaaactg cacgagtggg aggatgccct
 tgtggcctat gacaagaaaa tggacaccaa caaggacgac ccagagctga tgctgggccg
 catgcgctgc ctcgaggcct tgggggaatg gggcaactc caccagcagt gctgtgaaaa
 gtggaccctg gttaatgatg agaccaagc caagatggcc cggatggctg ctgcagctgc
 atgggggttta ggtcagtggg acagcatgga agaatacacc tgtatgatcc ctcgggacac
 ccatgatggg gcattttata gagctgtgct ggcaactgcat caggacctct tctccttggc
 acaacagtgc attgacaagg ccaggacact gctggatgct gaattaaactg cgatggcagg
 agagagtta acgtcggcat atggggccat ggtttcttgc cacatgctgt ccgagctgga
 ggaggttatc cagtacaaac ttgtccccga gcgacgagag atcatccgcc agatctggtg
 ggagagactg cagggctgcc agcgtatcgt agaggactgg cagaaaatcc ttatggtgcg
 gtcccttgtg gtcagccctc atgaagacat gagaacctgg ctcaagtatg caagcctgtg
 cggcaagagt ggcaggctgg ctcttgctca taaaacttta gtgttgctcc tgggagttga
 tccgtctcgg caacttgacc atcctctgcc aacagttcac cctcaggtga cctatgccta
 catgaaaaac atgtggaaga gtgcccga gatcgatgcc ttccagcaca tgcagcattt
 tgtccagacc atgcagcaac aggccagca tgccatcgt actgaggacc agcagcataa
 gcaggaactg cacaagctca tggcccgatg cttcctgaaa cttggagagt ggcagctgaa
 tctacagggc atcaatgaga gcacaatccc caaagtgtg cagtactaca gcgccgccac
 agagcacgac cgcagctggt acaaggcctg gcatgcgtgg gcagtatga acttcgaagc
 tgtgctacac tacaaacatc agaaccaagc ccgcatgag aagaagaaac tgcgtcatgc
 cagcggggcc aacatcacca acgccaccac tgccgccacc acggccgcca ctgccaccac
 cactgccagc accgagggca gcaacagtga gagcgaggcc gagagcaccg agaacagccc
 caccocatcg ccgctgcaga agaaggctcac tgaggatctg tccaaaaccc tctgatgta
 cacggtgcct gccgtccagg gcttcttccg ttccatctcc ttgtcacgag gcaacaacct
 ccaggataca ctcagagttc tcaccttatg gtttgattat ggtcactggc cagatgtcaa
 tgaggcctta gtggaggggg tgaaagccat ccagattgat acctggctac aggttatacc
 tcagctcatt gcaagaattg atacgccag acccttgggtg ggacgtctca ttcaccagct
 tctcacagac attggctcgg accaccccga ggccctcatc taccactga cagtggcttc
 taagtctacc acgacagccc ggcacaatgc agccaacaag attctgaaga acatgtgtga
 gcacagcaac accctgggtc agcaggccat gatggtgagc gaggagctga tccagtggtc
 catcctctgg catgagatgt ggcataagg cctggaagag gcatctcgtt tgtactttgg
 ggaaaggaac gtgaaaggca tgtttgaggt gctggagccc ttgcatgcta tgatggaacg

10

20

30

40

50

gggcccccag actctgaagg aaacatcctt taatcaggcc tatggtcgag atttaatgga
 ggcccaagag tgggtgcagga agtacatgaa atcagggaat gtcaaggacc tcacccaagc
 ctgggacctc tattatcatg tgttccgacg aatctcaaag cagctgcctc agctcacatc
 cttagagctg caatatgttt ccccaaaact tctgatgtgc cgggaccttg aattggctgt
 gccaggaaca tatgacccca accagccaat cattcgcatc cagtccatag caccgtcttt
 gcaagtcac acatccaagc agaggccccg gaaattgaca cttatgggca gcaacggaca
 tgagtttgtt ttctttctaa aaggccatga agatctgcgc caggatgagc gtgtgatgca
 gctcttcggc ctggttaaca cccttctggc caatgaccca acatctcttc ggaaaaacct
 cagcatccag agatacgtg tcatcccttt atcgaccaac tcgggcctca ttggctgggt
 tccccactgt gacacactgc acgccctcat ccgggactac agggagaaga agaagatcct
 tctcaacatc gagcatcgca tcatgttgcg gatggctccg gactatgacc acttgactct
 gatgcagaag gtggagggtg ttgagcatgc cgtcaataat acagctgggg acgacctggc
 caagctgctg tggctgaaaa gcccagctc cgagggtgtg tttgaccgaa gaaccaatta
 taccggttct ttagcgggtca tgtcaatggg tgggtatatatt ttaggcctgg gagatagaca
 cccatccaac ctgatgctgg accgtctgag tgggaagatc ctgcacattg actttgggga
 ctgctttgag gttgctatga cccgagagaa gtttccagag aagattccat ttagactaac
 aagaatgttg accaatgcta tggagggttac aggcctggat ggcaactaca gaatcacatg
 ccacacagtg atggagggtg tgcgagagca caaggacagt gtcattggccg tgctggaagc
 ctttgtctat gaccccttgc tgaactggag gctgatggac acaaatacca aaggcaacaa
 gcgatcccga acgaggacgg attcctactc tgctggccag tcagtcgaaa ttttggacgg
 tgtggaactt ggagagccag ccataagaa aacggggacc acagtgccag aatctattca
 ttctttcatt ggagacgggt tggtgaaaacc agaggcccta aataagaaag ctatccagat
 tattaacagg gttcgagata agctcactgg tcgggacttc tctcatgatg acactttgga
 tgttccaacg caagttgagc tgctcatcaa acaagcgaca tcccatgaaa acctctgcca
 gtgctatatatt ggctgggtgcc ctttctggta a

10

20

【 0 1 8 8 】

S R E B P 1の発現レベルを決定するために使用することができる市販の**E L I S A**アッセイの非限定的な例は、**N o v u s B i o l o g i c a l s**および**A b c a m**から入手可能である。成熟ヒト**S R E B P 1**のタンパク質および**c D N A**配列を、以下に示す。成熟ヒト**S R E B P 1**タンパク質（配列番号67）

30

40

50

MDEPPFSEAALEQALGEPCLDAALLTDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPPYAGSG
AGGTDPA SPDTSSPGSLSPPPATLSSSLEAFLSGPQAAPSPLSPPQPAPTPLKMYPS
MPAFSPGPGIKEESVPLSILQTPTPQPLPGALLPQSFPAPAPPQFSSTPVLGYPSPPG
GFSTGSPPGNTQQPLPGLPLASPPGVPPVSLHTQVQSVVPQQLLTVTAAPTAAPV
TTTVTSQIQQVPVLLQPHFIKADSLLLTAMKTDGATVKAAGLSPLVSGTTVQTGP
LPTLVSGGTILATVPLVVD AEKLPINRLAAGSKAPASAQSRGEKRTAHNAIEKRY
RSSINDKIIELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRFLQHSNQKLKQENLSLRTAV
HKSLSLKDLVSACGSGGNTDVLMEGVKTEVEDTLTPPPSDAGSPFQSSPLSLGSR
GSGSGSGSGSDSEPDSPVFEDSKAKPEQRPSLHSRGM LDRSRLALCTLVFLCLSCN
PLASLLGARGLPSPSDTTSVYHSPGRNVLGTESRDGPGWAQWLLPPVWVLLNGL
LVLVSLVLLFVYGEPTVRPHSGPAVYFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLA
LRALGRPLPTSHLDLACSLWNLIRHLLQRLWVGRWLAGRAGGLQQDCALRVD
ASASARDAALVYHKLHQLHTMGKHTGGHLTATNLALSALNLAECAGDAVSVA
TLAEIYVAAALRVKTS LPRALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPPAMQWLCHPV
GHRFFVDGDWSVLSTPWESLYSLAGNPVDPLAQVTQLFREHLLERALNCVTQPN
PSPGSADGDKEFSDALGYLQLLNSCSDAAGAPAYSFSISSMATTTGVDPVAKW
WASLTAVVIHWLRRDEEAAERLCPLVEHLPRVLQESERPLPRAALHSFKAARAL
LGCAKAESGPASLTICEKASGYLQDSLATTPASSSIDKAVQLFLCDLLL VVRTSL
WRQQPPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRDLSSLRRLAQSRPAMRRVFLH
EATARLMAGASPTRTHQLLDRSLRRRAGPGGKGGAVAELEPRPTRREHAEALLL
ASCYLPPGFLSAPGQRVGMLAEAAARTLEKLGDRRL LHDCQQMLMRLGGGTTVT
SS

10

20

30

ヒトSREBP1 cDNA (配列番号68)

atggacgagccacccttcagcgaggcggcctttggagcaggcgctgggcga
gccgtgcatctggacgcggcgctgctgaccgacatcgaagacatgcttc
agcttatcaacaaccaagacagtgaacttccctggcctat ttgacccaccc
tatgctgggagtggggcagggggcacagaccctgccagccccgataccag
ctccccaggcagcttgtctccacctcctgccacattgagctcctctcttg
aagccttcctgagcgggcccgcaggcagcgccctcaccctgtccccctccc
cagcctgcacccactccattgaagatgtaccgctccatgcccgctttctc
ccctgggcctggtatcaaggaagagtcagtgccactgagcatcctgcaga
ccccacccccacagcccctgccaggggcccctcctgccacagagcttcca
gccccagccccaccgcagttcagctccacccctgtgttaggctacccag
ccctccgggaggcttctctacaggaagccctcccgggaacacccagcagc
cgctgcctggcctgccactggcttccccgccaggggtcccgcctctcc
ttgcacacccaggtccagagtgtggtccccagcagctactgacagtcac
agctgccccacggcagcccctgtaacgaccactgtgacctgcagatcc
agcaggtcccggctcctgctgcagccccacttcatcaaggcagactcgctg
cttctgacagccatgaagacagacggagccactgtgaaggcggcaggtct
cagtcccctggtctctggcaccactgtgcagacagggcctttgccgaccc
tggtgagtgggcgaaccatcttggaacagtcccactggctcgtagatgcg

40

50

gagaagctgcctatcaaccggctcgcagctggcagcaaggccccggcctc
tgccagagccgtggagagaagcgcacagcccacaacgccattgagaagc
gctaccgctcctccatcaatgacaaaatcattgagctcaaggatctggtg
gtgggcactgaggcaaagctgaataaatctgctgtcttgcgcaaggccat
cgactacattcgctttctgcaacacagcaaccagaaaactcaagcaggaga
acctaagtctgcgactgctgtccacaaaagcaaatctctgaaggatctg
gtgtcggcctgtggcagtgagggaacacagacgtgctcatggaggggcgt
gaagactgagggtggaggacacactgacccccccccctcggtgctggct
cacctttccagagcagcccccttgctcccttggcagcaggggcagtggcagc
ggtggcagtgaggcagtgactcggagcctgacagcccagtcctttgaggacag
caaggcaaagccagagcagcggccgtctctgcacagccggggcatgctgg
accgctcccgctggccctgtgcacgctcgtcttccctctgcctgtcctgc
aacccttgccctccttgctgggggccccgggggcttccagccccctcaga
taccaccagcgtctaccatagccctgggcgcaacgtgctgggcaccgaga
gcagagatggccctggctgggcccagtggtgctgccccagtggtctgg
ctgctcaatgggctggttggtgctcgtctccttggtgcttctctttgtcta
cgggtgagccagtcacacggccccactcaggccccgcgtgtacttctgga
ggcatcgcaagcaggctgacctggacctggccggggagactttgccag
gctgcccagcagctgtggctggccctgcgggcactgggcccggccccctgcc
cacctcccacctggacctggcttgtagcctcctctggaacctcatcgtc
acctgctgcagcgtctctgggtgggcgctggctggcaggccgggcaggg
ggcctgcagcaggactgtgctctgcagtggtgctagcgcagcgcgcg
agacgcagccctggtctaccataagctgcaccagctgcacaccatgggga
agcacacaggcgggcacctcactgccaccaacctggcgctgagtgcctg
aacctggcagagtgtgcaggggatgccgtgtctgtggcgacgtggcgga
gatctatgtggcggtgcattgagagtgaagaccagtcctccacgggcct
tgcattttctgcacgcttcttccctgagcagtgcccgcaggcctgctg
gcacagagtggctcagtgccctcctgcatgcagtggtctgcccaccgct
gggcccaccgtttcttctggtggatggggactggtccgtgctcagtacccat
gggagagcctgtacagcttgcccggaacccagtggaacccctggcccag
gtgactcagctattccgggaacatctcttagagcgagcactgaactgtgt
gaccagcccaaccccagccctgggtcagctgatggggacaaggaattct
cggatgccctcgggtacctgcagctgctgaacagctgttctgatgctgcg
ggggctcctgcctacagcttctccatcagttccagcatggccaccaccac
cggcgtagaccgggtggccaagtgggtgggcctctctgacagctgtggtga
tccactggctgcggcgggatgaggaggcggctgagcggctgtgcccgtg
gtggagcacctgccccgggtgctgcaggagtctgagagacccctgccag
ggcagctctgcactccttcaaggctgcccgggccccctgctgggtgtgcca
aggcagagtctgggtccagccagcctgacctctgtgagaaggccagtggg
tacctgcaggacagcctggctaccacaccagccagcagctccattgacaa
ggcgtgcagctgttctctgtgtgacctgcttcttgggtgctgcaccagcc
tgtggcggcagcagcagcccccgccccggccccagcagcccagggcacc
agcagcaggccccaggcttccgccccttgagctgcgtggcttccaacggga
cctgagcagcctgaggcggctggcacagagcttccggccccgcatgcgga
gggtgttctacatgaggccacggccccggctgatggcgggggccagcccc
acacggacacaccagctcctcgaccgcagctctgaggcggcgggcaggccc
cgggtggcaaaggaggcggctggcgagctggagccgcggccacgcggc
gggagcacgcggaggccttgctgctggcctcctgctacctgcccccggc
ttcctgtcggcgccccgggcagcgcgtgggcagctggtgaggcggcgcg
cacactcgagaagcttgccgatgcgggtgctgcacgactgtcagcaga
tgctcatgcgcctgggcgggtgggaccactgtcacttccagctag

10

20

30

40

【 0 1 8 9 】

IFN- γ の発現レベルを決定するために使用することができる市販の ELISA アッセイの非限定的な例は、R & D Systems、Thermo Fisher Scientific、Abcam、Enzo Life Sciences、および RayBio tech から入手可能である。成熟ヒト IFN- γ のタンパク質および cDNA 配列を、以下に示す。

成熟ヒト IFN- γ (配列番号 69)

qdpvyke aenlkkyfna ghsvdvngrt lflgilknwk eesdrkimqs qivsfyfkflf
knfkddqsiq ksvetikedm nvkffnsnkk krddfeklt n ysvtdlnvqr kaiheliquvm
aelspaaktg krkrsqmlfr g

ヒトIFN- γ cDNA (配列番号70)

caggac ccatatgtaa aagaagcaga aaaccttaag aaatatttta atgcagggtca
ttcagatgta gcggataatg gaactctttt cttaggcatt ttgaagaatt ggaaagagga
gagtgcacaga aaaataatgc agagccaaat tgtctccttt tacttcaaac tttttaaaaa
ctttaaagat gaccagagca tccaaaagag tgtggagacc atcaaggaag acatgaatgt
caagtttttc aatagcaaca aaaagaaacg agatgacttc gaaaagctga ctaattattc
ggtaactgac ttgaatgtcc aacgcaaagc aatacatgaa ctcatccaag tgatggctga
actgtcgcca gcagctaaaa cagggaagcg aaaaaggagt cagatgctgt ttcgagggt

10

【0190】

グランザイムBの発現レベルを決定するために使用できる市販のELISAアッセイの非限定的な例は、Ray Biotech、Thermo Fisher Scientific、およびR&D Systemsから入手可能である。成熟ヒトグランザイムBのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

成熟ヒトグランザイムB (配列番号71)

iiggheakph srpymaylmi wdqkslkrcc gflirddfv l taahcw gssi nvtlgahnk
eqeptqqfip vkrpipphpay npknfsndim llqlerkakr travqplrlp snkaqv kpgg
tcsvagwgqt aplgkhshtl qevkmtvqed rkcesdlrhy ydstielcv g dpeikktsfk
gdsggplvcn kvaqgivsyg rnnmmpprac tkvssfvhwi kktmkry

20

ヒトグランザイムB cDNA (配列番号72)

atcatcgagg gacatgaggg caagccccac tcccgcccct acatggctta tcttatgatc
tgggatcaga agtctctgaa gaggtgcggg ggcttcctga tacgagacga ctctgtgctg
acagctgctc actgttgggg aagctccata aatgtcacct tggggggccca caatatcaaa
gaacaggagc cgacccagca gtttatccct gtgaaaagac ccatccccca tccagcctat
aatcctaaga acttctccaa cgacatcatg ctactgcagc tggagagaaa ggccaagcgg
accagagctg tgcagcccct caggctacct agcaacaagg cccagggtga gccagggcag
acatgcagtg tggccggctg ggggcagacg gcccccttg gaaaacactc acacacacta
caagaggtga agatgacagt gcaggaagat cgaaagtgcg aatctgactt acgccattat
tacgacagta ccattgagtt gtgcgtgggg gaccagaga ttaaaaagac ttcctttaag
ggggactctg gaggccctct tgtgtgtaac aaggtggccc agggcattgt ctctatgga
cgaaacaatg gcatgcctcc acgagcctgc accaaagtct caagctttgt aactgggata
aagaaaacca tgaaacgcta c

30

40

【0191】

MYCの発現レベルを決定するために使用することができる市販のELISAアッセイの非限定的な例は、Invitrogen、LSBio、Biocodon Technologies、およびElisaGenieから入手可能である。成熟ヒトMYCのタンパク質およびcDNA配列を、以下に示す。

ヒトMy cタンパク質 (配列番号329)

50

mdffrvvenq qppatmplnv sftnrnydld ydsvqpyfyc deeenfyqqq qqselqppap
 sediwwkfel lptpplspsr rsglcspysv avtpfslrgd ndggggsfst adqlemvtel
 lggdmvnqsf icdpddetfi kniiiqdcmw sgfsaaaaklv seklasyqaa rkdsqspnpa
 rghsvctss lylqdlstaaa secidpsvfv pyplndsssp kscasqdssa fspssdslls
 stesspqgsp eplvlheetp pttssdseee qedeeeidvv svekrqapgk rsesgspasg
 ghskpphspl vlkrchvsth qhnyaaappst rkdyapaakrv kldsvrvlrq isnnrkctsp
 rssidteenvk rrthnvlerq rnelkrsff alrdqipele nnekapkvvi lkkatayils
 vqaeekqlis eedllrkrre qlkhkleqlr nsca

10

ヒトMy c cDNA (配列番号330)

ctggatt tttttcgggt agtggaaaac cagcagcctc ccgcgacgat gcccctcaac
 gttagcttca ccaacaggaa ctatgacctc gactacgact cgggtgcagcc gtattttctac
 tgcgacgagg aggagaactt ctaccagcag cagcagcaga gcgagctgca gcccccgccg
 ccagcgagg atatctggaa gaaattcgag ctgctgcca ccccgcccct gtcccctagc
 cgccgctccg ggctctgctc gccctcctac gttgcggtca cacccttctc ctttcgggga
 gacaacgacg gcggtggcgg gagcttctcc acggccgacc agctggagat ggtgaccgag
 ctgctgggag gagacatggt gaaccagagt ttcattctgcg acccgacga cgagaccttc
 atcaaaaaca tcatcatcca ggactgtatg tggagcggct tctcgccgc gcceaagctc
 gtctcagaga agctggcctc ctaccaggct gcgcgcaaag acagcggcag cccgaacccc
 gcccgccgcc acagcgtctg ctccacctcc agcttgtagc tgaggatct gagcgccgcc
 gcctcagagt gcatcgaccc ctcggtggtc tccccctacc ctctcaacga cagcagctcg
 cccaagtcct gcgcctcgca agactccagc gccttctctc cgtcctcgga ttctctgctc
 tcctcgacgg agtcctcccc gcagggcagc cccgagcccc tgggtgctca tgaggagaca
 ccgcccacca ccagcagcga ctctgaggag gaacaagaag atgaggaaga aatcgatggt
 gtttctgtgg aaaagaggca ggctcctggc aaaaggtcag agtctggatc accttctgct
 ggaggccaca gcaaacctcc tcacagccca ctggctcctca agaggtgcca cgtctccaca
 catcagcaca actacgcagc gcctccctcc actcggaagg actatcctgc tgccaagagg
 gtcaagttgg acagtgtcag agtcctgaga cagatcagca acaaccgaaa atgcaccagc
 cccaggtcct cggacaccga ggagaatgtc aagaggcgaa cacacaacgt cttggagcgc
 cagaggagga acgagctaaa acggagcttt tttgccctgc gtgaccagat cccggagttg
 gaaaacaatg aaaaggcccc caaggtagtt atccttaaaa aagccacagc atacatcctg
 tccgtccaag cagaggagca aaagctcatt tctgaagagg acttggtgag gaaacgacga
 gaacagttga aacacaaact tgaacagcta cggaactcct gtgcgtaa

20

30

【0192】

40

いくつかの実施形態では、活性化されたNK細胞（例えば、ヒト活性化されたNK細胞）は、対象（例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれか）において、またはインビトロで老化細胞（例えば、本明細書に記載の老化細胞のうちのいずれか）を死滅させる能力の増加（例えば、少なくとも10%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも100%の増加、少なくとも120%の増加、少なくとも140%の増加、少なくとも160%の増加、少なくとも180%の増加、少なくとも200%の増加、少なくとも220%の増加、少なくとも240%の増加、少なくとも260%の増加、少なくとも280%の増加、または少なくとも300%の増加）を示し得る（休止NK細胞（例えば、

50

ヒト休止NK細胞)と比較して)。

【0193】

いくつかの実施形態では、活性化されたNK細胞(例えば、ヒト活性化されたNK細胞)は、対象(例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれか)における、またはインビボでの老化細胞(例えば、本明細書に記載の老化細胞のうちのいずれか)を死滅させる能力の約10%の増加～約500%の増加(または本明細書に記載のこの範囲の部分的範囲のうちのいずれか)を示し得る(休止NK細胞(例えば、ヒト休止NK細胞)と比較して)。

【0194】

いくつかの実施形態では、活性化されたNK細胞(例えば、ヒト活性化されたNK細胞)は、老化または標的細胞に存在する抗原に特異的に結合する抗体の存在下で、接触一細胞傷害性アッセイにおいて、増加(例えば、少なくとも10%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも100%の増加、少なくとも120%の増加、少なくとも140%の増加、少なくとも160%の増加、少なくとも180%の増加、少なくとも200%の増加、少なくとも220%の増加、少なくとも240%の増加、少なくとも260%の増加、少なくとも280%の増加、または少なくとも300%の増加)の細胞傷害性活性を示し得る(例えば、休止NK細胞(例えば、ヒト休止NK細胞)と比較して)。

【0195】

いくつかの実施形態では、活性化されたNK細胞(例えば、ヒト活性化されたNK細胞)は、例えば、休止NK細胞(例えば、ヒト休止NK細胞)と比較して、老化または標的細胞に存在する抗原に特異的に結合する抗体の存在下で、接触一細胞傷害性アッセイにおいて、増加(例えば、少なくとも10%の増加～約500%の増加、または本明細書に記載のこの範囲の部分的範囲のうちのいずれか)の細胞傷害性活性を示し得る。

【0196】

いくつかの実施形態は、活性化されたNK細胞は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることを含む方法によって産生され得る。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、ハプロタイプ一致の休止NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。これらの方法のいずれかのいくつかの例では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。

【0197】

これらの方法のいくつかの例では、液体培養培地は、無血清液体培養培地である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、液体培養培地は、化学的に定義された液体培養培地である。これらの方法のいくつかの例は、活性化されたNK細胞を単離すること(および任意選択で、活性化されたNK細胞の治療有効量を、対象、例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれかにさらに投与すること)をさらに含む。

【0198】

これらの方法のいくつかの実施形態では、接触ステップは、約2時間～約20日(例えば、約2時間～約18日、約2時間～約16日、約2時間～約14日、約2時間～約12日、約2時間～約10日、約2時間～約8日、約2時間～約7日、約2時間～約6日、約2時間～約5日、約2時間～約4日、約2時間～約3日、約2時間～約2日、約2時間～約1日、約6時間～約18日、約6時間～約16日、約6時間～約14日、約6時間～約12日、約6時間～約10日、約6時間～約8日、約6時間～約7日、約6時間～約6日

10

20

30

40

50

、約6時間～約5日、約6時間～約4日、約6時間～約3日、約6時間～約2日、約6時間～約1日、約12時間～約18日、約12時間～約16日、約12時間～約14日、約12時間～約12日、約12時間～約10日、約12時間～約8日、約12時間～約7日、約12時間～約6日、約12時間～約5日、約12時間～約4日、約12時間～約3日、約12時間～約2日、約12時間～約1日、約1日～約18日、約1日～約16日、約1日～約15日、約1日～約14日、約1日～約12日、約1日～約10日、約1日～約8日、約1日～約7日、約1日～約6日、約1日～約5日、約1日～約4日、約1日～約3日、約1日～約2日、約2日～約18日、約2日～約16日、約2日～約14日、約2日～約12日、約2日～約10日、約2日～約8日、約2日～約7日、約2日～約6日、約2日～約5日、約2日～約4日、約2日～約3日、約3日～約18日、約3日～約16日、約3日～約14日、約3日～約12日、約3日～約10日、約3日～約8日、約3日～約7日、約3日～約6日、約3日～約5日、約3日～約4日、約4日～約18日、約4日～約16日、約4日～約14日、約4日～約12日、約4日～約10日、約4日～約8日、約4日～約7日、約4日～約6日、約4日～約5日、約5日～約18日、約5日～約16日、約5日～約14日、約5日～約12日、約5日～約10日、約5日～約8日、約5日～約7日、約5日～約6日、約6日～約18日、約6日～約16日、約6日～約14日、約6日～約12日、約6日～約10日、約6日～約8日、約6日～約7日、約7日～約18日、約7日～約16日、約7日～約14日、約7日～約12日、約7日～約10日、約7日～約8日、約8日～約18日、約8日～約16日、約8日～約14日、約8日～約12日、約8日～約10日、約9日～約18日、約9日～約16日、約9日～約14日、約9日～約12日、約12日～約18日、約12日～約16日、約12日～約14日、約14日～約18日、約14日～約16日、または約16日～約18日、の期間にわたって実施される。

【0199】

NK細胞活性化物質

1つ以上のNK細胞活性化物質の使用または投与を含む方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、NK細胞活性化物質は、タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、NK細胞活性化物質は、一本鎖キメラポリペプチド（例えば、本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれか）、多鎖キメラポリペプチド（例えば、本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれか、例えば、本明細書に記載の例示的なタイプAおよびタイプB多鎖キメラポリペプチド）、抗体、組換えサイトカインまたはインターロイキン（例えば、本明細書に記載の組換えサイトカインまたはインターロイキンのうちのいずれか）、および可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体（例えば、本明細書に記載の可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体のうちのいずれか）であり得る。いくつかの実施形態では、NK細胞活性化物質は、小分子（例えば、グリコゲン合成酵素キナーゼ-3（GSK3）阻害剤、例えば、Cichocki et al., Cancer Res. 77:5664-5675, 2017に記載されるようなCHIR99021）、またはアプタマーであり得る。

【0200】

本明細書に提供される1つ以上のNK細胞活性化物質のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、1つ以上のNK細胞活性化物質の不在下で、活性化のレベルと比較して、IL-2受容体、IL-7受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、IL-33受容体、CD16、CD69、CD25、CD59、CD352、Nkp80、DNAM-1、2B4、Nkp30、Nkp44、Nkp46、NKG2D、KIR2DS1、KIR2DS2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、およびKIR3DS1（例えば、免疫細胞、例えば、ヒト免疫細胞、例えば、ヒトNK細胞において）のうちの1つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つ）の活性化をもたらす。

【0201】

いくつかの実施形態では、IL-2受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性IL-2またはIL-2受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0202】

いくつかの実施形態では、IL-7受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性IL-7またはIL-7受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0203】

いくつかの実施形態では、IL-12受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性IL-12またはIL-12受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0204】

いくつかの実施形態では、IL-15受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性IL-15またはIL-15受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0205】

いくつかの実施形態では、IL-21受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性IL-21またはIL-21受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0206】

いくつかの実施形態では、IL-33受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性IL-33またはIL-33受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0207】

いくつかの実施形態では、CD16の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD16に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0208】

いくつかの実施形態では、CD69の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD69に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0209】

いくつかの実施形態では、CD25、CD59の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD25、CD59に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0210】

いくつかの実施形態では、CD352の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD352に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0211】

いくつかの実施形態では、NKP80の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKP80に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0212】

いくつかの実施形態では、DNAM-1の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、DNAM-1に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0213】

いくつかの実施形態では、2B4の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、2B4に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0214】

いくつかの実施形態では、NKP30の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKP30に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0215】

いくつかの実施形態では、NKP44の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物

10

20

30

40

50

質のうちの少なくとも1つは、NKp44に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0216】

いくつかの実施形態では、NKp46の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKp46に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0217】

いくつかの実施形態では、NKG2Dの活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKG2Dに特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0218】

いくつかの実施形態では、KIR2DS1の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DS1に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

10

【0219】

いくつかの実施形態では、KIR2DS2/3の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DS2/3に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0220】

いくつかの実施形態では、KIR2DL4の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DL4に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0221】

いくつかの実施形態では、KIR2DS4の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DS4に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

20

【0222】

いくつかの実施形態では、KIR2DS5の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DS5に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

【0223】

いくつかの実施形態では、KIR3DS1の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR3DS1に特異的に結合するアゴニスト抗体である。

30

【0224】

本明細書に提供される1つ以上のNK細胞活性化物質のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つ（例えば、2つ、3つ、4つ、または5つ）は、1つ以上のNK細胞活性化物質の不在下で、活性化レベルと比較して、PD-1、TGF-β受容体、TIGIT、CD1、TIM-3、Siglec-7、IRP60、Tactile、IL1R8、NKG2A/KLRD1、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL5、KIR3DL1、KIR3DL2、ILT2/LIR-1、およびLAG-2（例えば、免疫細胞、例えば、ヒト免疫細胞、例えば、ヒトNK細胞において）のうちの1つ以上の活性化の減少をもたらす。

40

【0225】

いくつかの実施形態では、TGF-β受容体の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、可溶性TGF-β受容体、TGF-βに特異的に結合する抗体、またはTGF-β受容体に特異的に結合するアンタゴニスト抗体である。

【0226】

いくつかの実施形態では、TIGITの活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、TIGITに特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性TIGIT、またはTIGITのリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0227】

50

いくつかの実施形態では、CD1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、CD1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性CD1、またはCD1のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0228】

いくつかの実施形態では、TIM-3の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、TIM-3に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性TIM-3、またはTIM-3のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0229】

いくつかの実施形態では、Siglec-7の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、Siglec-7に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性Siglec-7、またはSiglec-7のリガンドに特異的に結合する抗体である。

10

【0230】

いくつかの実施形態では、IRP-60の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IRP-60に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性IRP-60、またはIRP-60のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0231】

いくつかの実施形態では、Tactileの活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、Tactileに特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性Tactile、またはTactileのリガンドに特異的に結合する抗体である。

20

【0232】

いくつかの実施形態では、IL1R8の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、IL1R8に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性IL1R8、またはIL1R8のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0233】

いくつかの実施形態では、NKG2A/KLRD1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、NKG2A/KLRD1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性NKG2A/KLRD1、またはNKG2A/KLRD1のリガンドに特異的に結合する抗体である。

30

【0234】

いくつかの実施形態では、KIR2DL1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DL1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性KIR2DL1、またはKIR2DL1のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0235】

いくつかの実施形態では、KIR2DL2/3の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DL2/3に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性KIR2DL2/3、またはKIR2DL2/3のリガンドに特異的に結合する抗体である。

40

【0236】

いくつかの実施形態では、KIR2DL5の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR2DL5に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性KIR2DL5、またはKIR2DL5のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0237】

いくつかの実施形態では、KIR3DL1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR3DL1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性KIR3DL1、またはKIR3DL1のリガンドに特異的に結合する

50

抗体である。

【0238】

いくつかの実施形態では、KIR3DL2の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、KIR3DL2に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性KIR3DL2、またはKIR3DL2のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0239】

いくつかの実施形態では、ILT2/LIR-1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、ILT2/LIR-1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性ILT2/LIR-1、またはILT2/LIR-1のリガンドに特異的に結合する抗体である。

10

【0240】

いくつかの実施形態では、LAG2の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つは、LAG2に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性LAG2、またはLAG2のリガンドに特異的に結合する抗体である。

【0241】

NK細胞活性化物質の非限定的な例を、以下に説明し、任意の組み合わせで 사용할 ことができる。

【0242】

いくつかの例では、NK細胞活性化物質は、可溶性PD-1、可溶性PD-L1、可溶性TIGIT、可溶性CD1、または可溶性TIM-3であり得る。可溶性PD-1、PD-L1、TIGIT、CD1、およびTIM-3の非限定的な例を、以下に示す。

20

ヒト可溶性PD-1（配列番号73）

```
pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtgedna tftcsfsnts esfvlnwyr  
m  
spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pngdrdfhmsv vrarrndsgt  
ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpaggfqtlt  
vgvvggllgs lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs  
vdygeldfqw rektpeppvp cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg  
prsaqplrpe dghcswpl
```

30

ヒト可溶性PD-L1（配列番号74）

```
ftvtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl aalivyweme dkniiqfvhg  
eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag vyrcmisygg  
adykritkvk napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts  
dhqvlsgktt ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frldpeenh  
taelvipep lahppnerth lvilgaillc lgvaltfifr lrkgrmmdvk  
kcgiaqdtnsk kqsdtthleet
```

40

ヒト可溶性TIGIT（配列番号75）

```
mmgtgtiett gnisaekggs iilqchlsst taqvtqvnwe qdqllaicn  
adlgwhisps fkdrvapggp lgltlqsltv ndtgeyfcy htypdgtytg  
riflevless vaehgarfqi pllgammaatl vvictavivv valtrkkkal  
rihsvegdlr rksagqeews psapsppgsc vqaeaapagl cgeqrgedca  
elhdyfnvls yrslgnscsff tetg
```

50

ヒト可溶性CD1A（配列番号76）

nadglkepls fhvt wiasfynhsw kqnlvsgwls dlqthtwsdn sstivflcpw
srgnfsneew keletlfrir tirsfegirr yahelqfeyp feiqvtggce
lhsgkvsgsf lqlayqgsdf vsfqnnswlp ypvagnmakh fckvlnqnqh
endithnlls dtcprfilgl ldagkahlqr qvkpeawlsh gpspgpghlq
lvchvsgfyp kpvwvmwmrg eqeqqgtqrg dilpsadgtw ylratilevaa
geaadlscrsv khsslegqdi vlywehhssv gfiilavivp lllliglalw
frkrcfc

10

ヒト可溶性TIM3（配列番号77）

seveyraev gqnaylpcfy tpaapgnlvp vewgkgacpv fecgnvvlrt
derdvnywts rywlngdfrk gdvsltienv tladsgiycc riqipgimnd
ekfnlklvik pakvtpaptr qrdftaafpr mlttrghgpa etqtlgslpd
inltqistla nelrdsrlan dlrdsгатir igiyigagic aglalalifg
alifkwyshts kekinqnsls slanlppsgl anavaegirs eeniytteen
vyeveepney ycyvssrqqp sqplgcrfam

20

【0243】

いくつかの実施形態では、可溶性PD-1タンパク質は、配列番号73と少なくとも80%同一、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一の配列を含み得る。

【0244】

いくつかの実施形態では、可溶性PD-L1タンパク質は、配列番号74と少なくとも80%同一、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一の配列を含み得る。

30

【0245】

いくつかの実施形態では、可溶性TIGITタンパク質は、配列番号75と少なくとも80%同一、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一の配列を含み得る。

40

【0246】

いくつかの実施形態では、可溶性CD1Aタンパク質は、配列番号76と少なくとも80%同一、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一の配列を含み得る。

【0247】

いくつかの実施形態では、可溶性TIM3タンパク質は、配列番号77と少なくとも80%同一、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同

50

一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一の配列を含み得る。

【0248】

組換え抗体

いくつかの例では、NK活性化剤は、IL-2受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Gaulton et al., *Clinical Immunology and Immunopathology* 36(1):18-29, 1985に記載されているものを参照）、IL-7受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体、IL-12受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Rogge et al., *J. Immunol.* 162(7):3926-3932, 1999に記載されているものを参照）、IL-15受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体、IL-21受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、米国特許出願公開第2006/159655号に記載されているものを参照）、IL-33受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、米国特許出願公開第2007/160579号に記載されているものを参照）、PD-1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体（例えば、米国特許出願公開第7,521,051号に記載されているものを参照）、PD-L1に特異的に結合する抗体（例えば、米国特許第8,217,149号に記載されているものを参照）、TGF- β 受容体に特異的に結合する抗体、TGF- β 受容体に特異的に結合するアンタゴニスト抗体（例えば、欧州特許出願公開第1245667 A1号に記載されているものを参照）、TIGITに特異的に結合するアンタゴニスト抗体（例えば、WO2017/053748に記載されているものを参照）、TIGITのリガンドに特異的に結合する抗体（例えば、WO2011/127324に記載されているものを参照）、CD1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体（例えば、Szalay et al., *J. Immunol.* 162(12):6955-6958, 1999に記載されているものを参照）、CD1のリガンドに特異的に結合する抗体（例えば、Kain et al., *Immunity* 41(4):543-554, 2014に記載されているものを参照）、TIM-3に特異的に結合するアンタゴニスト抗体（例えば、米国特許出願公開第2015/218274号に記載されているものを参照）、TIM-3のリガンドに特異的に結合する抗体（例えば、米国特許出願公開第2017/283499号に記載されているものを参照）、CD69に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Moretta et al., *Journal of Experimental Medicine* 174:1393, 1991に記載されているものを参照）、CD25、CD59に特異的に結合するアゴニスト抗体、CD352に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Yigit et al., *Oncotarget* 7:26346-26360, 2016に記載されているものを参照）、Nkp80に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Peipp et al., *Oncotarget* 6:32075-32088, 2015に記載されているものを参照）、DNAM-1に特異的に結合するアゴニスト抗体、2B4に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Sandusky et al., *European J. Immunol.* 36:3268-3276, 2006に記載されているものを参照）、Nkp30に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Kellner et al., *Onc Immunology* 5:1-12, 2016に記載されているものを参照）、Nkp44に特異的に結合するアゴニスト抗体、Nkp46に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Xiong et al., *J. Clin. Invest.* 123:4264-4272, 2013に記載されているものを参照）、NKG2Dに特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Kellner et al., *Onc Immunology* 5:1-12, 2016に記載されているものを参照）、KIR2DS1に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Xiong et al., *J. Clin. Invest.* 123:4264-4272, 2013に記載されているものを参照）、KIR2Ds2/3に特異的に結合するアゴニスト抗体（例えば、Borgerding et al., *Exp. Hematology* 38:213-221, 2010に記載されているものを参

10

20

30

40

50

照)、KIR2DL4に特異的に結合するアゴニスト抗体(例えば、Miah et al., J. Immunol. 180:2922-32, 2008に記載されているものを参照)、KIR2DS4に特異的に結合するアゴニスト抗体(例えば、Czaja et al., Genes and Immunity 15:33-37, 2014に記載されているものを参照)、KIR2DS5に特異的に結合するアゴニスト抗体(例えば、Czaja et al., Genes and Immunity 15:33-37, 2014に記載されているものを参照)、KIR3DS1に特異的に結合するアゴニスト抗体(例えば、Czaja et al., Genes and Immunity 15:33-37, 2014に記載されているものを参照)、Siglec-7に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、Hudak et al., Nature Chemical Biology 10:69-75, 2014に記載されているものを参照)、IRP60に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、Bachelet et al., J. Biol. Chem. 281:27190-27196, 2006に記載されているものを参照)、Tactileに特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、Brooks et al., Eur. J. Cancer 61(Suppl. 1):S189, 2016に記載されているものを参照)、IL1R8に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、Molgora et al., Frontiers Immunol. 7:1, 2016に記載されているものを参照)、NKG2A/KLRD1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、Kim et al., Infection Immunity 76:5873-5882, 2008に記載されているものを参照)、KIR2DL1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、Weiner et al., Cell 148:1081-1084, 2012に記載されているものを参照)、KIR2DL2/3に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、Weiner et al., Cell 148:1081-1084, 2012に記載されているものを参照)、KIR2DL5に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、US 9,067,997に記載されているものを参照)、およびKIR3DL1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、US 9,067,997に記載されているものを参照)、KIR3DL2に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、US 9,067,997に記載されているものを参照)、ILT2/LIR-1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体(例えば、US 8,133,485に記載されているものを参照)、およびLAG-2に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、であり得る。

【0249】

NK細胞活性化物質である組換え抗体は、例示的なタイプの抗体(例えば、ヒトまたはヒト化抗体)のうちのいずれか、または本明細書に記載の例示的な抗体断片のうちのいずれかであり得る。NK細胞活性化物質である組換え抗体は、例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメインのうちのいずれかを含むことができる。

【0250】

組換えインターロイキンまたはサイトカイン

いくつかの例では、NK活性化剤は、例えば、可溶性IL-2、可溶性IL-7、可溶性IL-12、可溶性IL-15、可溶性IL-21、および可溶性IL-33であり得る。可溶性IL-12、IL-15、IL-21、およびIL-33の非限定的な例を、以下に提供する。

ヒト可溶性IL-2(配列番号78)

```
aptssstkkt qlqlchllld lqmilnginn yknpkltrml tfkfymppkka  
telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse  
ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tlt
```

ヒト可溶性IL-7(配列番号79)

10

20

30

40

50

dcdiegkdgkqyesv lmvsidqlld smkeigsncl nnefnffkrh icdankegmf
lfraarklrq flkmnstgdf dlhlkvseg ttillnctgq vkgrkpaalg
eaqptkslee nkslkeqkkl ndlcflkrll geiktcwnki lmgtkch

ヒト可溶性ⅠＬ－１２サブユニットアルファ（配列番号８０）

rnlpvatp dpgmfpclhh sqnllravsn mlqkarqtle fypctseeid
heditkdks tveaclplel tknesclnsr etsfitngsc lasrktsfmm
alclssiyed lkmyqvefkt mnakllmdpk rqifldqnml avidelmqal
nfnsetvpqk ssleepdfyk tkiklcillh afriravtid rvmsylnas

10

ヒト可溶性ⅠＬ－１２サブユニットベータ（配列番号８１）

iwelkkdv yvveldwypd apgemvvltc dtpeedgitw tldqssevlq
sgktltiqvk efgdagqytc hkggevlshs llllhkkedg iwstdilkdq
kepknktflr ceaknysgrf tcwwlttist dltfsvkssr gssdpqgvtc
gaatlsaerv rgdnkeyeys vecqedsacp aaeeslpiev mvdavhklky
enytssffir diikpdppkn lqlkplknsr qvevsweypd twstphsyfs
ltfcvqvqgk skrekkdirvf tdktsatvic rknasisvra qdryysssww
ewasvpcs

20

ヒト可溶性ⅠＬ－１５（配列番号８２）

Nwvnvisdlkki edliqsmhid atlytesdvh psckvtamkc fllelqvisl
esgdasihdt venliilann slssngnvte sgckeceele eknikeflqs
fvhivqmfins ts

30

ヒト可溶性ⅠＬ－２１（配列番号８３）

qgqdrhmi rmrqlidivd qlknyvndlv peflpapedv etncewsafs
cfqkaqlksa ntgnneriin vsikklkrkp pstnagrrqk hrltcpscds
yekkppkefl erfksllqkm ihqhlssrth gseds

ヒト可溶性ⅠＬ－３３（配列番号８４）

mkpkmkystn kistakwknt askalcflg ksqqkakevc pmyfmklrsg
lmikkeacyf rrettkrpsl ktgrkhkrhl vlaacqqgst vecfafgisg
vqkytralhd ssitgispiet eylaslstyn dqsitfaled esyeiyvedl
kkdekdkvll lsyyesqhps nesgdgvdgk mlmvtlsptk dfwlhannke
hsvelhkcek plpdqaffvl hnmhsncvsf ecktdpgvfi gvkdnhlali
kvdssenlct enilfklset

40

【０２５１】

いくつかの実施形態では、可溶性ⅠＬ－２タンパク質は、配列番号７８と少なくとも８０％同一、少なくとも８２％同一、少なくとも８４％同一、少なくとも８６％同一、少なくとも８８％同一、少なくとも９０％同一、少なくとも９２％同一、少なくとも９４％同

50

一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列を含み得る。

【0252】

いくつかの実施形態では、可溶性 IL-7 タンパク質は、配列番号 79 と少なくとも 80% 同一、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列を含み得る。

【0253】

いくつかの実施形態では、可溶性 IL-2 タンパク質は、配列番号 80 と少なくとも 80% 同一、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列と、配列番号 81 と少なくとも 80% 同一、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列とを含む。

【0254】

いくつかの実施形態では、可溶性 IL-15 タンパク質は、配列番号 82 と少なくとも 80% 同一、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列を含み得る。

【0255】

いくつかの実施形態では、可溶性 IL-21 タンパク質は、配列番号 83 と少なくとも 80% 同一、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列を含み得る。

【0256】

いくつかの実施形態では、可溶性 IL-33 タンパク質は、配列番号 84 と少なくとも 80% 同一、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列を含み得る。

【0257】

可溶性サイトカインまたはインターロイキン受容体

本明細書に記載の可溶性サイトカインまたはインターロイキン受容体のうちのいずれかのいくつかの例では、可溶性サイトカインまたはインターロイキン受容体は、可溶性 TGF- β 受容体であり得る。いくつかの例では、可溶性 TGF- β 受容体は、可溶性 TGF- β 受容体 I (TGF- β RI) (例えば、Docagne et al., Journal of Biological Chemistry 276 (49): 46243-46250, 2001 に記載されているものを参照)、可溶性 TGF- β 受容体 II (TGF- β RII) (例えば、Yung et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 194 (9): 1140-1151, 2016 に記載されているものを参照)、可溶性 TGF- β RIII (例えば、Heng et al., Placenta 57: 320, 2017 に記載されているものを参照) である。いくつかの例では、可溶性 TGF- β 受容体は、TGF- β の受容体「トラップ」である (例えば、Zwaagsstra et al., Mol. Cancer Ther. 11 (7): 1477-1487, 2012 に記載されているもの、および De Crescenzo et al. Tr

10

20

30

40

50

ansforming Growth Factor- β in Cancer Therapy, Volume II, pp 671-684に記載されているものを参照)。

【0258】

可溶性サイトカインまたは可溶性インターロイキン受容体の追加の例は、当該技術分野で既知である。

【0259】

一本鎖キメラポリペプチド

NK細胞活性化物質の非限定的な例は、(i)第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の標的結合ドメインのうちのいずれか)、(ii)可溶性組織因子ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)、および(iii)第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の標的結合ドメインのうちのいずれか)を含む一本鎖キメラポリペプチドである。

【0260】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのいずれかのいくつかの例では、一本鎖キメラポリペプチドは、全長約50アミノ酸～約3000アミノ酸、約50アミノ酸～約2500アミノ酸、約50アミノ酸～約2000アミノ酸、約50アミノ酸～約1500アミノ酸、約50アミノ酸～約1000アミノ酸、約50アミノ酸～約950アミノ酸、約50アミノ酸～約900アミノ酸、約50アミノ酸～約850アミノ酸、約50アミノ酸～約800アミノ酸、約50アミノ酸～約750アミノ酸、約50アミノ酸～約700アミノ酸、約50アミノ酸～約650アミノ酸、約50アミノ酸～約600アミノ酸、約50アミノ酸～約550アミノ酸、約50アミノ酸～約500アミノ酸、約50アミノ酸～約480アミノ酸、約50アミノ酸～約460アミノ酸、約50アミノ酸～約440アミノ酸、約50アミノ酸～約420アミノ酸、約50アミノ酸～約400アミノ酸、約50アミノ酸～約380アミノ酸、約50アミノ酸～約360アミノ酸、約50アミノ酸～約340アミノ酸、約50アミノ酸～約320アミノ酸、約50アミノ酸～約300アミノ酸、約50アミノ酸～約280アミノ酸、約50アミノ酸～約260アミノ酸、約50アミノ酸～約240アミノ酸、約50アミノ酸～約220アミノ酸、約50アミノ酸～約200アミノ酸、約50アミノ酸～約150アミノ酸、約50アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約3000アミノ酸、約100アミノ酸～約2500アミノ酸、約100アミノ酸～約2000アミノ酸、約100アミノ酸～約1500アミノ酸、約100アミノ酸～約1000アミノ酸、約100アミノ酸～約950アミノ酸、約100アミノ酸～約900アミノ酸、約100アミノ酸～約850アミノ酸、約100アミノ酸～約800アミノ酸、約100アミノ酸～約750アミノ酸、約100アミノ酸～約700アミノ酸、約100アミノ酸～約650アミノ酸、約100アミノ酸～約600アミノ酸、約100アミノ酸～約550アミノ酸、約100アミノ酸～約500アミノ酸、約100アミノ酸～約480アミノ酸、約100アミノ酸～約460アミノ酸、約100アミノ酸～約440アミノ酸、約100アミノ酸～約420アミノ酸、約100アミノ酸～約400アミノ酸、約100アミノ酸～約380アミノ酸、約100アミノ酸～約360アミノ酸、約100アミノ酸～約340アミノ酸、約100アミノ酸～約320アミノ酸、約100アミノ酸～約300アミノ酸、約100アミノ酸～約280アミノ酸、約100アミノ酸～約260アミノ酸、約100アミノ酸～約240アミノ酸、約100アミノ酸～約220アミノ酸、約100アミノ酸～約200アミノ酸、約100アミノ酸～約150アミノ酸、約150アミノ酸～約3000アミノ酸、約150アミノ酸～約2500アミノ酸、約150アミノ酸～約2000アミノ酸、約150アミノ酸～約1500アミノ酸、約150アミノ酸～約1000アミノ酸、約150アミノ酸～約950アミノ酸、約150アミノ酸～約900アミノ酸、約150アミノ酸～約850アミノ酸、約150アミノ酸～約800アミノ酸、約150アミノ酸～約750アミノ酸、約150アミノ酸～約700アミノ酸、約150アミノ酸～約650アミノ酸、約150アミノ酸～約600アミノ酸、約150アミノ酸～約550アミノ酸、約150アミノ酸～約500アミノ酸、約

10

20

30

40

50

150アミノ酸～約480アミノ酸、約150アミノ酸～約460アミノ酸、約150ア
ミノ酸～約440アミノ酸、約150アミノ酸～約420アミノ酸、約150アミノ酸～
約400アミノ酸、約150アミノ酸～約380アミノ酸、約150アミノ酸～約360
アミノ酸、約150アミノ酸～約340アミノ酸、約150アミノ酸～約320アミノ酸
、約150アミノ酸～約300アミノ酸、約150アミノ酸～約280アミノ酸、約15
0アミノ酸～約260アミノ酸、約150アミノ酸～約240アミノ酸、約150アミノ
酸～約220アミノ酸、約150アミノ酸～約200アミノ酸、約200アミノ酸～約3
000アミノ酸、約200アミノ酸～約2500アミノ酸、約200アミノ酸～約200
0アミノ酸、約200アミノ酸～約1500アミノ酸、約200アミノ酸～約1000ア
ミノ酸、約200アミノ酸～約950アミノ酸、約200アミノ酸～約900アミノ酸、
約200アミノ酸～約850アミノ酸、約200アミノ酸～約800アミノ酸、約200
アミノ酸～約750アミノ酸、約200アミノ酸～約700アミノ酸、約200アミノ酸
～約650アミノ酸、約200アミノ酸～約600アミノ酸、約200アミノ酸～約55
0アミノ酸、約200アミノ酸～約500アミノ酸、約200アミノ酸～約480アミノ
酸、約200アミノ酸～約460アミノ酸、約200アミノ酸～約440アミノ酸、約2
00アミノ酸～約420アミノ酸、約200アミノ酸～約400アミノ酸、約200アミ
ノ酸～約380アミノ酸、約200アミノ酸～約360アミノ酸、約200アミノ酸～約
340アミノ酸、約200アミノ酸～約320アミノ酸、約200アミノ酸～約300ア
ミノ酸、約200アミノ酸～約280アミノ酸、約200アミノ酸～約260アミノ酸、
約200アミノ酸～約240アミノ酸、約200アミノ酸～約220アミノ酸、約220
アミノ酸～約3000アミノ酸、約220アミノ酸～約2500アミノ酸、約220アミ
ノ酸～約2000アミノ酸、約220アミノ酸～約1500アミノ酸、約220アミノ酸
～約1000アミノ酸、約220アミノ酸～約950アミノ酸、約220アミノ酸～約9
00アミノ酸、約220アミノ酸～約850アミノ酸、約220アミノ酸～約800アミ
ノ酸、約220アミノ酸～約750アミノ酸、約220アミノ酸～約700アミノ酸、約
220アミノ酸～約650アミノ酸、約220アミノ酸～約600アミノ酸、約220ア
ミノ酸～約550アミノ酸、約220アミノ酸～約500アミノ酸、約220アミノ酸～
約480アミノ酸、約220アミノ酸～約460アミノ酸、約220アミノ酸～約440
アミノ酸、約220アミノ酸～約420アミノ酸、約220アミノ酸～約400アミノ酸
、約220アミノ酸～約380アミノ酸、約220アミノ酸～約360アミノ酸、約22
0アミノ酸～約340アミノ酸、約220アミノ酸～約320アミノ酸、約220アミ
ノ酸～約300アミノ酸、約220アミノ酸～約280アミノ酸、約220アミノ酸～約2
60アミノ酸、約220アミノ酸～約240アミノ酸、約240アミノ酸～約3000ア
ミノ酸、約240アミノ酸～約2500アミノ酸、約240アミノ酸～約2000アミノ
酸、約240アミノ酸～約1500アミノ酸、約240アミノ酸～約1000アミノ酸、
約240アミノ酸～約950アミノ酸、約240アミノ酸～約900アミノ酸、約240
アミノ酸～約850アミノ酸、約240アミノ酸～約800アミノ酸、約240アミノ酸
～約750アミノ酸、約240アミノ酸～約700アミノ酸、約240アミノ酸～約65
0アミノ酸、約240アミノ酸～約600アミノ酸、約240アミノ酸～約550アミノ
酸、約240アミノ酸～約500アミノ酸、約240アミノ酸～約480アミノ酸、約2
40アミノ酸～約460アミノ酸、約240アミノ酸～約440アミノ酸、約240アミ
ノ酸～約420アミノ酸、約240アミノ酸～約400アミノ酸、約240アミノ酸～約
380アミノ酸、約240アミノ酸～約360アミノ酸、約240アミノ酸～約340ア
ミノ酸、約240アミノ酸～約320アミノ酸、約240アミノ酸～約300アミノ酸、
約240アミノ酸～約280アミノ酸、約240アミノ酸～約260アミノ酸、約260
アミノ酸～約3000アミノ酸、約260アミノ酸～約2500アミノ酸、約260アミ
ノ酸～約2000アミノ酸、約260アミノ酸～約1500アミノ酸、約260アミノ酸
～約1000アミノ酸、約260アミノ酸～約950アミノ酸、約260アミノ酸～約9
00アミノ酸、約260アミノ酸～約850アミノ酸、約260アミノ酸～約800アミ
ノ酸、約260アミノ酸～約750アミノ酸、約260アミノ酸～約700アミノ酸、約

10

20

30

40

50

260アミノ酸～約650アミノ酸、約260アミノ酸～約600アミノ酸、約260ア
ミノ酸～約550アミノ酸、約260アミノ酸～約500アミノ酸、約260アミノ酸～
約480アミノ酸、約260アミノ酸～約460アミノ酸、約260アミノ酸～約440
アミノ酸、約260アミノ酸～約420アミノ酸、約260アミノ酸～約400アミノ酸
、約260アミノ酸～約380アミノ酸、約260アミノ酸～約360アミノ酸、約26
0アミノ酸～約340アミノ酸、約260アミノ酸～約320アミノ酸、約260アミノ
酸～約300アミノ酸、約260アミノ酸～約280アミノ酸、約280アミノ酸～約3
000アミノ酸、約280アミノ酸～約2500アミノ酸、約280アミノ酸～約200
0アミノ酸、約280アミノ酸～約1500アミノ酸、約280アミノ酸～約1000ア
ミノ酸、約280アミノ酸～約950アミノ酸、約280アミノ酸～約900アミノ酸、
約280アミノ酸～約850アミノ酸、約280アミノ酸～約800アミノ酸、約280
アミノ酸～約750アミノ酸、約280アミノ酸～約700アミノ酸、約280アミノ酸
～約650アミノ酸、約280アミノ酸～約600アミノ酸、約280アミノ酸～約55
0アミノ酸、約280アミノ酸～約500アミノ酸、約280アミノ酸～約480アミノ
酸、約280アミノ酸～約460アミノ酸、約280アミノ酸～約440アミノ酸、約2
80アミノ酸～約420アミノ酸、約280アミノ酸～約400アミノ酸、約280アミ
ノ酸～約380アミノ酸、約280アミノ酸～約360アミノ酸、約280アミノ酸～約
340アミノ酸、約280アミノ酸～約320アミノ酸、約280アミノ酸～約300ア
ミノ酸、約300アミノ酸～約3000アミノ酸、約300アミノ酸～約2500アミノ
酸、約300アミノ酸～約2000アミノ酸、約300アミノ酸～約1500アミノ酸、
約300アミノ酸～約1000アミノ酸、約300アミノ酸～約950アミノ酸、約30
0アミノ酸～約900アミノ酸、約300アミノ酸～約850アミノ酸、約300アミノ
酸～約800アミノ酸、約300アミノ酸～約750アミノ酸、約300アミノ酸～約7
00アミノ酸、約300アミノ酸～約650アミノ酸、約300アミノ酸～約600アミ
ノ酸、約300アミノ酸～約550アミノ酸、約300アミノ酸～約500アミノ酸、約
300アミノ酸～約480アミノ酸、約300アミノ酸～約460アミノ酸、約300ア
ミノ酸～約440アミノ酸、約300アミノ酸～約420アミノ酸、約300アミノ酸～
約400アミノ酸、約300アミノ酸～約380アミノ酸、約300アミノ酸～約360
アミノ酸、約300アミノ酸～約340アミノ酸、約300アミノ酸～約320アミノ酸
、約320アミノ酸～約3000アミノ酸、約320アミノ酸～約2500アミノ酸、約
320アミノ酸～約2000アミノ酸、約320アミノ酸～約1500アミノ酸、約32
0アミノ酸～約1000アミノ酸、約320アミノ酸～約950アミノ酸、約320アミ
ノ酸～約900アミノ酸、約320アミノ酸～約850アミノ酸、約320アミノ酸～約
800アミノ酸、約320アミノ酸～約750アミノ酸、約320アミノ酸～約700ア
ミノ酸、約320アミノ酸～約650アミノ酸、約320アミノ酸～約600アミノ酸、
約320アミノ酸～約550アミノ酸、約320アミノ酸～約500アミノ酸、約320
アミノ酸～約480アミノ酸、約320アミノ酸～約460アミノ酸、約320アミノ酸
～約440アミノ酸、約320アミノ酸～約420アミノ酸、約320アミノ酸～約40
0アミノ酸、約320アミノ酸～約380アミノ酸、約320アミノ酸～約360アミノ
酸、約320アミノ酸～約340アミノ酸、約340アミノ酸～約3000アミノ酸、約
340アミノ酸～約2500アミノ酸、約340アミノ酸～約2000アミノ酸、約34
0アミノ酸～約1500アミノ酸、約340アミノ酸～約1000アミノ酸、約340ア
ミノ酸～約950アミノ酸、約340アミノ酸～約900アミノ酸、約340アミノ酸～
約850アミノ酸、約340アミノ酸～約800アミノ酸、約340アミノ酸～約750
アミノ酸、約340アミノ酸～約700アミノ酸、約340アミノ酸～約650アミノ酸
、約340アミノ酸～約600アミノ酸、約340アミノ酸～約550アミノ酸、約34
0アミノ酸～約500アミノ酸、約340アミノ酸～約480アミノ酸、約340アミノ
酸～約460アミノ酸、約340アミノ酸～約440アミノ酸、約340アミノ酸～約4
20アミノ酸、約340アミノ酸～約400アミノ酸、約340アミノ酸～約380アミ
ノ酸、約340アミノ酸～約360アミノ酸、約360アミノ酸～約3000アミノ酸、

10

20

30

40

50

50

50

0 アミノ酸、約 950 アミノ酸～約 1500 アミノ酸、約 950 アミノ酸～約 1000 アミノ酸、約 1000 アミノ酸～約 3000 アミノ酸、約 1000 アミノ酸～約 2500 アミノ酸、約 1000 アミノ酸～約 2000 アミノ酸、約 1000 アミノ酸～約 1500 アミノ酸、約 1500 アミノ酸～約 3000 アミノ酸、約 1500 アミノ酸～約 2500 アミノ酸、約 1500 アミノ酸～約 2000 アミノ酸、約 2000 アミノ酸～約 3000 アミノ酸、約 2000 アミノ酸～約 2500 アミノ酸、または約 2500 アミノ酸～約 3000 アミノ酸を有し得る。

【0261】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）は、互いに直接隣接している。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第1の標的結合ドメイン（本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）は、互いに直接隣接している。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

【0262】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）は、互いに直接隣接している。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）は、互いに直接隣接している。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第2の標的結合ドメイン（本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

10

20

30

40

50

【0263】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

QIVLTQSPA IMSASPG EKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSG
TSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSSYSLTISGMEAE
DAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGGSGGG
GSQVQLQQSGAELARPGASVKMCKASGYTFTRYTMHWVK
QRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKF KDKATLT TDKSSST
AYMQLSSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVS
SSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFREVLQQSGPELVKPGASVKMS
CKASGYTFFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYN
EKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGD
GNYWGRGTTTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIEMTQSPAIM
SASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYS
TSNLASGVPPRFSGSGSTSSYSLTISSMEAEDAATYFCHQY
HRSPTFGGGTKLETKR（配列番号85）、と少なくとも70%同一（例えば、
少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも9
0%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）である
配列を含み得る。

10

20

【0264】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTA
GCCCCGGTGAGAAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAG
CTCCGTGTCTCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCGGA
ACCAGCCCCAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGG
CCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGG
CACCAGCTACTCTTTAACCATTTC CGGCATGGAAGCTGAA
GACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACC
CCTTCACATTTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAATCG
TGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGA
GGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAACCTGG
CCCGGCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTTC
CGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAG
CAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCA
ACCCTTCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAAGTTCAA
GGATAAAGCCACTTTAACCAGTGAAGAGCTCCTCCACC
GCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCG
CTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTG
TTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCAGTCAAGC
AGCTCCGGCACCAACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCA
CATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGA
ACCCAAGCCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAAGATCTCC
ACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAA
CAGACACCGAGTGTTGATTTAACCAGACGAATCGTCAAGGA
CGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTCTACCCC
GCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTC

30

40

50

TCTACGAGAATTCCCCCGAATTCAACCCCTTATTTAGAGAC
CAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTT
GGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTT
TAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTTATCCCTCCGGGGATGT
GTTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAG
TCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCA
ACGAGTTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTG
CTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGGTCAAC
CGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGGCCAAG
AAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGG
ACCCGAACCTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCT
TGTAAGGCCAGCGGATACACCTTCAACCTCCTATGTGATCC
AGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGAT
CGGCAGCATCAACCCCTTACAACGACTATACCAAATACAAC
GAGAAGTTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAA
GCTCCATCACAGCCTACATGGAGTTTCAAGCTCTTTAACATC
CGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGAC
GGCAATTACTGGGGGACGGGGGCACAACACTGACCGGTGAGCA
GCGGAGGCGGAGGCTCCGGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGG
CGGCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATG
TCCGCTCTTTTAGGCGAGCGGGTCAACAATGACTTGTACAG
CCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCA
ACAGAAACCCGGAAGCTCCCTTAAACTGTGCATCTACAGC
ACCAGCAATCTCGCCAGCGGGCGTGCCCCCTAGGTTTTTCCG
GAAGCGGAAGCACCAAGCTACTCTTTAACCATCTCCTCCAT
GGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCAACCAGTAC
CACCGGTCCCCCACCTTTCGGAGGCGGGCACCAAACTGGAGA
CAAAGAGG（配列番号86）、と少なくとも70%同一（例えば、少なくとも75
%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なく
とも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）である配列を含む核酸に
よってコードされる。

【0265】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSQIVLTQSPA IMSASPG EKVTMT
CSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFR
GSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTK
LEINRGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGAELARPGASVKM
SCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQG LEWIGYINPSRGYTNY
NQKFQDKATLT TDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY
DDHYCLDYWGQGTTLT VSSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKT
ILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTD
EIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFT
PYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFL
SLRDVFGKDLIYTLYYWKS SSSGKKTAKTNTNEFLIDVDK
GENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE VQ
LQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQ
GLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYMEF
SSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLT VSSSGGGGSGGG
GSGGGGSDIEMTQSPA IMSASLGERVTMTCTASSSVSSSY
FHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSL

TISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR（配列番号 87）、と少なくとも 70% 同一（例えば、少なくとも 75% 同一、少なくとも 80% 同一、少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一）である配列を含み得る。

【0266】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTATTTCA
GCTCCGCTTATTCC CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCG
CCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAAGGTGACCATGAC
ATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCTACATGAACTGGGTAT
CAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAGGTGGATCTACG
ACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGGCCGCTCATTTCCG
GGGCTCTGGATCCGGCACCCAGCTACTCTTTAACCATTTC
GGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGC
AATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAA
GCTCGAAATCAATCGTGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGT
GGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAAGTTCAACTCCAGCAGA
GCGGCGCTGAACTGGCCCGGCGCCGGCGCCTCCGTCAAGAT
GAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACA
ATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGT
GGATCGGATATATCAACCCTTCCCGGGGCTACACCAACTA
TAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCAGTAC
AAGAGCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTAA
CCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTA
CGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACC
ACTTTAACCCTCAGCAGCTCCGGGCACCAACCAATACCGTGG
CCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGAC
AATTCTGGAATGGGAACCCAAAGCCCGTCAATCAAGTTTAC
ACCGTGCAAGATCTCCACCAAAATCCGGAGACTGGAAGAGCA
AGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACC GA
CGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGG
GTCTTTTCTCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCT
CCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAAATCCCCCGAATTAC
CCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAG
AGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCAACCGTCG
AGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTT
ATCCCTCCGGGATGTGTTCCGGCAAAGACCTCATCTACACA
CTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAGAGCCG
CTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTTAATTGACGTGGACAA
AGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCT
TCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTG
AGTGCAATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGGAGGTCCA
GCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTGAAACCCGGTGCT
TCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATACACCTTCA
CCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACA
AGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACCCCTTACAACGAC
TATACCAAATACAACGAGAAAGTTTTAAGGGAAAGGCTACTT
TAACCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCCTACATGGAGTT
CAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGC
GCCCCGGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGGGGACAAA

10

20

30

40

50

CACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGG
CGGATCTGGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGACCCAG
TCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCA
CAATGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTA
CTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCTTAAA
CTGTGCATCTACAGCACCAAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGC
CCCCTAGGTTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAAGCTACTCTTT
AACCATCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTAC
TTTTGTCAACCAGTACCACCGGTCCCCCACCTTCGGAGGCG
GCACCAAACTGGAGACAAAGAGG（配列番号88）、と少なくとも70
%同一（例えば、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、
少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100
%同一）である配列を含む核酸によってコードされる。

10

【0267】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

VQLQQSGPELVKPGASVKMCKASGYTFSTSYVVIQWVKQKP
GQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYM
EFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTTLTVSSSGGGGSG
GGGSGGGGSDIEMTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSS
SYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSY
SLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKRSGTT
NTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGD
WKSCKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVE
STGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVN
VTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLTYWKSSSSG
KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTD
SPVECMGQEKGEFREQIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSA
SSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSG
SGTSSYSLTISGMEAEDAATYQCQWSSNPFTFGSGGTKLEI
NRGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGAELARPGASVKMCK
ASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQK
FKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDH
YCLDYWGQGTTTLTVSS（配列番号89）と少なくとも70%同一（例えば、
少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90
%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）である配
列を含み得る。

20

30

【0268】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAACCTGGTCAAGCCCCG
GTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCTTCTGGCTACAC
CTTTACCTCCTACGTCAATCCAATGGGTGAAGCAGAAGCCC
GGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAATCCCTACA
ACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGC
CACTCTGACAAGCGACAAGAGCTCCATTACCGCCTACATG
GAGTTTTCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACT
ATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAATTATTGGGGCCGGGG
AACTACTTTAAACAGTGAGCTCCGGCGGGCGGCGGAAGCGGA
GGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCGAGCGACATCGAGATGA
CACAGTCCCCCGCTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACG
TGTGACCATGACTTGTACAGCTTCCCTCCAGCGTGAGCAGC

40

50

TCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCCTCCC
CTAAACTGTGTATCTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGG
CGTGCCCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCGGCAGCACCTCTTAC
TCTTTAACCATTAGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCA
CATACTTTTGGCCATCAGTACCACCGGTCCCCTACCTTTGG
CGGAGGACACAAAGCTGGAGACCAAGCGGAGCGGCACCACC
AACACAGTGGCCGCTACAATCTGACTTGGAAATCCACCA
ACTTCAAGACCATCCTCGAGTGGGAGCCCAAGCCCGTTAA
TCAAGTTTATACCGTGCGAGATTTCCACCAAGAGCGGCGAC
TGGAAATCCAAGTGCTTCTATACCACAGACACCGAGTGCG
ATCTCACCGACGAGATCGTCAAAGACGTGAAGCAGACATA
TTTAGCTAGGGTGTTCTCTACCCCGCTGGAAACGTGGAG
AGCACCGGATCCGCTGGAGAGCCTTTATACGAGAACTCCC
CCGAATTACCCCCCTATCTGGAAACCAATTTAGGCCAGCC
CACCATCCAGAGCTTCGAACAAGTTGGCACAAAGGTGAAC
GTCACCGTGCGAAGATGAGAGGACTTTAGTGCGGAGGAACA
ATACATTTTTTATCCTTACGTGACGTCTTCGGCAAGGATTT
AATCTACACACTGTATTACTGGAAAGTCTAGCTCCTCCGGC
AAGAAGACCGCCAAGACCAATACCAACGAATTTTTTAATTG
ACGTGGACAAGGGCGAGAACTACTGCTTCTCCGTGCAAGC
TGTGATCCCCCTCCCGGACAGTGAAACCGGAAGTCCACCGAC
TCCCCCGTGAGGTGCATGGGCCAAGAGAAGGGAGAGTTTC
GTGAGCAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCTATTATGAG
CGCTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGCAGCGCC
AGCTCTTCCGTGAGCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGT
CCGGCACCCAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAA
GCTGGCCAGCGGCGTCCCCGCTCACTTTCGGGGCTCCGGC
TCCGGAACAAGCTACTCTCTGACCATCAGCGGCATGGAAG
CCGAGGATGCCGCTACCTATTACTGTCAGCAGTGGAGCTC
CAACCCCTTCACTTTTGGATCCGGCACCAAGCTCGAGATT
AATCGTGGAGGCGGAGGTAGCGGAGGAGGCGGATCCGGCG
GTGGAGGTAGCCAAGTTTCAGCTCCAGCAAAGCGGCGCCGA
ACTCGCTCGGCCCGGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTAAG
GCCTCCGGCTATACCTTCAACCCGGTACACAATGCACTGGG
TCAAGCAACGGCCCCGGTCAAGGTTTLAGAGTGGATTGGCTA
TATCAACCCCTCCCGGGGCTATACCAACTACAACCAGAAG
TTCAAGGACAAAGCCACCCTCACCACCGACAAGTCCAGCA
GCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCTTTAACATCCGAGGA
TTCCGCGCGTGTACTACTGCGCTCGGTACTACGACGATCAT
TACTGCCTCGATTACTGGGGGCCAAGGTACCACCTTAACAG
TCTCCTCC (配列番号90)、と少なくとも70%同一（例えば、少なくとも75
%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なく
とも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）である配列を含む核酸に
よってコードされる。

【0269】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYS SVQLQQSGPELVKPGASVKMSCK
ASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEK
FKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGN
YWGRGTTLT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIMSA

10

20

30

40

50

SLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTS
NLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSEMEADAATYFCHQYHR
SPTFGGGTKLETKRSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWE
PKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKD
VKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLET
NLGQPTIQSFQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYC
FSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREQIVLTQS
PAIMSASPGKEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWI
YDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSSYSLTISGMEADAATYYC
QQWSSNPFTTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQ
QSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTRYTMHWVKQRPQGGL
EWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSS
LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSS（配列番号9
1）、と少なくとも70%同一（例えば、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一
、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも9
9%同一、または100%同一）である配列を含み得る。

【0270】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

ATGAAATGGGTCACTTCATCTCTTTACTGTTTTTATTTA
GCAGCGCCTACAGCGTGCAAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGA
ACTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAG
GCTTCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAATGGG
TGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAG
CATCAATCCCTACAACGATTACACCAAGTATAACGAAAAG
TTTAAGGGCAAGGCCACTCTGACAAGCGACAAGAGCTCCA
TTACCGCCTACATGGAGTTTTCTCTTTAACTTCTGAGGA
CTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAAT
TATTGGGGCCGGGGAACCTACTTTAAACAGTGAGCTCCGGCG
GCGGCGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAG
CGACATCGAGATGACACAGTCCCCCGCTATCATGAGCGCC
TCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGTAACAGCTTCCT
CCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAA
ACCCGGCTCCTCCCCCTAAACTGTGTATCTACTCCACAAGC
AATTTAGCTAGCGGCGTGCCCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCG
GCAGCACCTCTTACTCTTTAAACCATTAGCTCTATGGAGGC
CGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGG
TCCCCCTACCTTTGGCGGAGGCAAAAGCTGGAGACCAAGC
GGAGCGGCACCAACAACAGTGGCCGCCTACAATCTGAC
TTGGAAATCCACCAACTTCAAGACCATCCTCGAGTGGGAG
CCCAAGCCCGTTAATCAAGTTTTATACCGTGACAGATTTCCA
CCAAGAGCGGCGACTGGAAATCCAAGTGCTTCTATACCAC
AGACACCGAGTGCGATCTCACCGACGAGATCGTCAAAGAC
GTGAAGCAGACATATTTAGCTAGGGTGTTCTCCTACCCCG
CTGGAAACGTGGAGAGCACCGGATCCGCTGGAGAGCCTTT
ATACGAGAACTCCCCCGAATTCACCCCCTATCTGGAAACC
AATTTAGGCCAGCCCAACCATCCAGAGCTTCGAACAAGTTG
GCACAAAGGTGAACGTCACCGTCGAAGATGAGAGGACTTT
AGTGCGGAGGAACAATACATTTTTTATCCTTACGTGACGTC
TTCGGCAAGGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGT

10

20

30

40

50

CTAGCTCCTCCGGCAAGAAGACCGCCCAAGACCAATACCAA
CGAATTTTAAATTGACGTGGACAAGGGCGAGAACTACTGC
TTCTCCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACAGTGAACC
GGAAGTCCACCGACTCCCCCGTGGAGTGCATGGGGCCAAGA
GAAGGGAGAGTTTCTGTGAGCAGATCGTGTGACCCAGTCC
CCCGCTATTATGAGCGCTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTA
TGACATGCAGCGCCAGCTCTTCCGTGAGCTACATGAACCTG
GTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAAGCCCTAAAAGGTGGATC
TACGACACCAGCAAGCTGGGCCAGCGGCGTCCCCGCTCACT
TTCGGGGCTCCGGCTCCGGGAACAAGCTACTCTCTGACCAT
CAGCGGCATGGAAGCCGAGGATGCCGCTACCTATTACTGT
CAGCAGTGGAGCTCCAACCCCTTCAACCTTTGGATCCGGCA
CCAAGCTCGAGATTAAATCGTGGAGGCGGAGGTAGCGGAGG
AGGCGGATCCGGCGGTGGAGGTAGCCAAGTTTCAGCTCCAG
CAAAGCGGCGCCGAACCTCGCTCGGCCCGGCGCTTCCGTGA
AGATGTCTTGTAAAGGCCTCCGGCTATACCTTCAACCCGGTA
CACAAATGCACTGGGTCAAGCAACGGCCCCGGTCAAGGTTTA
GAGTGGATTGGCTATATCAACCCCTCCCGGGGCTATACCA
ACTACAACCAGAAAGTTCAAGGACAAAGCCACCCCTCACCA
CGACAAGTCCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCT
TTAACATCCGAGGATTCCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGT
ACTACGACGATCATTACTGCCTCGATTACTGGGGCCAAGG
TACCACCTTAACAGTCTCCTCC (配列番号92)、と少なくとも70%
同一 (例えば、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、
少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%
同一) である配列を含む核酸によってコードされる。

【0271】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態は、そのN末端および／またはC末端に1つ以上 (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10) の追加の標的結合ドメイン (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか) をさらに含む。

【0272】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、そのN末端に1つ以上 (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10) の追加の標的結合ドメイン (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか) を含む得る。いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドのN末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか) は、第1の標的結合ドメイン (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、または可溶性組織因子ドメイン (例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか) に直接隣接し得る。いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、一本鎖キメラポリペプチドのN末端に少なくとも1つの追加の標的結合ドメインのうちの1つ (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか) と、第1の標的結合ドメイン (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、または可溶性組織因子ドメイン (例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか) との間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載のまたは当該技術

分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか) をさらに含む。

【0273】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態は、一本鎖キメラポリペプチドは、一本鎖キメラポリペプチドのC末端に1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)を含む。いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドのC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)は、第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、または可溶性組織因子ドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)に直接隣接している。いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、一本鎖キメラポリペプチドのC末端に少なくとも1つの追加の標的結合ドメインのうちの1つ(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)と、第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、または可溶性組織因子ドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)との間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか)をさらに含む。

【0274】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態は、一本鎖キメラポリペプチドは、そのN末端およびC末端に1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)を含む。いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドのN末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)は、第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、または可溶性組織因子ドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)に直接隣接している。いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、N末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つ(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)と、第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、または可溶性組織因子ドメイン(例えば、例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)との間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか)をさらに含む。いくつかの実施形態では、C末端における1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)は、第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、または可溶性組織因子ドメイン(例えば、例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)に直接隣接している。いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、一本鎖キメラポリペプチドのC末端に1つ以上の追加の抗原結合ドメイ

ンのうちの1つ（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、または可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

【0275】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、または10）は、同じ抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、または10）は、同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、または10）は、同じアミノ酸配列を含む。

【0276】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）は各々、同じ抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）は各々、同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の追加の標的結合ドメインは各々、同じアミノ酸配列を含む。

【0277】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細

10

20

30

40

50

書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、および1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)は、異なる抗原に特異的に結合する。

【0278】

一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、抗原結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な抗原結合ドメインのうちのいずれか)である。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な抗原結合ドメインのうちのいずれか)である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F vまたは単ドメイン抗体を含み得る。

【0279】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、および1つ以上の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)は、CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PD-L1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR- β 受容体II(TGFR- β RII)リガンド、TGFR- β RIIRIリガンド、DNAM-1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、s c MHC Iリガンド、s c MHC IIRIリガンド、s c TCRリガンド、IL-1受容体、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-7受容体、IL-8受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、PDGFR- β 受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、CD122受容体、およびCD28受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する。

【0280】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、第2の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。可溶性インターロイキンタンパク質および可溶性サイトカインタンパク質の非限定的な例には、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR- β 、およびSCFが挙げられる。

【0281】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。可溶性インターロイキン受容体および可溶性サイトカイン受容体の非限定的な例には、可溶性TGF- β 受容体II（TGF- β RII）、可溶性TGF- β RIII、可溶性NKG2D、可溶性NKP30、可溶性NKP44、可溶性NKP46、可溶性DNAM1、scMHC I、scMHC II、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3、または可溶性CD28が挙げられる。

【0282】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれか）は各々独立して、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR- α 、TGF- β 受容体II（TGF- β RII）リガンド、TGF- β RIIRリガンド、DNAM-1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHC Iリガンド、scMHC IIRリガンド、scTCRリガンド、PDGFR- α 受容体、幹細胞因子（SCF）受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド（FLT3L）受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体の群から選択される標的に特異的に結合することができる。

【0283】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR- α 、およびSCFの群から選択される。

【0284】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの1つ以上は、可溶性イ

ンターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性 TGF- β 受容体 II (TGF- β RII)、可溶性 TGF- β RIII、可溶性 TNF α 受容体、可溶性 IL-4 受容体、または可溶性 IL-10 受容体である。

【0285】

多鎖キメラポリペプチドタイプ A

NK細胞活性化物質の非限定的な例は、(a) (i) 第1の標的結合ドメイン、(ii) 可溶性組織因子ドメイン、および (iii) 一对の親和性ドメインの第1のドメインを含む、第1のキメラポリペプチドと、(b) (i) 一对の親和性ドメインの第2のドメインおよび (ii) 第2の標的結合ドメインを含む、第2のキメラポリペプチドとを含む多鎖キメラポリペプチドであり、第1のキメラポリペプチドと第2のキメラポリペプチドが一对の親和性ドメインの第1のドメインと第2のドメインとの結合を介して会合している。

【0286】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドおよび／または第2のキメラポリペプチドの全長は各々独立して、約50アミノ酸～約3000アミノ酸、約50アミノ酸～約2500アミノ酸、約50アミノ酸～約2000アミノ酸、約50アミノ酸～約1500アミノ酸、約50アミノ酸～約1000アミノ酸、約50アミノ酸～約950アミノ酸、約50アミノ酸～約900アミノ酸、約50アミノ酸～約850アミノ酸、約50アミノ酸～約800アミノ酸、約50アミノ酸～約750アミノ酸、約50アミノ酸～約700アミノ酸、約50アミノ酸～約650アミノ酸、約50アミノ酸～約600アミノ酸、約50アミノ酸～約550アミノ酸、約50アミノ酸～約500アミノ酸、約50アミノ酸～約480アミノ酸、約50アミノ酸～約460アミノ酸、約50アミノ酸～約440アミノ酸、約50アミノ酸～約420アミノ酸、約50アミノ酸～約400アミノ酸、約50アミノ酸～約380アミノ酸、約50アミノ酸～約360アミノ酸、約50アミノ酸～約340アミノ酸、約50アミノ酸～約320アミノ酸、約50アミノ酸～約300アミノ酸、約50アミノ酸～約280アミノ酸、約50アミノ酸～約260アミノ酸、約50アミノ酸～約240アミノ酸、約50アミノ酸～約220アミノ酸、約50アミノ酸～約200アミノ酸、約50アミノ酸～約150アミノ酸、約50アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約3000アミノ酸、約100アミノ酸～約2500アミノ酸、約100アミノ酸～約2000アミノ酸、約100アミノ酸～約1500アミノ酸、約100アミノ酸～約1000アミノ酸、約100アミノ酸～約950アミノ酸、約100アミノ酸～約900アミノ酸、約100アミノ酸～約850アミノ酸、約100アミノ酸～約800アミノ酸、約100アミノ酸～約750アミノ酸、約100アミノ酸～約700アミノ酸、約100アミノ酸～約650アミノ酸、約100アミノ酸～約600アミノ酸、約100アミノ酸～約550アミノ酸、約100アミノ酸～約500アミノ酸、約100アミノ酸～約480アミノ酸、約100アミノ酸～約460アミノ酸、約100アミノ酸～約440アミノ酸、約100アミノ酸～約420アミノ酸、約100アミノ酸～約400アミノ酸、約100アミノ酸～約380アミノ酸、約100アミノ酸～約360アミノ酸、約100アミノ酸～約340アミノ酸、約100アミノ酸～約320アミノ酸、約100アミノ酸～約300アミノ酸、約100アミノ酸～約280アミノ酸、約100アミノ酸～約260アミノ酸、約100アミノ酸～約240アミノ酸、約100アミノ酸～約220アミノ酸、約100アミノ酸～約150アミノ酸、約150アミノ酸～約3000アミノ酸、約150アミノ酸～約2500アミノ酸、約150アミノ酸～約2000アミノ酸、約150アミノ酸～約1500アミノ酸、約150アミノ酸～約1000アミノ酸、約150アミノ酸～約950アミノ酸、約150アミノ酸～約900アミノ酸、約150アミノ酸～約850アミノ酸、約150アミノ酸～約800アミノ酸、約150アミノ酸～約750アミノ酸、約150アミノ酸～約700アミノ酸、約150アミノ酸～約650アミノ酸、約150アミノ酸～約600アミノ酸、約150アミノ酸～約550アミノ酸、約150アミノ酸～約500アミノ酸、約150アミノ酸～約480

10

20

30

40

50

50

50

00アミノ酸、約360アミノ酸～約2000アミノ酸、約360アミノ酸～約1500
アミノ酸、約360アミノ酸～約1000アミノ酸、約360アミノ酸～約950アミノ
酸、約360アミノ酸～約900アミノ酸、約360アミノ酸～約850アミノ酸、約3
60アミノ酸～約800アミノ酸、約360アミノ酸～約750アミノ酸、約360アミ
ノ酸～約700アミノ酸、約360アミノ酸～約650アミノ酸、約360アミノ酸～約
600アミノ酸、約360アミノ酸～約550アミノ酸、約360アミノ酸～約500ア
ミノ酸、約360アミノ酸～約480アミノ酸、約360アミノ酸～約460アミノ酸、
約360アミノ酸～約440アミノ酸、約360アミノ酸～約420アミノ酸、約360
アミノ酸～約400アミノ酸、約360アミノ酸～約380アミノ酸、約380アミノ酸
～約3000アミノ酸、約380アミノ酸～約2500アミノ酸、約380アミノ酸～約
2000アミノ酸、約380アミノ酸～約1500アミノ酸、約380アミノ酸～約10
00アミノ酸、約380アミノ酸～約950アミノ酸、約380アミノ酸～約900アミ
ノ酸、約380アミノ酸～約850アミノ酸、約380アミノ酸～約800アミノ酸、約
380アミノ酸～約750アミノ酸、約380アミノ酸～約700アミノ酸、約380ア
ミノ酸～約650アミノ酸、約380アミノ酸～約600アミノ酸、約380アミノ酸～
約550アミノ酸、約380アミノ酸～約500アミノ酸、約380アミノ酸～約480
アミノ酸、約380アミノ酸～約460アミノ酸、約380アミノ酸～約440アミノ酸
、約380アミノ酸～約420アミノ酸、約380アミノ酸～約400アミノ酸、約40
0アミノ酸～約3000アミノ酸、約400アミノ酸～約2500アミノ酸、約400ア
ミノ酸～約2000アミノ酸、約400アミノ酸～約1500アミノ酸、約400アミノ
酸～約1000アミノ酸、約400アミノ酸～約950アミノ酸、約400アミノ酸～約
900アミノ酸、約400アミノ酸～約850アミノ酸、約400アミノ酸～約800ア
ミノ酸、約400アミノ酸～約750アミノ酸、約400アミノ酸～約700アミノ酸、
約400アミノ酸～約650アミノ酸、約400アミノ酸～約600アミノ酸、約400
アミノ酸～約550アミノ酸、約400アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸
～約480アミノ酸、約400アミノ酸～約460アミノ酸、約400アミノ酸～約44
0アミノ酸、約400アミノ酸～約420アミノ酸、約420アミノ酸～約3000アミ
ノ酸、約420アミノ酸～約2500アミノ酸、約420アミノ酸～約2000アミノ酸
、約420アミノ酸～約1500アミノ酸、約420アミノ酸～約1000アミノ酸、約
420アミノ酸～約950アミノ酸、約420アミノ酸～約900アミノ酸、約420ア
ミノ酸～約850アミノ酸、約420アミノ酸～約800アミノ酸、約420アミノ酸～
約750アミノ酸、約420アミノ酸～約700アミノ酸、約420アミノ酸～約650
アミノ酸、約420アミノ酸～約600アミノ酸、約420アミノ酸～約550アミノ酸
、約420アミノ酸～約500アミノ酸、約420アミノ酸～約480アミノ酸、約42
0アミノ酸～約460アミノ酸、約420アミノ酸～約440アミノ酸、約440アミノ
酸～約3000アミノ酸、約440アミノ酸～約2500アミノ酸、約440アミノ酸～
約2000アミノ酸、約440アミノ酸～約1500アミノ酸、約440アミノ酸～約1
000アミノ酸、約440アミノ酸～約950アミノ酸、約440アミノ酸～約900ア
ミノ酸、約440アミノ酸～約850アミノ酸、約440アミノ酸～約800アミノ酸、
約440アミノ酸～約750アミノ酸、約440アミノ酸～約700アミノ酸、約440
アミノ酸～約650アミノ酸、約440アミノ酸～約600アミノ酸、約440アミノ酸
～約550アミノ酸、約440アミノ酸～約500アミノ酸、約440アミノ酸～約48
0アミノ酸、約440アミノ酸～約460アミノ酸、約460アミノ酸～約3000アミ
ノ酸、約460アミノ酸～約2500アミノ酸、約460アミノ酸～約2000アミノ酸
、約460アミノ酸～約1500アミノ酸、約460アミノ酸～約1000アミノ酸、約
460アミノ酸～約950アミノ酸、約460アミノ酸～約900アミノ酸、約460ア
ミノ酸～約850アミノ酸、約460アミノ酸～約800アミノ酸、約460アミノ酸～
約750アミノ酸、約460アミノ酸～約700アミノ酸、約460アミノ酸～約650
アミノ酸、約460アミノ酸～約600アミノ酸、約460アミノ酸～約550アミノ酸
、約460アミノ酸～約500アミノ酸、約460アミノ酸～約480アミノ酸、約48

10

20

30

40

50

0 アミノ酸～約3000アミノ酸、約480アミノ酸～約2500アミノ酸、約480ア
ミノ酸～約2000アミノ酸、約480アミノ酸～約1500アミノ酸、約480アミノ
酸～約1000アミノ酸、約480アミノ酸～約950アミノ酸、約480アミノ酸～約
900アミノ酸、約480アミノ酸～約850アミノ酸、約480アミノ酸～約800ア
ミノ酸、約480アミノ酸～約750アミノ酸、約480アミノ酸～約700アミノ酸、
約480アミノ酸～約650アミノ酸、約480アミノ酸～約600アミノ酸、約480
アミノ酸～約550アミノ酸、約480アミノ酸～約500アミノ酸、約500アミノ酸
～約3000アミノ酸、約500アミノ酸～約2500アミノ酸、約500アミノ酸～約
2000アミノ酸、約500アミノ酸～約1500アミノ酸、約500アミノ酸～約10
00アミノ酸、約500アミノ酸～約950アミノ酸、約500アミノ酸～約900アミ
ノ酸、約500アミノ酸～約850アミノ酸、約500アミノ酸～約800アミノ酸、約
500アミノ酸～約750アミノ酸、約500アミノ酸～約700アミノ酸、約500ア
ミノ酸～約650アミノ酸、約500アミノ酸～約600アミノ酸、約500アミノ酸～
約550アミノ酸、約550アミノ酸～約3000アミノ酸、約550アミノ酸～約25
00アミノ酸、約550アミノ酸～約2000アミノ酸、約550アミノ酸～約1500
アミノ酸、約550アミノ酸～約1000アミノ酸、約550アミノ酸～約950アミノ
酸、約550アミノ酸～約900アミノ酸、約550アミノ酸～約850アミノ酸、約5
50アミノ酸～約800アミノ酸、約550アミノ酸～約750アミノ酸、約550アミ
ノ酸～約700アミノ酸、約550アミノ酸～約650アミノ酸、約550アミノ酸～約
600アミノ酸、約600アミノ酸～約3000アミノ酸、約600アミノ酸～約250
0アミノ酸、約600アミノ酸～約2000アミノ酸、約600アミノ酸～約1500ア
ミノ酸、約600アミノ酸～約1000アミノ酸、約600アミノ酸～約950アミノ酸
、約600アミノ酸～約900アミノ酸、約600アミノ酸～約850アミノ酸、約60
0アミノ酸～約800アミノ酸、約600アミノ酸～約750アミノ酸、約600アミノ
酸～約700アミノ酸、約600アミノ酸～約650アミノ酸、約650アミノ酸～約3
000アミノ酸、約650アミノ酸～約2500アミノ酸、約650アミノ酸～約200
0アミノ酸、約650アミノ酸～約1500アミノ酸、約650アミノ酸～約1000ア
ミノ酸、約650アミノ酸～約950アミノ酸、約650アミノ酸～約900アミノ酸、
約650アミノ酸～約850アミノ酸、約650アミノ酸～約800アミノ酸、約650
アミノ酸～約750アミノ酸、約650アミノ酸～約700アミノ酸、約700アミノ酸
～約3000アミノ酸、約700アミノ酸～約2500アミノ酸、約700アミノ酸～約
2000アミノ酸、約700アミノ酸～約1500アミノ酸、約700アミノ酸～約10
00アミノ酸、約700アミノ酸～約950アミノ酸、約700アミノ酸～約900アミ
ノ酸、約700アミノ酸～約850アミノ酸、約700アミノ酸～約800アミノ酸、約
700アミノ酸～約750アミノ酸、約750アミノ酸～約3000アミノ酸、約750
アミノ酸～約2500アミノ酸、約750アミノ酸～約2000アミノ酸、約750アミ
ノ酸～約1500アミノ酸、約750アミノ酸～約1000アミノ酸、約750アミノ酸
～約950アミノ酸、約750アミノ酸～約900アミノ酸、約750アミノ酸～約85
0アミノ酸、約750アミノ酸～約800アミノ酸、約800アミノ酸～約3000アミ
ノ酸、約800アミノ酸～約2500アミノ酸、約800アミノ酸～約2000アミノ酸
、約800アミノ酸～約1500アミノ酸、約800アミノ酸～約1000アミノ酸、約
800アミノ酸～約950アミノ酸、約800アミノ酸～約900アミノ酸、約800ア
ミノ酸～約850アミノ酸、約850アミノ酸～約3000アミノ酸、約850アミノ酸
～約2500アミノ酸、約850アミノ酸～約2000アミノ酸、約850アミノ酸～約
1500アミノ酸、約850アミノ酸～約1000アミノ酸、約850アミノ酸～約95
0アミノ酸、約850アミノ酸～約900アミノ酸、約900アミノ酸～約3000アミ
ノ酸、約900アミノ酸～約2500アミノ酸、約900アミノ酸～約2000アミノ酸
、約900アミノ酸～約1500アミノ酸、約900アミノ酸～約1000アミノ酸、約
900アミノ酸～約950アミノ酸、約950アミノ酸～約3000アミノ酸、約950
アミノ酸～約2500アミノ酸、約950アミノ酸～約2000アミノ酸、約950アミ

10

20

30

40

50

ノ酸～約1500アミノ酸、約950アミノ酸～約1000アミノ酸、約1000アミノ酸～約3000アミノ酸、約1000アミノ酸～約2500アミノ酸、約1000アミノ酸～約2000アミノ酸、約1000アミノ酸～約1500アミノ酸、約1500アミノ酸～約3000アミノ酸、約1500アミノ酸～約2500アミノ酸、約1500アミノ酸～約2000アミノ酸、約2000アミノ酸～約3000アミノ酸、約2000アミノ酸～約2500アミノ酸、または約2500アミノ酸～約3000アミノ酸であり得る。

【0287】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の第1の標的結合ドメインのうちのいずれか）と可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）は、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメイン（本明細書に記載の例示的な第1の標的結合ドメインのうちのいずれか）と可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

【0288】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）と一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか）は、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメイン（本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）と一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

【0289】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインの第2のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第2のドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な第2の標的結合ドメインのうちのいずれか）は、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第2のドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な第2の標的結合ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

【0290】

多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）をさらに含み、1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）と一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメイン

のうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか)との間に位置付けられている。いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、可溶性組織因子ドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)と1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つとの間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか)、および/または1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの本明細書に記載の例示的な第1のドメインのうちのいずれか)との間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか)をさらに含み得る。

【0291】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチドのN末端および/またはC末端に1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)の追加の標的結合ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第1のドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの本明細書に記載の例示的な第1のドメインのうちのいずれか)に直接隣接している。いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの本明細書に記載の例示的な第1のドメインのうちのいずれか)との間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか)をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)に直接隣接している。いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つと第1の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)との間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか)をさらに含む。

【0292】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチドのN末端および/またはC末端に配置されており、1つ以上の追加の標的結合ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか)のうちの少なくとも1つは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメイン(例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか)と一対の親和性ドメインの第1のドメイン(例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか)との間に位置付けられている。いくつかの実施形態では、N末端に配置された1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つ

の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）は、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）または一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの本明細書に記載の例示的な第1のドメインのうちのいずれか）に直接隣接している。いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の少なくとも1つの追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）または一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの本明細書に記載の例示的な第1のドメインのうちのいずれか）との間に配置されたリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。いくつかの実施形態では、C末端に配置された1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つの追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）は、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）または一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか）に直接隣接している。いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の少なくとも1つの追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）と第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）または一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの本明細書に記載の例示的な第1のドメインのうちのいずれか）との間に配置されたリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。いくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれか）と一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の第1のドメインのうちのいずれかまたは本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれか）との間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの少なくとも1つは、可溶性組織因子ドメインおよび／または一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している。いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、（i）可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子のうちのいずれか）と、可溶性組織因子ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子のうちのいずれか）と一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか）との間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの少なくとも1つとの間、および／または（ii）一対の親和性ドメインの第1のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間に配置されたリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

【0293】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末

10

20

30

40

50

端に1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの少なくとも1つは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第2のドメインのうちのいずれか）に直接隣接している。いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第2のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの本明細書に記載の例示的な第2のドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの少なくとも1つは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の標的結合ドメインのうちのいずれか）に直接隣接している。いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの少なくとも1つと第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

【0294】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上（例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、またはそれ以上）は、同じ抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上（例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、またはそれ以上）は、同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上（例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、またはそれ以上）は、同じアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じ抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、同じアミノ酸配列を含む。

【0295】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、またはそれ以上）は、抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、第1の標

10

20

30

40

50

的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメイン（例えば、s c F vまたは単一ドメイン抗体）である。

【0296】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）は、CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II（TGF- β RII）リガンド、TGF- β RIIIリガンド、DNAM-1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、s c MHC Iリガンド、s c MHC IIリガンド、s c TCRリガンド、IL-1受容体、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-7受容体、IL-8受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、PDGF-DD受容体、幹細胞因子（SCF）受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド（FLT3L）受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、CD122受容体、およびCD28受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する。

【0297】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。可溶性インターロイキンタンパク質および可溶性サイトカインタンパク質の非限定的な例には、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFが挙げられる。

【0298】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の追加の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）のうちの1つ以上は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。可溶性インターロイキン受容体および可溶性サイトカイン受容体の非限定的な例には、可溶性TGF- β 受容体II（TGF- β RII）、可溶性TGF- β RIII、可溶性NKG2D、可溶性NKP30、可溶性NKP44、可溶性NKP46、可溶性DNAM1、s c MHC I、s c MHC II、s c TCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3、または可溶性CD28が挙げられる。

【0299】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれか）、および1つ以上の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれか）は各々独立して、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR-DD、TGF- β 受容体II（TGF- β RII）リガンド、TGF- β RIIRリガンド、DNAM-1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHCIRリガンド、scMHCIIリガンド、scTCRリガンド、PDGFR-DD受容体、幹細胞因子（SCF）受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド（FLT3L）受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体の群から選択される標的に特異的に結合することができる。

【0300】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）、第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）の一方または両方、および1つ以上の追加の結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な標的結合ドメインのうちのいずれか）は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR-DD、およびSCFの群から選択される。

【0301】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性TGF- β 受容体II（TGF- β RII）、可溶性TGF- β RIIR、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である。

【0302】

多鎖キメラポリペプチドタイプB

NK細胞活性化物質の非限定的な例は、（a）第1および第2のキメラポリペプチドであって、各々が、（i）第1の標的結合ドメイン、（ii）Fcドメイン、および（iii）一対の親和性ドメインの第1のドメインを含む、第1および第2のキメラポリペプチドと、（b）第3および第4のキメラポリペプチドであって、各々が、（i）一対の親和性ドメインの第2のドメインおよび（ii）第2の標的結合ドメインを含む、第3および第4のキメラポリペプチドとを含む多鎖キメラポリペプチドであり、第1および第2のキメラポリペプチドならびに第3および第4のキメラポリペプチドは、一対の親和性ドメインの第1のドメインと第2のドメインとの結合を介して会合しており、かつ第1および第2のキメラポリペプチドは、それらのFcドメインを介して会合している。

【0303】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の第1の標的結合ドメインのうちのいずれか）とFcドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的なFcドメインのうちのいずれか）は、第1および第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1および第2のキメラポリペプチドは、第1および第2のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメイン（本明細書に記載の例示的な第1の標的結合ドメインのうちのいずれか）とFcドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的なFcドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

10

【0304】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、Fcドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的なFcドメインのうちのいずれか）と一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか）は、第1および第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1および第2のキメラポリペプチドは、第1および第2のキメラポリペプチド内のFcドメイン（本明細書に記載の例示的なFcドメインのうちのいずれか）と一対の親和性ドメインの第1のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第1のドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

20

【0305】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインの第2のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第2のドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な第2の標的結合ドメインのうちのいずれか）は、第3および第4のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第3および第4のキメラポリペプチドは、第3および第4のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかの例示的な第2のドメインのうちのいずれか）と第2の標的結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な第2の標的結合ドメインのうちのいずれか）との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。

30

【0306】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じ抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な第2の標的結合ドメインのうちのいずれか）である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な第2の標的結合ドメインのうちの

40

50

ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Troponin-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受容体II(TGF-βRII)リガンド、TGF-βRIIリガンド、DNAM-1リガンド、Nkp46リガンド、Nkp44リガンド、NKG2Dリガンド、Nkp30リガンド、scMHCIIリガンド、scMHCIIリガンド、scTCRリガンド、PDGF-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体の群から選択される標的に特異的に結合する。

10

【0311】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFの群から選択される。

【0312】

20

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性TGF-β受容体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRII、可溶性TNFα受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である。

【0313】

組織因子

ヒト組織因子は、以下の3つのドメイン：(1)219アミノ酸N末端細胞外ドメイン(残基1~219)、(2)22アミノ酸膜貫通ドメイン(残基220~242)、および(3)21アミノ酸細胞質C末端尾部(残基242~263)((UniProtKB識別子番号:P13726)を含む263アミノ酸膜貫通タンパク質である。細胞質尾部は、Ser253およびSer258に2つのリン酸化部位を含み、Cys245に1つのS-パルミトイル化部位を含む。細胞質ドメインの欠失または変異が組織因子凝固活性に影響を及ぼすことは見出されなかった。組織因子は、Cys245のタンパク質の細胞内ドメイン内に1つのS-パルミトイル化部位を有する。Cys245は、細胞内ドメインのアミノ酸末端に位置し、膜表面の近くにある。組織因子膜貫通ドメインは、単一膜貫通α-ヘリックスで構成されている。

30

【0314】

2つのフィブロネクチンIII型ドメインで構成されている組織因子の細胞外ドメインは、6アミノ酸リンカーを介して膜貫通ドメインに連結されている。このリンカーは、組織因子細胞外ドメインをその膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインから分離するために立体配座可動性を提供する。各組織因子フィブロネクチンIII型モジュールは、2つの重複βシートで構成されており、上部のシートドメインには3つの逆平行βストランドが含まれており、下部のシートには4つのβストランドが含まれている。βストランドは、ストランドβAとβB、βCとβD、およびβEとβFの間のβループによって連結されており、これらの全ての立体配座が2つのモジュール内で保存されている。βストランドを連結する3つの短いα-ヘリックスセグメントが存在する。組織因子の特有の特徴は、フィブロネクチンスーパーファミリーの共通要素ではないストランドβ10とストランドβ11との間の17アミノ酸β-ヘアピンである。N末端ドメインには、β6Fとβ7Gと

40

50

の間に12アミノ酸ループも含まれており、これは、C末端ドメインには存在せず、組織因子に特有のものである。かかるフィブロンネクチンIII型ドメイン構造は、免疫グロブリン様タンパク質ファミリー折り畳みの特徴であり、多種多様な細胞外タンパク質間で保存されている。

【0315】

チモーゲンFVIIは、それが組織に結合して活性組織因子-FVIIa複合体を形成すると、タンパク質限定分解によってFVIIaに迅速に変換される。およそ0.1nM（血漿FVIIの1%）の濃度で酵素として循環するFVIIaも、組織因子に直接結合することができる。組織因子-FVIIa複合体上の組織因子とFVIIaの間のアロステリック相互作用は、FVIIaの酵素活性を大幅に増加させ、小さい発色性ペプチジル基質の加水分解速度をおよそ20～100倍増加させ、天然高分子基質FIXおよびFXの活性化速度をほぼ100万倍増加させる。組織因子への結合時のFVIIaの活性部位のアロステリック活性化と協調して、リン脂質二重層上での組織因子-FVIIa複合体の形成（すなわち、膜表面上のホスファチジル-L-セリンの曝露時）は、 Ca^{2+} 依存の様式でFIXまたはFXの活性化速度をさらに1,000倍増加させる。遊離FVIIaと比較した組織因子-FVIIa-リン脂質複合体によるFX活性化のおよそ100万倍の全体的な増加は、凝固カスケードの臨界調節点である。

【0316】

FVIIは、約50kDaの一本鎖ポリペプチドであり、406アミノ酸残基からなり、N末端γ-カルボキシグルタミン酸リッチ（GLA）ドメイン、2つの上皮成長因子様ドメイン（EGF1およびEGF2）、およびC末端セリンプロテアーゼドメインを有する。FVIIは、EGF2とプロテアーゼドメインとの間の短いリンカー領域におけるIle¹⁵⁴-Arg¹⁵²結合の特異的タンパク質分解切断によってFVIIaに活性化される。この切断により、軽鎖および重鎖がCys¹³⁵およびCys²⁶²の単一スルフィド結合によって一緒に保持されるようになる。FVIIaは、そのN末端GLAドメインを介して Ca^{2+} 依存の様式でリン脂質膜に結合する。GLAドメインのすぐC末端側に、芳香族スタックおよび2つのEGFドメインが存在する。芳香族スタックは、GLAドメインを、単一の Ca^{2+} イオンに結合するEGF1ドメインに連結する。この Ca^{2+} 結合部位の占有により、FVIIaアミド分解活性および組織因子会合が増加する。触媒トライアドは、His¹⁹³、Asp²⁴²、およびSer³⁴⁴からなり、FVIIaプロテアーゼドメイン内での単一の Ca^{2+} イオンの結合は、その触媒活性に不可欠である。FVIIのFVIIaへのタンパク質分解活性は、Ile¹⁵³で新たに形成されたアミノ末端を解放して、折り返し、活性化ポケットに挿入されて、Asp³⁴³のカルボン酸塩と塩橋を形成して、オキシアニオンホールを生成する。この塩橋の形成は、FVIIa活性に不可欠である。しかしながら、オキシアニオンホールの形成は、タンパク質分解活性化時に遊離FVIIaでは生じない。結果として、FVIIaは、血漿プロテアーゼ阻害剤によってほとんど認識されないチモーゲン様状態で循環し、それがおよそ90分の半減期で循環することを可能にする。

【0317】

膜表面上でのFVIIa活性部位の組織因子媒介性位置付けは、同族基質に対するFVIIaに重要である。遊離FVIIaは、その活性部位が膜表面の約80Å上に位置付けられた膜に結合すると、安定した拡張構造をとる。FVIIaが組織因子に結合すると、FVIIa活性部位は、膜に約6Å近づいて再位置付けられる。この調節は、FVIIa触媒トライアドの標的基質切断部位との適切な整列を助け得る。GLAドメインレスFVIIaを使用して、活性部位が依然として膜上から同様の距離で位置付けられたことが示されており、組織因子がFVIIa-膜相互作用の不在下でさえもFVIIa活性部位位置付けを完全にサポートすることができることを示す。追加のデータは、組織因子細胞外ドメインが何らかの方法で膜表面に繫留されている限り、組織因子が完全なFVIIaタンパク質分解活性をサポートすることを示した。しかしながら、FVIIaの活性部位を膜表面から80Å超えて上昇させることにより、組織因子-FVIIa複合体がFXを活性化

10

20

30

40

50

する能力が大幅に低下したが、組織因子-FVIIaアミド分解活性は低下しなかった。

【0318】

アラニンスキャニング変異誘発は、FVIIaとの相互作用のための組織因子細胞外ドメインにおける特定のアミノ酸側鎖の役割を評価するために使用されている (Gibbs et al., Biochemistry 33 (47): 14003-14010, 1994, Schullek et al., J Biol Chem 269 (30): 19399-19403, 1994)。アラニン置換は、アラニン置換がFVIIa結合に対して5~10倍低い親和性を引き起こす限定された数の残基位置を特定した。これらの残基側鎖の大半が、高分子リガンド相互作用と調和して、結晶構造における溶媒に十分に曝露されることが見出された。FVIIaリガンド結合部位は、2つのモジュール間の境界の広範な領域にわたって位置する。C-モジュールにおいて、突出したB-Cループ上に位置する残基Arg¹³⁵およびPhe¹⁴⁰は、FVIIaとの独立した接触を提供する。Leu¹³³は、指様の構造の基部に位置し、2つのモジュール間の隙間にパッキングされている。これにより、Lys²⁰、Thr⁶⁰、Asp⁵⁸、およびIle²²からなる重要な結合残基の主要なクラスターに連続性が提供される。Thr⁶⁰は、部分的にのみ溶媒に曝露されており、リガンドと有意に接触するのではなく、局所的な構造的役割を果たし得る。結合部位は、Glu²⁴およびGln¹¹⁰、ならびに潜在的により遠位の残基Val²⁰⁷を含むモジュール間角度の凹面側に伸びている。結合領域は、Asp⁵⁸から、Lys⁴⁸、Lys⁴⁶、Gln³⁷、Asp⁴⁴、およびTrp⁴⁵によって形成された凸面領域に伸びている。Trp⁴⁵およびAsp⁴⁴は、FVIIaと独立して相互作用せず、Trp⁴⁵位での変異効果が、隣接するAsp⁴⁴およびGln³⁷側鎖の局所的パッキングのためのこの側鎖の構造的な重要性を反映し得ることを示す。相互作用領域は、N-モジュール内に疎水性クラスターの一部を形成する2つの表面露出芳香族残基Phe⁷⁶およびTyr⁷⁸をさらに含む。

【0319】

組織因子-FVIIaの既知の生理学的基質は、FVII、FIX、およびFX、ならびにある特定のプロテイナーゼ活性化受容体である。変異分析により、変異すると、小さいペプチジル基質に対する完全なFVIIaアミド分解活性をサポートするが、高分子基質（すなわち、FVII、FIX、およびFX）の活性化をサポートする能力を欠くいくつかの残基が特定されている (Ruf et al., J Biol Chem 267 (31): 22206-22210, 1992, Ruf et al., J Biol Chem 267 (9): 6375-6381, 1992, Huang et al., J Biol Chem 271 (36): 21752-21757, 1996, Kirchhofer et al., Biochemistry 39 (25): 7380-7387, 2000)。残基159~165の組織因子ループ領域、およびこの可動性ループ内のまたはそれに隣接する残基が、組織因子-FVIIa複合体のタンパク質分解活性に不可欠であることが示されている。これは、FVIIa活性部位からかなり離れた組織因子の提案された基質結合エキソサイト領域を定義する。グリシン残基をわずかによりかさばったアラニン残基で置換することにより、組織因子-FVIIaのタンパク質分解活性が著しく損なわれる。これは、グリシンによってもたらされる可動性が組織因子高分子基質認識のための残基159~165のループに不可欠であることを示唆する。

【0320】

残基Lys¹⁶⁵およびLys¹⁶⁶が基質認識および結合に重要であることも実証されている。これらの残基のいずれかをアラニンに変異させることにより、組織因子補因子機能が大幅に低下する。Lys¹⁶⁵とLys¹⁶⁶は互いに外方に向いており、Lys¹⁶⁵は、大半の組織因子-FVIIa構造内でFVIIaの方を指し、Lys¹⁶⁶は、結晶構造内の基質結合エキソサイト領域を指している。FVIIaのLys¹⁶⁵とFVIIaのGla³⁵との間の推定塩橋形成は、組織因子のFVIIaのGLAドメインとの相互作用が基質認識を調節するという概念を支持するであろう。これらの結果は、組織因子外部ドメインのC末端部分が、FIXおよびFXのGLAドメイン、隣接する可能性のあるE

GF1ドメインと直接相互作用し、FVIIa GLAドメインの存在がこれらの相互作用を直接または間接的のいずれかで調節し得ることを示唆する。

【0321】

可溶性組織因子ドメイン

本明細書に記載のポリペプチド、組成物、または方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、シグナル配列、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを欠く野生型組織因子ポリペプチドであり得る。いくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、組織因子変異体であり得、野生型組織因子ポリペプチドが、シグナル配列、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを欠き、選択されたアミノ酸でさらに修飾されている。いくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性ヒト組織因子ドメインであり得る。いくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性マウス組織因子ドメインであり得る。いくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性ラット組織因子ドメインであり得る。可溶性ヒト組織因子ドメイン、可溶性マウス組織因子ドメイン、可溶性ラット組織因子ドメイン、および変異体可溶性組織因子ドメインの非限定的な例が以下に示される。

例示的な可溶性ヒト組織因子ドメイン（配列番号93）

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIST
KSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPA
GNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVG
TKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKS
SSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR TVNR
KSTDSPVECMGQEKGEFRE

可溶性ヒト組織因子ドメイン（配列番号94）をコードする例示的な核酸

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTT
GGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACC
CAAACCCGTTTAAACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCAC
AAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCAACCG
ACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGT
GAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCC
GGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTAT
ACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAA
TTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGC
ACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAG
TGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTT
CGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCC
TCTTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAACG
AGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTTT
CAGCGTGCAAGCTGTGATCCCTCCCGGACCGTGAAATAGG
AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTG CATGGGCCAAGAAA
AGGGCGAGTTCCGGGAG

例示的な可溶性マウス組織因子ドメイン（配列番号95）

agipekafnltwistdfktilewqp kptnytytvqisdr
rnwknkcfssttdtecdltdeivkdvtwayeakvlsvprrn
svhgddgdlv ihgeppftnapkflpyrdtnlgqpviqqf
eqdgrkl nvvvkdsltlvrkngtfltlrqvfgkdlgyiit
yrkgsstgkktnitntnefsidveegvsycffvqamifsr
ktnqnspgsstvtcteqwksflge

例示的な可溶性ラット組織因子ドメイン（配列番号96）

Agtppgkafnltwistdfktilewqp kptnytytvqisdr
srnwkykctgttdtecdltdeivkdvnwtyearvlsvpwr

n s t h g k e t l f g t h g e e p p f t n a r k f l p y r d t k i g q p v i q k
y e q g g t k l k v t v k d s f t l v r k n g t f l t l r q v f g n d l g y i l
t y r k d s s t g r k t n t t h t n e f l i d v e k g v s y c f f a q a v i f s
r k t n h k s p e s i t k c t e q w k s v l g e

例示的な変異体可溶性ヒト組織因子ドメイン（配列番号 97）

S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F A T A L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S T
K S G D W K S K C F Y T T D T E C A L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P A
G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V G
T K V N V T V E D E R T L V A R N N T A L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K S
S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S V Q A V I P S R T V N R
K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E

10

例示的な変異体可溶性ヒト組織因子ドメイン（配列番号 98）

S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F A T A L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S T
K S G D A K S K C F Y T T D T E C A L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P A
G N V E S T G S A G E P L A E N S P E F T P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V G
T K V N V T V E D E R T L V A R N N T A L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K S
S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S V Q A V I P S R T V N R
K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E

【0322】

いくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、配列番号 93、95、96、97、または 98 と少なくとも 70% 同一、少なくとも 72% 同一、少なくとも 74% 同一、少なくとも 76% 同一、少なくとも 78% 同一、少なくとも 80% 同一、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、1~20 個のアミノ酸（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個のアミノ酸）がその N 末端から除去された、および／または 1~20 個のアミノ酸（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個のアミノ酸）がその C 末端から除去された、配列番号 93、95、96、97、または 98 の配列を含み得る。

20

30

【0323】

当該技術分野で理解され得るように、当業者であれば、異なる哺乳動物種間で保存されているアミノ酸の変異がタンパク質の活性および／または構造的安定性を低下させる可能性が高い一方で、異なる哺乳動物種間で保存されていないアミノ酸の変異がタンパク質の活性および／または構造的安定性を低下させる可能性が低いことを理解するであろう。

【0324】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、第 V I I a 因子に結合することができない。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、不活性第 X 因子を第 X a 因子に変換しない。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドは、哺乳動物における血液凝固を刺激しない。

40

【0325】

いくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性ヒト組織因子ドメインであり得る。いくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性マウス組織因子ドメインであり得る。いくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、可溶性ラット組織因子ドメインであり得る。

【0326】

いくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質の

50

アミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上（例えば、2、3、4、5、6、または 7 つ）を含まない。いくつかの実施形態では、変異体可溶性組織因子は、配列番号 97 または配列番号 98 のアミノ酸配列を有する。

10

【0327】

いくつかの例では、可溶性組織因子ドメインは、配列番号 94 と少なくとも 70 % 同一、少なくとも 72 % 同一、少なくとも 74 % 同一、少なくとも 76 % 同一、少なくとも 78 % 同一、少なくとも 80 % 同一、少なくとも 82 % 同一、少なくとも 84 % 同一、少なくとも 86 % 同一、少なくとも 88 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 92 % 同一、少なくとも 94 % 同一、少なくとも 96 % 同一、少なくとも 98 % 同一、少なくとも 99 % 同一、または 100 % 同一の配列を含む核酸によってコードされ得る。

【0328】

いくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、全長約 20 アミノ酸～約 220 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 215 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 210 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 205 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 200 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 195 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 190 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 185 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 180 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 175 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 170 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 165 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 160 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 155 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 150 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 145 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 140 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 135 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 130 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 125 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 120 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 115 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 110 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 105 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 100 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 95 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 90 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 85 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 80 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 75 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 70 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 60 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 50 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 40 アミノ酸、約 20 アミノ酸～約 30 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 220 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 215 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 210 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 205 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 200 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 195 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 190 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 185 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 180 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 175 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 170 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 165 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 160 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 155 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 150 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 145 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 140 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 135 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 130 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 125 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 120 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 115 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 110 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 105 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 100 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 95 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 90 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 85 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 80 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 75 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 70 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 60 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 50 アミノ酸、約 30 アミノ酸～約 40 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 220 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 215 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 210 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 205 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 200 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 195 ア

20

30

40

50

50

50

50

50アミノ酸～約210アミノ酸、約150アミノ酸～約205アミノ酸、約150アミノ酸
ノ酸～約200アミノ酸、約150アミノ酸～約195アミノ酸、約150アミノ酸～約
190アミノ酸、約150アミノ酸～約185アミノ酸、約150アミノ酸～約180ア
ミノ酸、約150アミノ酸～約175アミノ酸、約150アミノ酸～約170アミノ酸、
約150アミノ酸～約165アミノ酸、約150アミノ酸～約160アミノ酸、約150
アミノ酸～約155アミノ酸、約155アミノ酸～約220アミノ酸、約155アミノ酸
～約215アミノ酸、約155アミノ酸～約210アミノ酸、約155アミノ酸～約20
5アミノ酸、約155アミノ酸～約200アミノ酸、約155アミノ酸～約195アミノ
酸、約155アミノ酸～約190アミノ酸、約155アミノ酸～約185アミノ酸、約1
55アミノ酸～約180アミノ酸、約155アミノ酸～約175アミノ酸、約155アミ
ノ酸～約170アミノ酸、約155アミノ酸～約165アミノ酸、約155アミノ酸～約
160アミノ酸、約160アミノ酸～約220アミノ酸、約160アミノ酸～約215ア
ミノ酸、約160アミノ酸～約210アミノ酸、約160アミノ酸～約205アミノ酸、
約160アミノ酸～約200アミノ酸、約160アミノ酸～約195アミノ酸、約160
アミノ酸～約190アミノ酸、約160アミノ酸～約185アミノ酸、約160アミノ酸
～約180アミノ酸、約160アミノ酸～約175アミノ酸、約160アミノ酸～約17
0アミノ酸、約160アミノ酸～約165アミノ酸、約165アミノ酸～約220アミノ
酸、約165アミノ酸～約215アミノ酸、約165アミノ酸～約210アミノ酸、約1
65アミノ酸～約205アミノ酸、約165アミノ酸～約200アミノ酸、約165アミ
ノ酸～約195アミノ酸、約165アミノ酸～約190アミノ酸、約165アミノ酸～約
185アミノ酸、約165アミノ酸～約180アミノ酸、約165アミノ酸～約175ア
ミノ酸、約165アミノ酸～約170アミノ酸、約170アミノ酸～約220アミノ酸、
約170アミノ酸～約215アミノ酸、約170アミノ酸～約210アミノ酸、約170
アミノ酸～約205アミノ酸、約170アミノ酸～約200アミノ酸、約170アミノ酸
～約195アミノ酸、約170アミノ酸～約190アミノ酸、約170アミノ酸～約18
5アミノ酸、約170アミノ酸～約180アミノ酸、約170アミノ酸～約175アミノ
酸、約175アミノ酸～約220アミノ酸、約175アミノ酸～約215アミノ酸、約1
75アミノ酸～約210アミノ酸、約175アミノ酸～約205アミノ酸、約175アミ
ノ酸～約200アミノ酸、約175アミノ酸～約195アミノ酸、約175アミノ酸～約
190アミノ酸、約175アミノ酸～約185アミノ酸、約175アミノ酸～約180ア
ミノ酸、約180アミノ酸～約220アミノ酸、約180アミノ酸～約215アミノ酸、
約180アミノ酸～約210アミノ酸、約180アミノ酸～約205アミノ酸、約180
アミノ酸～約200アミノ酸、約180アミノ酸～約195アミノ酸、約180アミノ酸
～約190アミノ酸、約180アミノ酸～約185アミノ酸、約185アミノ酸～約22
0アミノ酸、約185アミノ酸～約215アミノ酸、約185アミノ酸～約210アミノ
酸、約185アミノ酸～約205アミノ酸、約185アミノ酸～約200アミノ酸、約1
85アミノ酸～約195アミノ酸、約185アミノ酸～約190アミノ酸、約190アミ
ノ酸～約220アミノ酸、約190アミノ酸～約215アミノ酸、約190アミノ酸～約
210アミノ酸、約190アミノ酸～約205アミノ酸、約190アミノ酸～約200ア
ミノ酸、約190アミノ酸～約195アミノ酸、約195アミノ酸～約220アミノ酸、
約195アミノ酸～約215アミノ酸、約195アミノ酸～約210アミノ酸、約195
アミノ酸～約205アミノ酸、約195アミノ酸～約200アミノ酸、約200アミノ酸
～約220アミノ酸、約200アミノ酸～約215アミノ酸、約200アミノ酸～約21
0アミノ酸、約200アミノ酸～約205アミノ酸、約205アミノ酸～約220アミノ
酸、約205アミノ酸～約215アミノ酸、約205アミノ酸～約210アミノ酸、約2
10アミノ酸～約220アミノ酸、約210アミノ酸～約215アミノ酸、または約21
5アミノ酸～約220アミノ酸を有し得る。

【 0 3 2 9 】

リンカー配列

いくつかの実施形態では、リンカー配列は、可動性リンカー配列であり得る。使用され

10

20

30

40

50

得るリンカー配列の非限定的な例は、Klein et al., Protein Engineering, Design & Selection 27 (10) : 325-330, 2014、Priyanka et al., Protein Sci. 22 (2) : 153-167, 2013に記載されている。いくつかの例では、リンカー配列は、合成リンカー配列である。

【0330】

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のリンカー配列（例えば、同じまたは異なるリンカー配列、例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）を含み得る。本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のリンカー配列（例えば、同じまたは異なるリンカー配列、例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）を含み得る。

【0331】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のリンカー配列（例えば、同じまたは異なるリンカー配列、例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）を含み得る。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のリンカー配列（例えば、同じまたは異なるリンカー配列、例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）を含み得る。

【0332】

いくつかの実施形態では、リンカー配列は、全長1アミノ酸～約100アミノ酸、1アミノ酸～約90アミノ酸、1アミノ酸～約80アミノ酸、1アミノ酸～約70アミノ酸、1アミノ酸～約60アミノ酸、1アミノ酸～約50アミノ酸、1アミノ酸～約45アミノ酸、1アミノ酸～約40アミノ酸、1アミノ酸～約35アミノ酸、1アミノ酸～約30アミノ酸、1アミノ酸～約25アミノ酸、1アミノ酸～約24アミノ酸、1アミノ酸～約22アミノ酸、1アミノ酸～約20アミノ酸、1アミノ酸～約18アミノ酸、1アミノ酸～約16アミノ酸、1アミノ酸～約14アミノ酸、1アミノ酸～約12アミノ酸、1アミノ酸～約10アミノ酸、1アミノ酸～約8アミノ酸、1アミノ酸～約6アミノ酸、1アミノ酸～約4アミノ酸、約2アミノ酸～約100アミノ酸、約2アミノ酸～約90アミノ酸、約2アミノ酸～約80アミノ酸、約2アミノ酸～約70アミノ酸、約2アミノ酸～約60アミノ酸、約2アミノ酸～約50アミノ酸、約2アミノ酸～約45アミノ酸、約2アミノ酸～約40アミノ酸、約2アミノ酸～約35アミノ酸、約2アミノ酸～約30アミノ酸、約2アミノ酸～約25アミノ酸、約2アミノ酸～約24アミノ酸、約2アミノ酸～約22アミノ酸、約2アミノ酸～約20アミノ酸、約2アミノ酸～約18アミノ酸、約2アミノ酸～約16アミノ酸、約2アミノ酸～約14アミノ酸、約2アミノ酸～約12アミノ酸、約2アミノ酸～約10アミノ酸、約2アミノ酸～約8アミノ酸、約2アミノ酸～約6アミノ酸、約2アミノ酸～約4アミノ酸、約4アミノ酸～約100アミノ酸、約4アミノ酸～約90アミノ酸、約4アミノ酸～約80アミノ酸、約4アミノ酸～約70アミノ酸、約4アミノ酸～約60アミノ酸、約4アミノ酸～約50アミノ酸、約4アミノ酸～約45アミノ酸、約4アミノ酸～約40アミノ酸、約4アミノ酸～約35アミノ酸、約4アミノ酸～約30アミノ酸、約4アミノ酸～約25アミノ酸、約4アミノ酸～約24アミノ酸、約4アミノ酸～約22アミノ酸、約4アミノ酸～約20アミノ酸、約4アミノ酸～約18アミノ酸、約4アミノ酸～約16アミノ酸、約4アミノ酸～約14アミノ酸、約4アミノ酸～約12アミノ酸、約4アミノ酸～約10アミノ酸、約4アミノ酸～約8アミノ酸、約4アミノ酸～約6アミノ酸、約6アミノ酸～約100アミノ酸、約6アミノ酸～約90アミノ酸、約6アミノ酸～約80アミノ酸、約6アミノ酸～約70アミノ酸、約6アミノ酸～約

50

ノ酸～約22アミノ酸、約22アミノ酸～約100アミノ酸、約22アミノ酸～約90アミノ酸、約22アミノ酸～約80アミノ酸、約22アミノ酸～約70アミノ酸、約22アミノ酸～約60アミノ酸、約22アミノ酸～約50アミノ酸、約22アミノ酸～約45アミノ酸、約22アミノ酸～約40アミノ酸、約22アミノ酸～約35アミノ酸、約22アミノ酸～約30アミノ酸、約22アミノ酸～約25アミノ酸、約22アミノ酸～約24アミノ酸、約25アミノ酸～約100アミノ酸、約25アミノ酸～約90アミノ酸、約25アミノ酸～約80アミノ酸、約25アミノ酸～約70アミノ酸、約25アミノ酸～約60アミノ酸、約25アミノ酸～約50アミノ酸、約25アミノ酸～約45アミノ酸、約25アミノ酸～約40アミノ酸、約25アミノ酸～約35アミノ酸、約25アミノ酸～約30アミノ酸、約30アミノ酸～約100アミノ酸、約30アミノ酸～約90アミノ酸、約30アミノ酸～約80アミノ酸、約30アミノ酸～約70アミノ酸、約30アミノ酸～約60アミノ酸、約30アミノ酸～約50アミノ酸、約30アミノ酸～約45アミノ酸、約30アミノ酸～約40アミノ酸、約30アミノ酸～約35アミノ酸、約35アミノ酸～約100アミノ酸、約35アミノ酸～約90アミノ酸、約35アミノ酸～約80アミノ酸、約35アミノ酸～約70アミノ酸、約35アミノ酸～約60アミノ酸、約35アミノ酸～約50アミノ酸、約35アミノ酸～約45アミノ酸、約35アミノ酸～約40アミノ酸、約40アミノ酸～約100アミノ酸、約40アミノ酸～約90アミノ酸、約40アミノ酸～約80アミノ酸、約40アミノ酸～約70アミノ酸、約40アミノ酸～約60アミノ酸、約40アミノ酸～約50アミノ酸、約40アミノ酸～約45アミノ酸、約45アミノ酸～約100アミノ酸、約45アミノ酸～約90アミノ酸、約45アミノ酸～約80アミノ酸、約45アミノ酸～約70アミノ酸、約45アミノ酸～約60アミノ酸、約45アミノ酸～約50アミノ酸、約50アミノ酸～約100アミノ酸、約50アミノ酸～約90アミノ酸、約50アミノ酸～約80アミノ酸、約50アミノ酸～約70アミノ酸、約50アミノ酸～約60アミノ酸、約60アミノ酸～約100アミノ酸、約60アミノ酸～約90アミノ酸、約60アミノ酸～約80アミノ酸、約60アミノ酸～約70アミノ酸、約70アミノ酸～約100アミノ酸、約70アミノ酸～約90アミノ酸、約70アミノ酸～約80アミノ酸、約80アミノ酸～約100アミノ酸、約80アミノ酸～約90アミノ酸、または約90アミノ酸～約100アミノ酸を有し得る。

【0333】

いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン（GlyまたはG）残基に富む。いくつかの実施形態では、リンカーは、セリン（SerまたはS）残基に富む。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン残基およびセリン残基に富む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のグリシン-セリン残基対（GS）、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のGS対を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGly-Gly-Gly-Ser（GGGS）（配列番号99）配列、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のGGGS（配列番号99）配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGly-Gly-Gly-Gly-Ser（GGGGS）配列、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のGGGGS（配列番号100）配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGly-Gly-Ser-Gly（GGS G）（配列番号101）配列、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のGGS G（配列番号101）配列を有する。

【0334】

いくつかの実施形態では、リンカー配列は、GGGSGGGSGGGGS（配列番号102）を含み得るか、またはそれからなり得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT（配列番号103）を含むか、またはそれからなる核酸によってコードされ得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、GGSGGGGS（配列番号104）を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0335】

標的結合ドメイン

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および／または追加の1つ以上の標的結合ドメインは、抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的な抗原結合ドメインのうちのいずれか）、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性インターロイキンタンパク質または可溶性サイトカインタンパク質のうちのいずれか）、および可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体（例えば、本明細書に記載の例示的な可溶性インターロイキン受容体または可溶性サイトカイン受容体のうちのいずれか）であり得る。

【0336】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および／または1つ以上の追加の標的結合ドメインは各々独立して、アミノ酸総数約5アミノ酸～約1000アミノ酸、約5アミノ酸～約950アミノ酸、約5アミノ酸～約900アミノ酸、約5アミノ酸～約850アミノ酸、約5アミノ酸～約800アミノ酸、約5アミノ酸～約750アミノ酸、約5アミノ酸～約700アミノ酸、約5アミノ酸～約650アミノ酸、約5アミノ酸～約600アミノ酸、約5アミノ酸～約550アミノ酸、約5アミノ酸～約500アミノ酸、約5アミノ酸～約450アミノ酸、約5アミノ酸～約400アミノ酸、約5アミノ酸～約350アミノ酸、約5アミノ酸～約300アミノ酸、約5アミノ酸～約280アミノ酸、約5アミノ酸～約260アミノ酸、約5アミノ酸～約240アミノ酸、約5アミノ酸～約220アミノ酸、約5アミノ酸～約200アミノ酸、約5アミノ酸～約195アミノ酸、約5アミノ酸～約190アミノ酸、約5アミノ酸～約185アミノ酸、約5アミノ酸～約180アミノ酸、約5アミノ酸～約175アミノ酸、約5アミノ酸～約170アミノ酸、約5アミノ酸～約165アミノ酸、約5アミノ酸～約160アミノ酸、約5アミノ酸～約155アミノ酸、約5アミノ酸～約150アミノ酸、約5アミノ酸～約145アミノ酸、約5アミノ酸～約140アミノ酸、約5アミノ酸～約135アミノ酸、約5アミノ酸～約130アミノ酸、約5アミノ酸～約125アミノ酸、約5アミノ酸～約120アミノ酸、約5アミノ酸～約115アミノ酸、約5アミノ酸～約110アミノ酸、約5アミノ酸～約105アミノ酸、約5アミノ酸～約100アミノ酸、約5アミノ酸～約95アミノ酸、約5アミノ酸～約90アミノ酸、約5アミノ酸～約85アミノ酸、約5アミノ酸～約80アミノ酸、約5アミノ酸～約75アミノ酸、約5アミノ酸～約70アミノ酸、約5アミノ酸～約65アミノ酸、約5アミノ酸～約60アミノ酸、約5アミノ酸～約55アミノ酸、約5アミノ酸～約50アミノ酸、約5アミノ酸～約45アミノ酸、約5アミノ酸～約40アミノ酸、約5アミノ酸～約35アミノ酸、約5アミノ酸～約30アミノ酸、約5アミノ酸～約25アミノ酸、約5アミノ酸～約20アミノ酸、約5アミノ酸～約15アミノ酸、約5アミノ酸～約10アミノ酸、約10アミノ酸～約1000アミノ酸、約10アミノ酸～約950アミノ酸、約10アミノ酸～約900アミノ酸、約10アミノ酸～約850アミノ酸、約10アミノ酸～約800アミノ酸、約10アミノ酸～約750アミノ酸、約10アミノ酸～約700アミノ酸、約10アミノ酸～約650アミノ酸、約10アミノ酸～約600アミノ酸、約10アミノ酸～約550アミノ酸、約10アミノ酸～約500アミノ酸、約10アミノ酸～約450アミノ酸、約10アミノ酸～約400アミノ酸、約10アミノ酸～約350アミノ酸、約10アミノ酸～約300アミノ酸、約10アミノ酸～約280アミノ酸、約10アミノ酸～約260アミノ酸、約10アミノ酸～約240アミノ酸、約10アミノ酸～約220アミノ酸、約10アミノ酸～約200アミノ酸、約10アミノ酸～約195アミノ酸、約10アミノ酸～約190アミノ酸、約10アミノ酸～約185アミノ酸、約10アミノ酸～約180アミノ酸、約10アミノ酸～約175アミノ酸、約10アミノ酸～約170アミノ酸、約10アミノ酸～約165アミノ酸、約10アミノ酸～約160アミノ酸、約10アミノ酸～約155アミノ酸、約10アミノ酸～約150アミノ酸、約10アミノ酸～約145アミノ酸、約10アミノ酸～約140アミノ酸、約10アミノ酸～約135アミノ酸、約10アミノ酸～約130アミノ酸、約10アミノ酸～

10

20

30

40

50

50

50

酸、約30アミノ酸～約35アミノ酸、約35アミノ酸～約1000アミノ酸、約35ア
ミノ酸～約950アミノ酸、約35アミノ酸～約900アミノ酸、約35アミノ酸～約8
50アミノ酸、約35アミノ酸～約800アミノ酸、約35アミノ酸～約750アミノ酸
、約35アミノ酸～約700アミノ酸、約35アミノ酸～約650アミノ酸、約35アミ
ノ酸～約600アミノ酸、約35アミノ酸～約550アミノ酸、約35アミノ酸～約50
0アミノ酸、約35アミノ酸～約450アミノ酸、約35アミノ酸～約400アミノ酸、
約35アミノ酸～約350アミノ酸、約35アミノ酸～約300アミノ酸、約35アミ
ノ酸～約280アミノ酸、約35アミノ酸～約260アミノ酸、約35アミノ酸～約240
アミノ酸、約35アミノ酸～約220アミノ酸、約35アミノ酸～約200アミノ酸、約
35アミノ酸～約195アミノ酸、約35アミノ酸～約190アミノ酸、約35アミノ酸
～約185アミノ酸、約35アミノ酸～約180アミノ酸、約35アミノ酸～約175ア
ミノ酸、約35アミノ酸～約170アミノ酸、約35アミノ酸～約165アミノ酸、約3
5アミノ酸～約160アミノ酸、約35アミノ酸～約155アミノ酸、約35アミノ酸～
約150アミノ酸、約35アミノ酸～約145アミノ酸、約35アミノ酸～約140アミ
ノ酸、約35アミノ酸～約135アミノ酸、約35アミノ酸～約130アミノ酸、約35
アミノ酸～約125アミノ酸、約35アミノ酸～約120アミノ酸、約35アミノ酸～約
115アミノ酸、約35アミノ酸～約110アミノ酸、約35アミノ酸～約105アミノ
酸、約35アミノ酸～約100アミノ酸、約35アミノ酸～約95アミノ酸、約35アミ
ノ酸～約90アミノ酸、約35アミノ酸～約85アミノ酸、約35アミノ酸～約80アミ
ノ酸、約35アミノ酸～約75アミノ酸、約35アミノ酸～約70アミノ酸、約35アミ
ノ酸～約65アミノ酸、約35アミノ酸～約60アミノ酸、約35アミノ酸～約55アミ
ノ酸、約35アミノ酸～約50アミノ酸、約35アミノ酸～約45アミノ酸、約35アミ
ノ酸～約40アミノ酸、約40アミノ酸～約1000アミノ酸、約40アミノ酸～約95
0アミノ酸、約40アミノ酸～約900アミノ酸、約40アミノ酸～約850アミノ酸、
約40アミノ酸～約800アミノ酸、約40アミノ酸～約750アミノ酸、約40アミノ
酸～約700アミノ酸、約40アミノ酸～約650アミノ酸、約40アミノ酸～約600
アミノ酸、約40アミノ酸～約550アミノ酸、約40アミノ酸～約500アミノ酸、約
40アミノ酸～約450アミノ酸、約40アミノ酸～約400アミノ酸、約40アミノ酸
～約350アミノ酸、約40アミノ酸～約300アミノ酸、約40アミノ酸～約280ア
ミノ酸、約40アミノ酸～約260アミノ酸、約40アミノ酸～約240アミノ酸、約4
0アミノ酸～約220アミノ酸、約40アミノ酸～約200アミノ酸、約40アミノ酸～
約195アミノ酸、約40アミノ酸～約190アミノ酸、約40アミノ酸～約185アミ
ノ酸、約40アミノ酸～約180アミノ酸、約40アミノ酸～約175アミノ酸、約40
アミノ酸～約170アミノ酸、約40アミノ酸～約165アミノ酸、約40アミノ酸～約
160アミノ酸、約40アミノ酸～約155アミノ酸、約40アミノ酸～約150アミノ
酸、約40アミノ酸～約145アミノ酸、約40アミノ酸～約140アミノ酸、約40ア
ミノ酸～約135アミノ酸、約40アミノ酸～約130アミノ酸、約40アミノ酸～約1
25アミノ酸、約40アミノ酸～約120アミノ酸、約40アミノ酸～約115アミノ酸
、約40アミノ酸～約110アミノ酸、約40アミノ酸～約105アミノ酸、約40アミ
ノ酸～約100アミノ酸、約40アミノ酸～約95アミノ酸、約40アミノ酸～約90ア
ミノ酸、約40アミノ酸～約85アミノ酸、約40アミノ酸～約80アミノ酸、約40ア
ミノ酸～約75アミノ酸、約40アミノ酸～約70アミノ酸、約40アミノ酸～約65ア
ミノ酸、約40アミノ酸～約60アミノ酸、約40アミノ酸～約55アミノ酸、約40ア
ミノ酸～約50アミノ酸、約40アミノ酸～約45アミノ酸、約45アミノ酸～約100
0アミノ酸、約45アミノ酸～約950アミノ酸、約45アミノ酸～約900アミノ酸、
約45アミノ酸～約850アミノ酸、約45アミノ酸～約800アミノ酸、約45アミノ
酸～約750アミノ酸、約45アミノ酸～約700アミノ酸、約45アミノ酸～約650
アミノ酸、約45アミノ酸～約600アミノ酸、約45アミノ酸～約550アミノ酸、約
45アミノ酸～約500アミノ酸、約45アミノ酸～約450アミノ酸、約45アミノ酸
～約400アミノ酸、約45アミノ酸～約350アミノ酸、約45アミノ酸～約300ア

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

0 アミノ酸～約 800 アミノ酸、約 800 アミノ酸～約 1000 アミノ酸、約 800 アミノ酸～約 950 アミノ酸、約 800 アミノ酸～約 900 アミノ酸、約 800 アミノ酸～約 850 アミノ酸、約 850 アミノ酸～約 1000 アミノ酸、約 850 アミノ酸～約 950 アミノ酸、約 850 アミノ酸～約 900 アミノ酸、約 900 アミノ酸～約 1000 アミノ酸、約 900 アミノ酸～約 950 アミノ酸、または約 950 アミノ酸～約 1000 アミノ酸を有し得る。

【0337】

本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれも、 1×10^{-7} M 未満、 1×10^{-8} M 未満、 1×10^{-9} M 未満、 1×10^{-10} M 未満、 1×10^{-11} M 未満、 1×10^{-12} M 未満、または 1×10^{-13} M 未満の解離平衡定数 (K_D) でその標的に結合することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗原結合タンパク質構築物は、 1×10^{-3} M～約 1×10^{-5} M、約 1×10^{-4} M～約 1×10^{-6} M、約 1×10^{-5} M～約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-6} M～約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-7} M～約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-8} M～約 1×10^{-10} M、または約 1×10^{-9} M～約 1×10^{-11} M (その上限および下限も含む) の K_D で特定の抗原に結合することができる。

【0338】

本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれも、約 1 pM～約 30 nM (例えば、約 1 pM～約 25 nM、約 1 pM～約 20 nM、約 1 pM～約 15 nM、約 1 pM～約 10 nM、約 1 pM～約 5 nM、約 1 pM～約 2 nM、約 1 pM～約 1 nM、約 1 pM～約 950 pM、約 1 pM～約 900 pM、約 1 pM～約 850 pM、約 1 pM～約 800 pM、約 1 pM～約 750 pM、約 1 pM～約 700 pM、約 1 pM～約 650 pM、約 1 pM～約 600 pM、約 1 pM～約 550 pM、約 1 pM～約 500 pM、約 1 pM～約 450 pM、約 1 pM～約 400 pM、約 1 pM～約 350 pM、約 1 pM～約 300 pM、約 1 pM～約 250 pM、約 1 pM～約 200 pM、約 1 pM～約 150 pM、約 1 pM～約 100 pM、約 1 pM～約 90 pM、約 1 pM～約 80 pM、約 1 pM～約 70 pM、約 1 pM～約 60 pM、約 1 pM～約 50 pM、約 1 pM～約 40 pM、約 1 pM～約 30 pM、約 1 pM～約 20 pM、約 1 pM～約 10 pM、約 1 pM～約 5 pM、約 1 pM～約 4 pM、約 1 pM～約 3 pM、約 1 pM～約 2 pM、約 2 pM～約 30 nM、約 2 pM～約 25 nM、約 2 pM～約 20 nM、約 2 pM～約 15 nM、約 2 pM～約 10 nM、約 2 pM～約 5 nM、約 2 pM～約 2 nM、約 2 pM～約 1 nM、約 2 pM～約 950 pM、約 2 pM～約 900 pM、約 2 pM～約 850 pM、約 2 pM～約 800 pM、約 2 pM～約 750 pM、約 2 pM～約 700 pM、約 2 pM～約 650 pM、約 2 pM～約 600 pM、約 2 pM～約 550 pM、約 2 pM～約 500 pM、約 2 pM～約 450 pM、約 2 pM～約 400 pM、約 2 pM～約 350 pM、約 2 pM～約 300 pM、約 2 pM～約 250 pM、約 2 pM～約 200 pM、約 2 pM～約 150 pM、約 2 pM～約 100 pM、約 2 pM～約 90 pM、約 2 pM～約 80 pM、約 2 pM～約 70 pM、約 2 pM～約 60 pM、約 2 pM～約 50 pM、約 2 pM～約 40 pM、約 2 pM～約 30 pM、約 2 pM～約 20 pM、約 2 pM～約 10 pM、約 2 pM～約 5 pM、約 2 pM～約 4 pM、約 2 pM～約 3 pM、約 5 pM～約 30 nM、約 5 pM～約 25 nM、約 5 pM～約 20 nM、約 5 pM～約 15 nM、約 5 pM～約 10 nM、約 5 pM～約 5 nM、約 5 pM～約 2 nM、約 5 pM～約 1 nM、約 5 pM～約 950 pM、約 5 pM～約 900 pM、約 5 pM～約 850 pM、約 5 pM～約 800 pM、約 5 pM～約 750 pM、約 5 pM～約 700 pM、約 5 pM～約 650 pM、約 5 pM～約 600 pM、約 5 pM～約 550 pM、約 5 pM～約 500 pM、約 5 pM～約 450 pM、約 5 pM～約 400 pM、約 5 pM～約 350 pM、約 5 pM～約 300 pM、約 5 pM～約 250 pM、約 5 pM～約 200 pM、約 5 pM～約 150 pM、約 5 pM～約 100 pM、約 5 pM～約 90 pM、約 5 pM～約 80 pM、約 5 pM～約 70 pM、約 5 pM～約 60 pM、約 5 pM～約 50 pM、約 5 pM～約 40 pM、約 5 pM～約 30 pM、約 5 pM～約 20 pM、約 5 pM～約 10 pM、約 10 pM～約 30 nM、約 10 pM～約 2

10

20

30

40

50

5 nM、約10 pM～約20 nM、約10 pM～約15 nM、約10 pM～約10 nM、
約10 pM～約5 nM、約10 pM～約2 nM、約10 pM～約1 nM、約10 pM～約
950 pM、約10 pM～約900 pM、約10 pM～約850 pM、約10 pM～約8
00 pM、約10 pM～約750 pM、約10 pM～約700 pM、約10 pM～約65
0 pM、約10 pM～約600 pM、約10 pM～約550 pM、約10 pM～約500
pM、約10 pM～約450 pM、約10 pM～約400 pM、約10 pM～約350 p
M、約10 pM～約300 pM、約10 pM～約250 pM、約10 pM～約200 pM
、約10 pM～約150 pM、約10 pM～約100 pM、約10 pM～約90 pM、約
10 pM～約80 pM、約10 pM～約70 pM、約10 pM～約60 pM、約10 pM
～約50 pM、約10 pM～約40 pM、約10 pM～約30 pM、約10 pM～約20
pM、約15 pM～約30 nM、約15 pM～約25 nM、約15 pM～約20 nM、約
15 pM～約15 nM、約15 pM～約10 nM、約15 pM～約5 nM、約15 pM～
約2 nM、約15 pM～約1 nM、約15 pM～約950 pM、約15 pM～約900 p
M、約15 pM～約850 pM、約15 pM～約800 pM、約15 pM～約750 pM
、約15 pM～約700 pM、約15 pM～約650 pM、約15 pM～約600 pM、
約15 pM～約550 pM、約15 pM～約500 pM、約15 pM～約450 pM、約
15 pM～約400 pM、約15 pM～約350 pM、約15 pM～約300 pM、約15
pM～約250 pM、約15 pM～約200 pM、約15 pM～約150 pM、約15
pM～約100 pM、約15 pM～約90 pM、約15 pM～約80 pM、約15 pM～
約70 pM、約15 pM～約60 pM、約15 pM～約50 pM、約15 pM～約40 p
M、約15 pM～約30 pM、約15 pM～約20 pM、約20 pM～約30 nM、約2
0 pM～約25 nM、約20 pM～約20 nM、約20 pM～約15 nM、約20 pM～
約10 nM、約20 pM～約5 nM、約20 pM～約2 nM、約20 pM～約1 nM、約
20 pM～約950 pM、約20 pM～約900 pM、約20 pM～約850 pM、約2
0 pM～約800 pM、約20 pM～約750 pM、約20 pM～約700 pM、約20
pM～約650 pM、約20 pM～約600 pM、約20 pM～約550 pM、約20 p
M～約500 pM、約20 pM～約450 pM、約20 pM～約400 pM、約20 pM
～約350 pM、約20 pM～約300 pM、約20 pM～約250 pM、約20 pM～
約20 pM、約200 pM～約150 pM、約20 pM～約100 pM、約20 pM～約
90 pM、約20 pM～約80 pM、約20 pM～約70 pM、約20 pM～約60 pM
、約20 pM～約50 pM、約20 pM～約40 pM、約20 pM～約30 pM、約30
pM～約30 nM、約30 pM～約25 nM、約30 pM～約30 nM、約30 pM～約
15 nM、約30 pM～約10 nM、約30 pM～約5 nM、約30 pM～約2 nM、約
30 pM～約1 nM、約30 pM～約950 pM、約30 pM～約900 pM、約30 p
M～約850 pM、約30 pM～約800 pM、約30 pM～約750 pM、約30 pM
～約700 pM、約30 pM～約650 pM、約30 pM～約600 pM、約30 pM～
約550 pM、約30 pM～約500 pM、約30 pM～約450 pM、約30 pM～約
400 pM、約30 pM～約350 pM、約30 pM～約300 pM、約30 pM～約2
50 pM、約30 pM～約200 pM、約30 pM～約150 pM、約30 pM～約10
0 pM、約30 pM～約90 pM、約30 pM～約80 pM、約30 pM～約70 pM、
約30 pM～約60 pM、約30 pM～約50 pM、約30 pM～約40 pM、約40 p
M～約30 nM、約40 pM～約25 nM、約40 pM～約30 nM、約40 pM～約1
5 nM、約40 pM～約10 nM、約40 pM～約5 nM、約40 pM～約2 nM、約4
0 pM～約1 nM、約40 pM～約950 pM、約40 pM～約900 pM、約40 pM
～約850 pM、約40 pM～約800 pM、約40 pM～約750 pM、約40 pM～
約700 pM、約40 pM～約650 pM、約40 pM～約600 pM、約40 pM～約
550 pM、約40 pM～約500 pM、約40 pM～約450 pM、約40 pM～約4
00 pM、約40 pM～約350 pM、約40 pM～約300 pM、約40 pM～約25
0 pM、約40 pM～約200 pM、約40 pM～約150 pM、約40 pM～約100
pM、約40 pM～約90 pM、約40 pM～約80 pM、約40 pM～約70 pM、約

10

20

30

40

50

40 pM～約60 pM、約40 pM～約50 pM、約50 pM～約30 nM、約50 pM
～約25 nM、約50 pM～約30 nM、約50 pM～約15 nM、約50 pM～約10
nM、約50 pM～約5 nM、約50 pM～約2 nM、約50 pM～約1 nM、約50 p
M～約950 pM、約50 pM～約900 pM、約50 pM～約850 pM、約50 pM
～約800 pM、約50 pM～約750 pM、約50 pM～約700 pM、約50 pM～
約650 pM、約50 pM～約600 pM、約50 pM～約550 pM、約50 pM～約
500 pM、約50 pM～約450 pM、約50 pM～約400 pM、約50 pM～約3
50 pM、約50 pM～約300 pM、約50 pM～約250 pM、約50 pM～約20
0 pM、約50 pM～約150 pM、約50 pM～約100 pM、約50 pM～約90 p
M、約50 pM～約80 pM、約50 pM～約70 pM、約50 pM～約60 pM、約6
0 pM～約30 nM、約60 pM～約25 nM、約60 pM～約30 nM、約60 pM～
約15 nM、約60 pM～約10 nM、約60 pM～約5 nM、約60 pM～約2 nM、
約60 pM～約1 nM、約60 pM～約950 pM、約60 pM～約900 pM、約60
pM～約850 pM、約60 pM～約800 pM、約60 pM～約750 pM、約60 p
M～約700 pM、約60 pM～約650 pM、約60 pM～約600 pM、約60 pM
～約550 pM、約60 pM～約500 pM、約60 pM～約450 pM、約60 pM～
約400 pM、約60 pM～約350 pM、約60 pM～約300 pM、約60 pM～約
250 pM、約60 pM～約200 pM、約60 pM～約150 pM、約60 pM～約1
00 pM、約60 pM～約90 pM、約60 pM～約80 pM、約60 pM～約70 pM
、約70 pM～約30 nM、約70 pM～約25 nM、約70 pM～約30 nM、約70
pM～約15 nM、約70 pM～約10 nM、約70 pM～約5 nM、約70 pM～約2
nM、約70 pM～約1 nM、約70 pM～約950 pM、約70 pM～約900 pM、
約70 pM～約850 pM、約70 pM～約800 pM、約70 pM～約750 pM、約
70 pM～約700 pM、約70 pM～約650 pM、約70 pM～約600 pM、約7
0 pM～約550 pM、約70 pM～約500 pM、約70 pM～約450 pM、約70
pM～約400 pM、約70 pM～約350 pM、約70 pM～約300 pM、約70 p
M～約250 pM、約70 pM～約200 pM、約70 pM～約150 pM、約70 pM
～約100 pM、約70 pM～約90 pM、約70 pM～約80 pM、約80 pM～約3
0 nM、約80 pM～約25 nM、約80 pM～約30 nM、約80 pM～約15 nM、
約80 pM～約10 nM、約80 pM～約5 nM、約80 pM～約2 nM、約80 pM～
約1 nM、約80 pM～約950 pM、約80 pM～約900 pM、約80 pM～約85
0 pM、約80 pM～約800 pM、約80 pM～約750 pM、約80 pM～約700
pM、約80 pM～約650 pM、約80 pM～約600 pM、約80 pM～約550 p
M、約80 pM～約500 pM、約80 pM～約450 pM、約80 pM～約400 pM
、約80 pM～約350 pM、約80 pM～約300 pM、約80 pM～約250 pM、
約80 pM～約200 pM、約80 pM～約150 pM、約80 pM～約100 pM、約
80 pM～約90 pM、約90 pM～約30 nM、約90 pM～約25 nM、約90 pM
～約30 nM、約90 pM～約15 nM、約90 pM～約10 nM、約90 pM～約5 n
M、約90 pM～約2 nM、約90 pM～約1 nM、約90 pM～約950 pM、約90
pM～約900 pM、約90 pM～約850 pM、約90 pM～約800 pM、約90 p
M～約750 pM、約90 pM～約700 pM、約90 pM～約650 pM、約90 pM
～約600 pM、約90 pM～約550 pM、約90 pM～約500 pM、約90 pM～
約450 pM、約90 pM～約400 pM、約90 pM～約350 pM、約90 pM～約
300 pM、約90 pM～約250 pM、約90 pM～約200 pM、約90 pM～約1
50 pM、約90 pM～約100 pM、約100 pM～約30 nM、約100 pM～約2
5 nM、約100 pM～約30 nM、約100 pM～約15 nM、約100 pM～約10
nM、約100 pM～約5 nM、約100 pM～約2 nM、約100 pM～約1 nM、約
100 pM～約950 pM、約100 pM～約900 pM、約100 pM～約850 pM
、約100 pM～約800 pM、約100 pM～約750 pM、約100 pM～約700
pM、約100 pM～約650 pM、約100 pM～約600 pM、約100 pM～約5

10

20

30

40

50

50

pM、約800pM～約850pM、約900pM～約30nM、約900pM～約25nM、約900pM～約30nM、約900pM～約15nM、約900pM～約10nM、約900pM～約5nM、約900pM～約2nM、約900pM～約1nM、約900pM～約950pM、約1nM～約30nM、約1nM～約25nM、約1nM～約20nM、約1nM～約15nM、約1nM～約10nM、約1nM～約5nM、約2nM～約30nM、約2nM～約25nM、約2nM～約20nM、約2nM～約15nM、約2nM～約10nM、約2nM～約5nM、約4nM～約30nM、約4nM～約25nM、約4nM～約20nM、約4nM～約15nM、約4nM～約10nM、約4nM～約5nM、約5nM～約30nM、約5nM～約25nM、約5nM～約20nM、約5nM～約15nM、約5nM～約10nM、約10nM～約30nM、約10nM～約25nM、約10nM～約20nM、約10nM～約15nM、約15nM～約30nM、約15nM～約25nM、約15nM～約20nM、約20nM～約30nM、および約20nM～約25nM)の K_D でその標的に結合することができる。

【0339】

本明細書に記載の標的結合ドメインのうちのいずれも、約1nM～約10nM（例えば、約1nM～約9nM、約1nM～約8nM、約1nM～約7nM、約1nM～約6nM、約1nM～約5nM、約1nM～約4nM、約1nM～約3nM、約1nM～約2nM、約2nM～約10nM、約2nM～約9nM、約2nM～約8nM、約2nM～約7nM、約2nM～約6nM、約2nM～約5nM、約2nM～約4nM、約2nM～約3nM、約3nM～約10nM、約3nM～約9nM、約3nM～約8nM、約3nM～約7nM、約3nM～約6nM、約3nM～約5nM、約3nM～約4nM、約4nM～約10nM、約4nM～約9nM、約4nM～約8nM、約4nM～約7nM、約4nM～約6nM、約4nM～約5nM、約5nM～約10nM、約5nM～約9nM、約5nM～約8nM、約5nM～約7nM、約5nM～約6nM、約6nM～約10nM、約6nM～約9nM、約6nM～約8nM、約6nM～約7nM、約7nM～約10nM、約7nM～約9nM、約7nM～約8nM、約8nM～約10nM、約8nM～約9nM、および約9nM～約10nM)の K_D でその標的に結合することができる。

【0340】

当該技術分野で既知の様々な異なる方法を使用して、本明細書に記載の抗原結合タンパク質構築物のうちのいずれの K_D 値も決定することができる（例えば、電気泳動移動度シフトアッセイ、フィルター結合アッセイ、表面プラズモン共鳴、および生体分子結合反応速度アッセイ等）。

【0341】

抗原結合ドメイン

本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じ抗原に特異的に結合する。これらの一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0342】

本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、異なる抗原に特異的に結合する。

【0343】

本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメインである。本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラ

ポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単ドメイン抗体（例えば、V_aH_HまたはV_NA_RDドメイン）を含むか、またはそれである。

【0344】

いくつかの例では、抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の抗原結合ドメインのうちのいずれか）は、CD16a（例えば、米国特許第9,035,026号に記載のものを参照のこと）、CD28（例えば、米国特許第7,723,482号に記載のものを参照のこと）、CD3（例えば、米国特許第9,226,962号に記載のものを参照のこと）、CD33（例えば、米国特許第8,759,494号に記載のものを参照のこと）、CD20（例えば、WO2014/026054に記載のものを参照のこと）、CD19（例えば、米国特許第9,701,758号に記載のものを参照のこと）、CD22（例えば、WO2003/104425に記載のものを参照のこと）、CD123（例えば、WO2014/130635に記載のものを参照のこと）、IL-1R（例えば、米国特許第8,741,604号に記載のものを参照のこと）、IL-1（例えば、WO2014/095808に記載のものを参照のこと）、VEGF（例えば、米国特許第9,090,684号に記載のものを参照のこと）、IL-6R（例えば、米国特許第7,482,436号に記載のものを参照のこと）、IL-4（例えば、米国特許出願公開第2012/0171197号に記載のものを参照のこと）、IL-10（例えば、米国特許出願公開第2016/0340413第号に記載のものを参照のこと）、PDL-1（例えば、Drees et al., Protein Express. Purif. 94:60-66, 2014に記載のものを参照のこと）、TIGIT（例えば、米国特許出願公開第2017/0198042号に記載のものを参照のこと）、PD-1（例えば、米国特許第7,488,802号に記載のものを参照のこと）、TIM3（例えば、米国特許第8,552,156号に記載のものを参照のこと）、CTLA4（例えば、WO2012/120125に記載のものを参照のこと）、MICA（例えば、WO2016/154585に記載のものを参照のこと）、MICB（例えば、米国特許第8,753,640号に記載のものを参照のこと）、IL-6（例えば、Gejima et al., Human Antibodies 11(4):121-129, 2002に記載のものを参照のこと）、IL-8（例えば、米国特許第6,117,980号に記載のものを参照のこと）、TNF α （例えば、Geng et al., Immunol. Res. 62(3):377-385, 2015に記載のものを参照のこと）、CD26（例えば、WO2017/189526に記載のものを参照のこと）、CD36（例えば、米国特許出願公開第2015/0259429号に記載のものを参照のこと）、ULBP2（例えば、米国特許第9,273,136号に記載のものを参照のこと）、CD30（例えば、Homach et al., Scand. J. Immunol. 48(5):497-501, 1998に記載のものを参照のこと）、CD200（例えば、米国特許第9,085,623号に記載のものを参照のこと）、IGF-1R（例えば、米国特許出願公開第2017/0051063号に記載のものを参照のこと）、MUC4AC（例えば、WO2012/170470に記載のものを参照のこと）、MUC5AC（例えば、米国特許第9,238,084号に記載のものを参照のこと）、Trop-2（例えば、WO2013/068946に記載のものを参照のこと）、CMET（例えば、Edwardraja et al., Biotechnol. Bioeng. 106(3):367-375, 2010に記載のものを参照のこと）、EGFR（例えば、Akbari et al., Protein Expr. Purif. 127:8-15, 2016に記載のものを参照のこと）、HER1（例えば、米国特許出願公開第2013/0274446号に記載のものを参照のこと）、HER2（例えば、Cao et al., Biotechnol. Lett. 37(7):1347-1354, 2015に記載のものを参照のこと）、HER3（例えば、米国特許第9,505,843号に記載のものを参照のこと）、PSMA（例えば、Parker et al., Protein Expr. Purif. 89(2):136-145, 2013に記載のものを参照のこと）、CEA（例えば、W

10

20

30

40

50

01995/015341に記載のものを参照のこと)、B7H3 (例えば、米国特許第9,371,395号に記載のものを参照のこと)、EPCAM (例えば、WO2014/159531に記載のものを参照のこと)、BCMA (例えば、Smith et al., Mol. Ther. 26(6):1447-1456, 2018に記載のものを参照のこと)、P-カドヘリン (例えば、米国特許第7,452,537号に記載のものを参照のこと)、CEACAM5 (例えば、米国特許第9,617,345号に記載のものを参照のこと)、UL16結合タンパク質 (例えば、WO2017/083612に記載のものを参照のこと)、HLA-DR (例えば、Pistillo et al., Exp. Clin. Immunogenet. 14(2):123-130, 1997を参照のこと)、DLL4 (例えば、WO2014/007513に記載のものを参照のこと)、TYRO3 (例えば、WO2016/166348に記載のものを参照のこと)、AXL (例えば、WO2012/175692に記載のものを参照のこと)、MER (例えば、WO2016/106221に記載のものを参照のこと)、CD122 (例えば、米国特許出願公開第2016/0367664号に記載のものを参照のこと)、CD155 (例えば、WO2017/149538に記載のものを参照のこと)、またはPDGFR- α (例えば、米国特許第9,441,034号に記載のものを参照のこと)のうちのいずれか1つに特異的に結合することができる。

【0345】

本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかに存在する抗原結合ドメインは各々独立して、VHHドメイン、VNARDドメイン、およびscFvからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ドメインのうちのいずれかは、BiTE、(scFv)₂、ナノボディ、ナノボディー-HSA、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH3、scFv-CH-CL-scFv、HSAbody、scDiabody-HAS、またはタンデム-scFvである。一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかで使用され得る抗原結合ドメインの追加の例は、当該技術分野で既知である。

【0346】

VHHドメインは、ラクダ科動物に見られ得る単一単量体可変抗体ドメインである。VNARDドメインは、軟骨魚類に見られ得る単一単量体可変抗体ドメインである。VHHドメインおよびVNARDドメインの非限定的な態様は、例えば、Cromie et al., Curr. Top. Med. Chem. 15:2543-2557, 2016、De Genst et al., Dev. Comp. Immunol. 30:187-198, 2006、De Meyer et al., Trends Biotechnol. 32:263-270, 2014、Kijanka et al., Nanomedicine 10:161-174, 2015、Kovaleva et al., Expert. Opin. Biol. Ther. 14:1527-1539, 2014、Krah et al., Immunopharmacol. _ Immunotoxicol. 38:21-28, 2016、Mujic-Delic et al., Trends Pharmacol. Sci. 35:247-255, 2014、Muyldermans, J. Biotechnol. 74:277-302, 2001、Muyldermans et al., Trends Biochem. Sci. 26:230-235, 2001、Muyldermans, Ann. Rev. Biochem. 82:775-797, 2013、Rahbarizadeh et al., Immunol. Invest. 40:299-338, 2011、Van Audenhove et al., EBioMedicine 8:40-48, 2016、Van Bockstaele et al., Curr. Opin. Investig. Drugs 10:1212-1224, 2009、Vincke et al., Methods Mol. Biol. 911:15-26, 2012、およびWesolowski et al., Med. Microbiol. Immunol. 198:157-174, 2009に記載されている。

【0347】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチド内の抗原結合ドメインは各々、いずれもVHHドメインであるか、または少なくとも1つの抗原結合ドメインがVHHドメインである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチド内の抗原結合ドメインは各々、いずれもVNARDドメインであるか、または少なくとも1つの抗原結合ドメインがVNARDドメインである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチド内の抗原結合ドメインは各々、いずれもscFvドメインであるか、または少なくとも1つの抗原結合ドメインがscFvドメインである。

【0348】

いくつかの実施形態では、一本鎖または多鎖キメラポリペプチドに存在する2つ以上のポリペプチドは、集合して（例えば、非共有結合的に集合して）、本明細書に記載の抗原結合ドメインのうちのいずれか、例えば、抗体の抗原結合断片（例えば、本明細書に記載の抗体の抗原結合断片のうちのいずれか）、VHH-scAb、VHH-Fab、二重scFab、F(ab')₂、ダイアボディ、crossMab、DAF（ツースインワン）、DAF（フォーインワン）、DutaMab、DT-IgG、ノブ・イン・ホール共通軽鎖、ノブ・イン・ホール集合体、電荷対、Fabアーム交換、SEEDbody、LUZ-Y、Fcab、κλ-ボディ、直交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody、DVI-IgG、ダイアボディー-CH₃、トリプルボディ、ミノ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH₃ KIH、Fab-scFv、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価HCAb、scダイアボディー-Fc、ダイアボディー-Fc、タンデムscFv-Fc、イントラボディ、ドック・アンド・ロック、lmmTAC、IgG-IgGコンジュゲート、Cov-X-Body、およびscFv1-PEG-scFv2を形成することができる。これらの要素の説明については、例えば、全体が本明細書に組み込まれるSpies et al., Mol. Immunol. 67:95-106, 2015を参照されたい。抗体の抗原結合断片の非限定的な例には、Fv断片、Fab断片、F(ab')₂断片、およびFab'断片が挙げられる。抗体の抗原結合断片の追加の例は、IgGの抗原結合断片（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の抗原結合断片）（例えば、ヒトまたはヒト化IgG、例えば、ヒトまたはヒト化IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の抗原結合断片）、IgAの抗原結合断片（例えば、IgA1またはIgA2の抗原結合断片）（例えば、ヒトまたはヒト化IgA、例えば、ヒトまたはヒト化IgA1またはIgA2の抗原結合断片）、IgDの抗原結合断片（例えば、ヒトまたはヒト化IgDの抗原結合断片）、IgEの抗原結合断片（例えば、ヒトまたはヒト化IgEの抗原結合断片）、またはIgMの抗原結合断片（例えば、ヒトまたはヒト化IgMの抗原結合断片）である。

【0349】

「Fv」断片は、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインを有する非共有結合二量体を含む。

【0350】

「Fab」断片は、Fv断片の重鎖および軽鎖可変ドメインに加えて、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン（CH₁）を含む。

【0351】

「F(ab')₂」断片には、ヒンジ領域の近くでジスルフィド結合によって結合された2つのFab断片が含まれる。

【0352】

「二重可変ドメイン免疫グロブリン」または「DVD-Ig」とは、例えば、各々参照により全体が組み込まれる、DiGiammarino et al., Methods

10

20

30

40

50

Mol. Biol. 899:145-156, 2012、Jakob et al., MABS 5:358-363, 2013、および米国特許第7,612,181号、同第8,258,268号、同第8,586,714号、同第8,716,450号、同第8,722,855号、同第8,735,546号、および同第8,822,645号に記載の多価および多重特異性結合タンパク質を指す。

【0353】

DARTは、例えば、Garber, Nature Reviews Drug Discovery 13:799-801, 2014に記載されている。

【0354】

本明細書に記載の抗原結合ドメインのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、タンパク質、炭水化物、脂質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される抗原に結合することができる。

10

【0355】

抗原結合ドメインの追加の例および態様は、当該技術分野で既知である。

【0356】

可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質

本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキンタンパク質または可溶性サイトカインタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、可溶性インターロイキンまたは可溶性サイトカインタンパク質は、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFの群から選択される。可溶性IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFの非限定的な例が、以下に提供される。

20

ヒト可溶性IL-3（配列番号105）

apmtqtptlkt swvncsnmid eiithlkqpp lpplldfnnln gedqdilmen
nlrrpnleaf nrvkslqna saiesilkn1 lpclplataa ptrhpihikd
gdwnefrkr1 tfylktlena qaqqttsla if

30

ヒト可溶性IL-8（配列番号106）

egavlprsak elrcqckty skpfhpkfik elrviesgph canteiivkl
sdgrelcldp kenwvqrvve kflkraens

ヒト可溶性IL-10（配列番号107）

spgqgtqsensc thfpgnlpnm lrdlrdafsr vktffqmkdq ldnlllkesl
ledfkgylgc qalsemiqfy leevmpqaen qdpdikahvn slgenlktlr
lrlrrchrfl pcenkskave qvknafnklq ekgiykamse fdifinyiea
ymtmkirn

40

ヒト可溶性IL-17（配列番号108）

gitiprn pgcpnsedkn fprtvmvnl1 ihnrntntnp krssdyynrs
tspwnlhrne dperypsviw eakcrhlgi nadgnvdyhm nsvpiqqeil
vlrrepphpc nsfrlekilv svgctcvtpi vhhva

ヒト可溶性IL-18（配列番号109）

50

yfgklesklsvirn lndqvlfidq gnrplfedmt dsdcrdnapr tifiismykd
sqprgmavti svkcekistl scenkiisfk emnppdnikd tksdiiffqr
svpghdnkmq fesssyegyf lacekerdlf klilkkedel gdrsimftvq ned

ヒト可溶性PDGF-DD (配列番号110)

rdtsatpqsasi kalrnanlrr desnhltdly rrdetiqvkg ngyvqsprfp
nsyprnlllt wrlhsqentr iqlvfdnqfg leeaendicr ydfvevedis
etstiirgrw cghkevppri ksrtngikit fksddyfvak pgfkiiysll
edfqpaaase tnwesvtssi sgvsynspsv tdptliadal dkkiaefdtv
edllkyfnpe swqedlenmy ldtpryrgrs yhdrkskvd1 drlnddakry
sctprnysvn ireelklanv vffprcllvq rcggnccgct vnwrscctns
gktvkkyhev lqfepghikr rgraktmalv diqldhherc dcicssrppr

10

ヒト可溶性SCF (配列番号111)

egicrnrvtnnvkdv tkivanlpkd ymitlkyvpg mdvlpshcwi semvvqlsds
ltdlldkfsn iseglsnysi idklvnivdd lvecvkeness kdlkksfksp
eprlftpeef frifnrsida fkdfvvaset sdcvvsstls pekdsrvsvt
kpfmlppvaa sslrndssss nrkaknppgd sslhwaamal palfsliigf
afgalywkkrr qpsltraven iqineednei smlqekeref gev

20

ヒト可溶性FLT3L (配列番号112)

tqdcsfqhspissd favkirelsd yllqdypvtv asnlqdealc gglwrlvlaq
rwmerlktva gskmqgller vnteihfvtk cafqpppscl rfvtqtnisrl
lqetseqqlva lkpwithrqnf srclelqcqp dsstlpppws prpleatapt
apqppllllll llpvgllllla aawclhwqrt rrrtprpgeq vppvpspql
llveh

30

【0357】

可溶性インターロイキンタンパク質および可溶性サイトカインタンパク質の追加の例は、当該技術分野で既知である。

【0358】

可溶性受容体

40

本明細書に記載の一本鎖または多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性インターロイキン受容体または可溶性サイトカイン受容体である。いくつかの実施形態では、可溶性受容体は、可溶性TGF-β受容体II (TGF-β RII) である (例えば、Yung et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 194 (9) : 1140-1151, 2016に記載のものを参照のこと)、可溶性TGF-β RIII (例えば、Heng et al., Placenta 57 : 320, 2017に記載のものを参照のこと)、可溶性NKG2D (例えば、Cosman et al., Immunity 14 (2) : 123-133, 2001、Costa et al., Front. Immunol., Vol. 9, Article 1150, May

50

29, 2018、doi:10.3389/fimmu.2018.01150を参照のこと)、可溶性NKp30 (例えば、Costa et al., Front. Immunol., Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018、doi:10.3389/fimmu.2018.01150を参照のこと)、可溶性NKp44 (例えば、Costa et al., Front. Immunol., Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018、doi:10.3389/fimmu.2018.01150に記載のものを参照のこと)、可溶性NKp46 (例えば、Mandelboim et al., Nature 409:1055-1060, 2001、Costa et al., Front. Immunol., Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018、doi:10.3389/fimmu.2018.01150を参照のこと)、可溶性DNAM1 (例えば、Costa et al., Front. Immunol., Vol. 9, Article 1150, May 29, 2018、doi:10.3389/fimmu.2018.01150に記載のものを参照のこと)、scMHCI (例えば、Washburn et al., PLoS One 6(3):e18439, 2011に記載のものを参照のこと)、scMHCI (例えば、Bishwajit et al., Cellular Immunol. 170(1):25-33, 1996に記載のものを参照のこと)、scTCR (例えば、Weber et al., Nature 356(6372):793-796, 1992に記載のものを参照のこと)、可溶性CD155 (例えば、Tahara-Hanaoka et al., Int. Immunol. 16(4):533-538, 2004に記載のものを参照のこと)、または可溶性CD28 (例えば、Hebbar et al., Clin. Exp. Immunol. 136:388-392, 2004に記載のものを参照のこと)。

【0359】

可溶性インターロイキン受容体および可溶性サイトカイン受容体の追加の例は、当該技術分野で既知である。

【0360】

一対の親和性ドメイン

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドは、1) 一対の親和性ドメインの第1のドメインを含む第1のキメラポリペプチドと、2) 一対の親和性ドメインの第2のドメインを含む第2のキメラポリペプチドとを含み、これにより、第1のキメラポリペプチドおよび第2のキメラポリペプチドが一対の親和性ドメインの第1のドメインおよび第2のドメインの結合を介して会合するようになる。いくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、ヒトIL-15受容体アルファ鎖(IL-15R α)由来のsushiドメインと可溶性IL-15である。sushiドメイン、別名、ショートコンセンサスリピートまたは1型糖タンパク質モチーフは、タンパク質-タンパク質相互作用の一般的なモチーフである。sushiドメインは、補体成分C1r、C1s、H因子、C2m、ならびに非免疫学的分子第XIII因子および β 2-糖タンパク質を含むいくつかのタンパク質結合分子上で特定されている。典型的なSushiドメインは、およそ60個のアミノ酸残基を有し、4つのシステインを含む(Ranganathan, Pac. Symp Biocomput. 2000:155-67)。第1のシステインは第3のシステインとジスルフィド結合を形成することができ、第2のシステインは第4のシステインとジスルフィド架橋を形成することができる。一対の親和性ドメインの一方のメンバーが可溶性IL-15であるいくつかの実施形態では、可溶性IL-15は、D8NまたはD8Aアミノ酸置換を有する。一対の親和性ドメインの一方のメンバーがヒトIL-15受容体アルファ鎖(IL-15R α)であるいくつかの実施形態では、ヒトIL-15R α は、成熟全長IL-15R α である。いくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、バルナーゼとバルンスターである。いくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、PKAとAKAPである。いくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、変異RNase I断片に基づくアダプター/ドッキングタグモジュール(Rossi, Proc Na

10

20

30

40

50

tl Acad Sci USA. 103:6841-6846, 2006, Sharkey et al., Cancer Res. 68:5282-5290, 2008, Rossi et al., Trends Pharmacol Sci. 33:474-481, 2012)、またはタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトレビン、およびSNAP25の相互作用に基づくSNAREモジュール(Deyev et al., Nat Biotechnol. 1486-1492, 2003)である。

【0361】

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチドは、一对の親和性ドメインの第1のドメインを含み、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチドは、一对の親和性ドメインの第2のドメインを含み、一对の親和性ドメインの第1のドメインと一对の親和性ドメインの第2のドメインは、 1×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、 1×10^{-11} M未満、 1×10^{-12} M未満、または 1×10^{-13} M未満の解離平衡定数(K_D)で互いに結合する。いくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第1のドメインと一对の親和性ドメインの第2のドメインは、約 1×10^{-4} M~約 1×10^{-6} M、約 1×10^{-5} M~約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-6} M~約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-7} M~約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-8} M~約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-9} M~約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-10} M~約 1×10^{-12} M、約 1×10^{-11} M~約 1×10^{-13} M、約 1×10^{-4} M~約 1×10^{-5} M、約 1×10^{-5} M~約 1×10^{-6} M、約 1×10^{-6} M~約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-7} M~約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} M~約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-9} M~約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-10} M~約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-11} M~約 1×10^{-12} M、または約 1×10^{-12} M~約 1×10^{-13} M(その上限および下限も含む)の K_D で互いに結合する。当該技術分野で既知の様々な異なる方法のうちのいずれかを使用して、一对の親和性ドメインの第1のドメインおよび一对の親和性ドメインの第2のドメインの結合の K_D 値を決定することができる(例えば、電気泳動移動度シフトアッセイ、フィルター結合アッセイ、表面プラズモン共鳴、および生体分子結合反応速度アッセイ等)。

【0362】

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチドは、一对の親和性ドメインの第1のドメインを含み、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチドは、一对の親和性ドメインの第2のドメインを含み、一对の親和性ドメインの第1のドメイン、一对の親和性ドメインの第2のドメイン、またはそれらの両方が、約10~100アミノ酸長である。例えば、一对の親和性ドメインの第1のドメイン、一对の親和性ドメインの第2のドメイン、またはそれらの両方が、約10~100アミノ酸長、約15~100アミノ酸長、約20~100アミノ酸長、約25~100アミノ酸長、約30~100アミノ酸長、約35~100アミノ酸長、約40~100アミノ酸長、約45~100アミノ酸長、約50~100アミノ酸長、約55~100アミノ酸長、約60~100アミノ酸長、約65~100アミノ酸長、約70~100アミノ酸長、約75~100アミノ酸長、約80~100アミノ酸長、約85~100アミノ酸長、約90~100アミノ酸長、約95~100アミノ酸長、約10~95アミノ酸長、約10~90アミノ酸長、約10~85アミノ酸長、約10~80アミノ酸長、約10~75アミノ酸長、約10~70アミノ酸長、約10~65アミノ酸長、約10~60アミノ酸長、約10~55アミノ酸長、約10~50アミノ酸長、約10~45アミノ酸長、約10~40アミノ酸長、約10~35アミノ酸長、約10~30アミノ酸長、約10~25アミノ酸長、約10~20アミノ酸長、約10~15アミノ酸長、約20~30アミノ酸長、約30~40アミノ酸長、約40から50アミノ酸長、約50~60アミノ酸長、約60~70アミノ酸長、約70から80アミノ酸長、約80から90アミノ酸長、約90~100アミノ酸長、約20~90アミノ酸長、約30~80アミノ酸長、約40~70アミノ酸長、約50~60アミノ酸長、またはそれらの間の任意の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第1のドメイン、一对の親和性ドメインの第2のドメ

イン、またはそれらの両方が、約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸長である。

【0363】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される一対の親和性ドメインの第1および／または第2のドメインのうちのいずれかは、一対の親和性ドメインの第1および／または第2のドメインの機能が損なわれないままである限り、そのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加のアミノ酸（例えば、1、2、3、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ酸）を含み得る。例えば、ヒトIL-15受容体アルファ鎖（IL-15R α ）由来のsushiドメインは、可溶性IL-15に結合する能力を依然として保持しながら、N末端および／またはC末端に1つ以上の追加のアミノ酸を含むことができる。加えてまたはあるいは、可溶性IL-15は、ヒトIL-15受容体アルファ鎖（IL-15R α ）由来のsushiドメインに結合する能力を依然として保持しながら、N末端および／またはC末端に1つ以上の追加のアミノ酸を含むことができる。

【0364】

IL-15受容体アルファ鎖のアルファ鎖（IL-15R α ）由来のsushiドメインの非限定的な例は、ITCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R（配列番号113）と少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、IL-15R α アルファ鎖由来のsushiドメインは、ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGAGACACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG（配列番号114）を含む核酸によってコードされる。

【0365】

いくつかの実施形態では、可溶性IL-15は、NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKCFLLLELQVISLES GDA SIHDTV ENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQS FVHI VQMFINTS（配列番号115）と少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、可溶性IL-15は、AACTGGGTGAACGTCA TCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATT CAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGAAATTTAATCATTTTAGCCAATAAC TCTTTATATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAGAACATCAAGGAGTT TCTGCAATCCTTTGTGCACATTTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号116）の配列を含む核酸によってコードされ得る。

【0366】

シグナル配列

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、そのN末端にシグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドは、そのN末端にシグナル配列を含む第1のキメラポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドは、そのN末端にシグナル配列を含む第2のキメラポリペプチドを含む。いくつかの

実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチドおよび多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチドの両方がシグナル配列を含む。当業者に理解されるように、シグナル配列は、タンパク質を分泌経路に指向するいくつかの内因的に産生されたタンパク質のN末端に存在するアミノ酸配列である（例えば、タンパク質は、ある特定の細胞内オルガネラに存在するか、細胞膜に存在するか、または細胞から分泌されるように指示される）。シグナル配列は不均一であり、それらの一次アミノ酸配列が大きく異なる。しかしながら、シグナル配列は、典型的には、16～30アミノ酸長であり、親水性の通常は正に帯電したN末端領域、中央の疎水性ドメイン、およびシグナルペプチダーゼの切断部位を含むC末端領域を含む。

【0367】

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、アミノ酸配列MKWVTFISLLFLFSSAYS（配列番号117）を有するシグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、核酸配列ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC（配列番号118）、ATGAAGTGGGTACACATTTATCTCTTTACTGTTCTCTTTCTCCAGCGCCTACAGC（配列番号119）、またはATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC（配列番号120）によってコードされるシグナル配列を含む。

【0368】

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、アミノ酸配列MKCLLYLAFLLGVNC（配列番号121）を有するシグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはその両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、アミノ酸配列MGQIVTMFEALPHIIDEVINIIVIIIVLIIITSIKAVYNFATCGILALVSFLFLAGRSCG（配列番号122）を有するシグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはその両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、アミノ酸配列MPNHQSGSPTGSSDLLLSGKKQRPHLALRRKRREMRKINRKRVRMNLAPIKEKTAWQHLQALISEAEVVKTSQTPQNSLTFLALLSVLGPPVTG（配列番号123）を有するシグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはその両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、アミノ酸配列MDSKGS SQKGSRLLLLVVSNLLLCQGVVS（配列番号124）を有するシグナル配列を含む。当業者であれば、本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチドおよび／または第2のキメラポリペプチド、または一本鎖キメラポリペプチドにおける使用に適切な他のシグナル配列を認識しているであろう。

【0369】

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、約10～100アミノ酸長であるシグナル配列を含む。例えば、シグナル配列は、約10～100アミノ酸長、約15～100アミノ酸長、約20～100アミノ酸長、約25～100アミノ酸長、約30～100アミノ酸長、約35～100アミノ酸長、約40～100アミノ酸長、約45～100アミノ酸長、約50～100アミ

10

20

30

40

50

ノ酸長、約55～100アミノ酸長、約60～100アミノ酸長、約65～100アミノ酸長、約70～100アミノ酸長、約75～100アミノ酸長、約80～100アミノ酸長、約85～100アミノ酸長、約90～100アミノ酸長、約95～100アミノ酸長、約10～95アミノ酸長、約10～90アミノ酸長、約10～85アミノ酸長、約10～80アミノ酸長、約10～75アミノ酸長、約10～70アミノ酸長、約10～65アミノ酸長、約10～60アミノ酸長、約10～55アミノ酸長、約10～50アミノ酸長、約10～45アミノ酸長、約10～40アミノ酸長、約10～35アミノ酸長、約10～30アミノ酸長、約10～25アミノ酸長、約10～20アミノ酸長、約10～15アミノ酸長、約20～30アミノ酸長、約30～40アミノ酸長、約40から50アミノ酸長、約50～60アミノ酸長、約60～70アミノ酸長、約70～80アミノ酸長、約80～90アミノ酸長、約90～100アミノ酸長、約20～90アミノ酸長、約30～80アミノ酸長、約40～70アミノ酸長、約50～60アミノ酸長、またはそれらの間の任意の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸長である。

【0370】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるシグナル配列のうちのいずれかは、シグナル配列の機能が損なわれないままである限り、そのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加のアミノ酸（例えば、1、2、3、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ酸）を含み得る。例えば、アミノ酸配列MKCLLYLAFLFLGVNC（配列番号125）を有するシグナル配列は、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドを分泌経路に指向する能力を依然として保持しながら、N末端またはC末端に1つ以上の追加のアミノ酸を含むことができる。

【0371】

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、多鎖キメラポリペプチドを細胞外空間に指向するシグナル配列を含む。かかる実施形態は、単離および／または精製が比較的容易な一本鎖キメラポリペプチドを生成するのに有用である。

【0372】

ペプチドタグ

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチド、（例えば、キメラポリペプチドのN末端またはC末端に）ペプチドタグを含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドは、（例えば、第1のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に）ペプチドタグを含む第1のキメラポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドは、（例えば、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に）ペプチドタグを含む第2のキメラポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチドおよび多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチドの両方がペプチドタグを含む。いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、2つ以上のペプチドタグを含む。

【0373】

多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドに含まれる例示的なペプチドタグには、AviTag（GLNDIFEAQKIEWHE、配列番号126）、カルモジュリンタグ（KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL、配列番号127）、ポリグルタミン酸タグ（EEEEEE、配列番号128）、Eタグ（GAPVPYPDPLEPR、配列番号129）、FLAGタグ（DYKDDDDK、配列番号130）、HAタグ、血球凝集素由来のペプチド（YPYDVPDYA、

配列番号131)、hisタグ(HHHHHH(配列番号132)、HHHHHHH(配列番号133)、HHHHHHHH(配列番号134)、HHHHHHHHH(配列番号135)、HHHHHHHHHH(配列番号136)、またはHHHHHHHHHHH(配列番号137))、mycタグ(EQKLISEEDL、配列番号138)、NEタグ(TKENP RSNQEE SYDDNES、配列番号139)、Sタグ(KETAAAKFERQHMD S、配列番号140)、SBPタグ(MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELE QLRARLEHHPQGQREP、配列番号141)、Softag 1(SLAEL LNAGLGGS、配列番号142)、Softag 3(TQDPSRVG、配列番号143)、Spotタグ(PDRVRAVSHWSS、配列番号144)、Strepタグ(WSHPQFEK、配列番号145)、TCタグ(CCPGCC、配列番号146)、Tyタグ(EVHTNQDPLD、配列番号147)、V5タグ(GKPIPNPLLG LDST、配列番号148)、VSVタグ(YTDIEMNRLGK、配列番号149)、およびXpressタグ(DLYDDDDK、配列番号150)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、組織因子タンパク質は、ペプチドタグである。

【0374】

多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドに含まれ得るペプチドタグは、それぞれ、多鎖キメラポリペプチドまたは一本鎖キメラポリペプチドに関連する様々な用途のうちのいずれかに使用され得る。例えば、ペプチドタグは、多鎖キメラポリペプチドまたは一本鎖キメラポリペプチドの精製に使用され得る。1つの非限定的な例として、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド(例えば、組換え発現された第1のキメラポリペプチド)、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド(例えば、組換え発現された第2のキメラポリペプチド)、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドが、mycタグを含み得、mycタグ付き第1キメラポリペプチド、mycタグ付き第2キメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドを含む多鎖キメラポリペプチドは、mycタグ(複数可)を認識する抗体を使用して精製され得る。mycタグを認識する抗体の1つの非限定的な例は、非営利Developmental Studies Hybridoma Bankから入手可能な9E10である。別の非限定的な例として、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド(例えば、組換え発現された第1のキメラポリペプチド)、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド(例えば、組換え発現された第2のキメラポリペプチド)、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドが、ヒスチジンタグを含み得、ヒスチジンタグ付き第1キメラポリペプチド、ヒスチジンタグ付き第2キメラポリペプチド、またはそれらの両方、またはヒスチジンタグ付き一本鎖キメラポリペプチドを含む多鎖キメラポリペプチドは、ニッケルまたはコバルトキレートを使用して精製され得る。当業者であれば、一本鎖または多鎖キメラポリペプチドの精製に使用するためにそれらのタグに結合する他の好適なタグおよび薬剤を認識しているであろう。いくつかの実施形態では、ペプチドタグは、精製後に、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチドおよび／もしくは第2のキメラポリペプチド、または一本鎖キメラポリペプチドから除去される。いくつかの実施形態では、ペプチドタグは、精製後に、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチドおよび／もしくは第2のキメラポリペプチド、または一本鎖キメラポリペプチドから除去されない。

【0375】

多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドに含まれ得るペプチドタグは、それぞれ、例えば、多鎖キメラポリペプチドもしくは一本鎖キメラポリペプチドの免疫沈降、多鎖キメラポリペプチドもしくは一本鎖キメラポリペプチドの画像化(例えば、ウエスタンブロッティング、ELISA、フローサイトメトリー、および／または免疫細胞化学による)、および／またはそれぞれ、多鎖キメラポリペプチドも

しくは一本鎖キメラポリペプチドの可溶化に使用され得る。

【0376】

いくつかの実施形態では、多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはその両方、または一本鎖キメラポリペプチドは、約10～100アミノ酸長であるペプチドタグを含む。例えば、ペプチドタグは約10～100アミノ酸長、約15～100アミノ酸長、約20～100アミノ酸長、約25～100アミノ酸長、約30～100アミノ酸長、約35～100アミノ酸長、約40～100アミノ酸長、約45～100アミノ酸長、約50～100アミノ酸長、約55～100アミノ酸長、約60～100アミノ酸長、約65～100アミノ酸長、約70～100アミノ酸長、約75～100アミノ酸長、約80～100アミノ酸長、約85～100アミノ酸長、約90～100アミノ酸長、約95～100アミノ酸長、約100～95アミノ酸長、約100～90アミノ酸長、約100～85アミノ酸長、約100～80アミノ酸長、約100～75アミノ酸長、約100～70アミノ酸長、約100～65アミノ酸長、約100～60アミノ酸長、約100～55アミノ酸長、約100～50アミノ酸長、約100～45アミノ酸長、約100～40アミノ酸長、約100～35アミノ酸長、約100～30アミノ酸長、約100～25アミノ酸長、約100～20アミノ酸長、約100～15アミノ酸長、約20～30アミノ酸長、約30～40アミノ酸長、約40～50アミノ酸長、約50～60アミノ酸長、約60～70アミノ酸長、約70～80アミノ酸長、約80～90アミノ酸長、約90～100アミノ酸長、約20～90アミノ酸長、約30～80アミノ酸長、約40～70アミノ酸長、約50～60アミノ酸長、またはそれらの間の任意の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドタグは、約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸長である。

【0377】

多鎖キメラポリペプチドの第1のキメラポリペプチド、多鎖キメラポリペプチドの第2のキメラポリペプチド、またはそれらの両方、または一本鎖キメラポリペプチドに含まれるペプチドタグは、任意の好適な長さのものであり得る。例えば、ペプチドタグは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のアミノ酸長であり得る。一本鎖または多鎖キメラポリペプチドが2つ以上のペプチドタグを含む実施形態では、2つ以上のペプチドタグは、同じ長さまたは異なる長さのものであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるペプチドタグのうちのいずれかは、ペプチドタグの機能が損なわれないままである限り、N末端および／またはC末端に1つ以上の追加のアミノ酸（例えば、1、2、3、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ酸）を含み得る。例えば、アミノ酸配列EQKLISEEDL（配列番号138）を有するmycタグは、抗体（例えば、9E10）によって結合される能力を依然として保持しながら、（例えば、ペプチドタグのN末端および／またはC末端）に1つ以上の追加のアミノ酸を含み得る。

【0378】

一本鎖キメラポリペプチドータイプAの例示的な実施形態

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは独立して、CD3（例えば、ヒトCD3）またはCD28（例えば、ヒトCD28）に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、CD3（例えば、ヒトCD3）に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインは、CD28（例えば、ヒトCD28）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、CD28（例えば、ヒトCD28）に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインは、CD3（例えば、ヒトCD3）に特異的に結合する。

【0379】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、互いに直接隣接している。これらの一本鎖キメラポリペ

プチドのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0380】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインは、互いに直接隣接している。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0381】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、抗原結合ドメインである。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々、抗原結合ドメイン（例えば、本明細書に記載の例示的な抗原結合ドメインのうちのいずれか）である。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単一ドメイン抗体を含む。

【0382】

C D 3 に特異的に結合する s c F v の非限定的な例は、

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G
T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E
D A A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R G G G G S G G G G S G G G
G S Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T R Y T M H W V K
Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T
A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S
S（配列番号151）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なく
とも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一
、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも9
8%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0383】

いくつかの実施形態では、C D 3 に特異的に結合する s c F v の非限定的な例は、

C A G A T C G T G C T G A C C C A A A G C C C C G C C A T C A T G A G C G C T A
G C C C C G G T G A G A A G G T G A C C A T G A C A T G C T C C G C T T C C A G
C T C C G T G T C C T A C A T G A A C T G G T A T C A G C A G A A A A G C G G A
A C C A G C C C C A A A A G G T G G A T C T A C G A C A C C A G C A A G C T G G
C C T C C G G A G T G C C C G C T C A T T T C C G G G G C T C T G G A T C C G G
C A C C A G C T A C T C T T T A A C C A T T T C C G G C A T G G A A G C T G A A
G A C G C T G C C A C C T A C T A T T G C C A G C A A T G G A G C A G C A A C C
C C T T C A C A T T C G G A T C T G G C A C C A A G C T C G A A A T C A A T C G
T G G A G G A G G T G G C A G C G G C G G C G G T G G A T C C G G C G G A G G A
G G A A G C C A A G T T C A A C T C C A G C A G A G C G G C G C T G A A C T G G
C C C G G C C C G G C G C C T C C G T C A A G A T G A G C T G C A A G G C T T C
C G G C T A T A C A T T T A C T C G T T A C A C A A T G C A T T G G G T C A A G
C A G A G G C C C G G T C A A G G T T T A G A G T G G A T C G G A T A T A T C A
A C C C T T C C C G G G G C T A C A C C A A C T A T A A C C A A A A G T T C A A
G G A T A A A G C C A C T T T A A C C A C T G A C A A G A G C T C C T C C A C C
G C C T A C A T G C A G C T G T C C T C T T T A A C C A G C G A G G A C T C C G
C T G T T T A C T A C T G C G C T A G G T A T T A C G A C G A C C A C T A C T G
T T T A G A C T A T T G G G G A C A A G G T A C C A C T T T A A C C G T C A G C
A G C（配列番号152）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少
なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%

10

20

30

40

50

同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列によってコードされ得る。

【0384】

CD28 に特異的に結合する s c F v の非限定的な例は、

VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVVIQWVKQKP
GQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYM
EFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSDIEMTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSS
SYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSY
SLTISSMEEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR (配列番
号 153) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84%
同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なく
とも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、
少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含み得る。

【0385】

いくつかの実施形態では、CD28 に特異的に結合する s c F v の非限定的な例は、

GTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTGAAACCCG
GTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATACAC
CTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAAGCCC
GGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACCCTTACA
ACGACTATACCAAATACAACGAGAAAGTTTAAGGGAAAGGC
TACTTTAAACCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCCTACATG
GAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACT
ATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGGG
CACAACTACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGC
GGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGA
CCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCCTCTTTAGGCGAGCG
GGTCACAATGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCC
TCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCC
CTAAACTGTGTCATCTACAGCACCAAGCAATCTCGCCAGCGG
CGTGCCCCCTAGGTTTTTCGGGAAGCGGAAGCACCAAGCTAC
TCTTTAAACCATCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCA
CCTACTTTTGTACCAAGTACCAACCGGTCCCCCACCTTCGG
AGGCGGCACCAAACTGGAGACAAAGAGG (配列番号 154) と少なく
とも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なく
とも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少
なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99%
同一、または 100% 同一) の配列によってコードされ得る。

【0386】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインおよび／または第 2 の標的結合ドメインは、可溶性受容体 (例えば、可溶性 CD28 受容体または可溶性 CD3 受容体) である。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0387】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

QIVLTQSPAIMASAPGEKVMTCSASSSVSYMNWYQQKSG
TSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRRGSGSGTSSYSLTISGMEAE
DAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGGSGGG

GSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTRYTMHWVK
QRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD KATLT TDKSSST
AYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVS
SSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSF EQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTL YWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFREVLQQQSGPELVKPGASVKMS
CKASGYTFTTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYN
EKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGD
GNYWGRGTTTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIEMTQSPA IM
SASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYS
TSNLAGSVPPRFSGSGSTSYSLTIS SMEAEDAATYFCHQY
HRSPTFGGGTKLETKR（配列番号155）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列を含み得る。

【0388】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTA
GCCCCCGGTGAGAAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAG
CTCCGTGTCTCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGA
ACCAGCCCCAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGG
CCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGG
CACCAAGCTACTCTTTAACCATTTCGGGCATGGAAGCTGAA
GACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACC
CCTTCACATTTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAATCG
TGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGA
GGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGA ACTGG
CCCGGCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTC
CGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGGTCAAG
CAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCA
ACCCTTCCCGGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAAGTTCAA
GGATAAAGCCACTTTAACC ACTGACAAGAGCTCCTCCACC
GCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCG
CTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTG
TTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACC GTCAGC
AGCTCCGGGCACCACCAATAACCGTGGCCGCTTATAACCTCA
CATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGA
ACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTG CAGATCTCC
ACCA AATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAA
CAGACACCGAGTG TGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGA
CGTCAAGCAAACCTATCTGGGCTCGGGTCTTTTCTTACCCC
GCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTC
TCTACGAGAAATCCCCCGAATTACCCCTTATTTAGAGAC
CAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTT
GGCACCAAGGTGAACGTCACCGTTCGAGGATGAAAGGACTT
TAGTGCGGCGGAATAACACATTTTATCCCTCCGGGATGT

G T T C G G C A A A G A C C T C A T C T A C A C A C T G T A C T A T T G G A A G
T C C A G C T C C T C C G G C A A A A A G A C C G C T A A G A C C A A C A C C A
A C G A G T T T T T A A T T G A C G T G G A C A A A G G C G A G A A C T A C T G
C T T C A G C G T G C A A G C C G T G A T C C C T T C T C G T A C C G T C A A C
C G G A A G A G C A C A G A T T C C C C C G T T G A G T G C A T G G G C C A A G
A A A A G G G C G A G T T C C G G G A G G T C C A G C T G C A G C A G A G C G G
A C C C G A A C T C G T G A A A C C C G G T G C T T C C G T G A A A A T G T C T
T G T A A G G C C A G C G G A T A C A C C T T C A C C T C C T A T G T G A T C C
A G T G G G T C A A A C A G A A G C C C G G A C A A G G T C T C G A G T G G A T
C G G C A G C A T C A A C C C T T A C A A C G A C T A T A C C A A A T A C A A C
G A G A A G T T T A A G G G A A A G G C T A C T T T A A C C T C C G A C A A A A
G C T C C A T C A C A G C C T A C A T G G A G T T C A G C T C T T T A A C A T C
C G A G G A C A G C G C T C T G T A C T A T T G C G C C C G G T G G G G C G A C
G G C A A T T A C T G G G G A C G G G G C A C A A C A C T G A C C G T G A G C A
G C G G A G G C G G A G G C T C C G G C G G A G G C G G A T C T G G C G G T G G
C G G C T C C G A C A T C G A G A T G A C C C A G T C C C C C G C T A T C A T G
T C C G C C T C T T T A G G C G A G C G G G T C A C A A T G A C T T G T A C A G
C C T C C T C C A G C G T C T C C T C C T C C T A C T T C C A T T G G T A C C A
A C A G A A A C C C G G A A G C T C C C C T A A A C T G T G C A T C T A C A G C
A C C A G C A A T C T C G C C A G C G G C G T G C C C C C T A G G T T T T C C G
G A A G C G G A A G C A C C A G C T A C T C T T T A A C C A T C T C C T C C A T
G G A G G C T G A G G A T G C C G C C A C C T A C T T T T G T C A C C A G T A C
C A C C G G T C C C C C A C C T T C G G A G G C G G C A C C A A A C T G G A G A
C A A A G A G G (配列番号 156) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82
% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なく
とも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一
、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列によって
コードされる。

【0389】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

M K W V T F I S L L F L F S S A Y S Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T
C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R
G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K
L E I N R G G G G S G G G G S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M
S C K A S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y
N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y
D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F K T
I L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S T K S G D W K S K C F Y T T D T E C D L T D
E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T
P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E D E R T L V R R N N T F L
S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K S S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K
G E N Y C F S V Q A V I P S R T V N R K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E V Q
L Q Q S G P E L V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y V I Q W V K Q K P G Q
G L E W I G S I N P Y N D Y T K Y N E K F K G K A T L T S D K S S I T A Y M E F
S S L T S E D S A L Y Y C A R W G D G N Y W G R G T T L T V S S G G G G S G G G
G S G G G G S D I E M T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S S S Y
F H W Y Q Q K P G S S P K L C I Y S T S N L A S G V P P R F S G S G S T S Y S L
T I S S M E A E D A A T Y F C H Q Y H R S P T F G G G T K L E T K R (配列番号 1
57) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一
、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 9

2 %同一、少なくとも94 %同一、少なくとも96 %同一、少なくとも98 %同一、少なくとも99 %同一、または100 %同一)の配列を含み得る。

【0390】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTATTTCA
GCTCCGCGCTATTCCCAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGC
CATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAAGGTGACCATGACA
TGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCTACATGAACTGGTATC
AGCAGAAAAGCGGAACCAAGCCCCAAAGGTGGATCTACGA
CACCAAGCAAGCTGGCCTCCGGAGGTGCCCGCTCATTTCCGG
GGCTCTGGATCCGGCACCAAGCTACTCTTTAAACCATTTCCG
GCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCA
ATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAG
CTCGAAATCAATCGTGGAAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTG
GATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAG
CGGCGCTGAACCTGGCCCCGGCCCCGGCGCCTCCGTCAAGATG
AGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAA
TGCAATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTG
GATCGGATATATCAACCCCTTCCCGGGGCTACACCAACTAT
AACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAAACCACTGACA
AGAGCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTAAC
CAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTAC
GACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAAGGTACCA
CTTTAAACCGTCAAGCAGCTCCGGGCACCAACCAATACCGTGGC
CGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACA
ATTCTGGAATGGGAACCCAAAGCCCGTCAATCAAGTTTACA
CCGTGCAGATCTCCACCAAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAA
GTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAAACCGAC
GAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGG
TCTTTTCTTACCCCGCTGGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTC
CGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAAATCCCCCGAATTCAAC
CCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGA
GCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCAACCGTCCA
GGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTA
TCCCTCCGGGATGTGTTCCGGCAAAGACCTCATCTACACAC
TGTAATAATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAGAGCCGC
TAAGACCAACACCAACGAGTTTTTTAATTGACGTGGACAAA
GGCGAGAACTACTGCTTCAGCGGTGCAAGCCGTGATCCCTT
CTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGA
GTGCATGGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGGAGGTCCAG
CTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTGAAACCCGGTGCTT
CCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATACACCTTTCAC
CTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAAGCCCGGACAA
GGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACCCCTTACAACGACT
ATACCAAAATACAACGAGAAAGTTTTAAGGGAAAGGCTACTTT
AACCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCCTACATGGAGTTC
AGCTCTTTAAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCG
CCCGGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGGGCACAAAC
ACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGC
GGATCTGGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGACCCAGT

10

20

30

40

50

CCCCCGCTATCATGTCCGCTCTTTAGGCGAGCGGGTCAC
AATGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTAC
TTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCCTAAAC
TGTGCATCTACAGCACCAAGCAATCTCGCCAGCGGCGGTGCC
CCCTAGGTTTTCGGAAGCGGAAGCACCAAGCTACTCTTTTA
ACCATCTCCTCCATGGAGGGCTGAGGATGCCGCCACCTACT
TTTGTCACCAAGTACCACCGGTCCCCCACCTTCGGAGGCGG
CACCAAACTGGAGACAAAGAGG（配列番号158）と少なくとも80%
同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、
少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、
少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または
100%同一）の配列によってコードされる。

10

【0391】

一本鎖キメラポリペプチドタイプBの例示的な実施形態

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび／または第2の標的結合ドメインは独立して、IL-2受容体（例えば、ヒトIL-2受容体）に特異的に結合することができる。

【0392】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、互いに直接隣接している。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

20

【0393】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインは、互いに直接隣接している。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0394】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、可溶性ヒトIL-2タンパク質である。IL-2受容体に特異的に結合するIL-2タンパク質の非限定的な例は、

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L
T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L
R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R
W I T F C Q S I I S T L T（配列番号78）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、
少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列
を含み得る。

40

【0395】

いくつかの実施形態では、IL-2受容体に特異的に結合するIL-2タンパク質は、
GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAAC
TGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGG
AATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAAGGATGCTC
ACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGA
AACATCTTCAGTGCTAGAAAGAAAGAACTCAAACCTCTGGA
GGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTTCACTTA
AGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTTC

50

TGGAACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA
TGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAAATTTCTGAACAGA
TGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT (配列番号159) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列によってコードされ得る。

【0396】

いくつかの実施形態では、IL-2受容体に特異的に結合するIL-2タンパク質は、
GCCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGC
TGGAGCATTTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGG
CATCAACAACCTACAAGAACCCTCAAGCTGACTCGTATGCTG
ACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGA
AGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCCTCGA
GGAGGTGCTGAATTTAGCCCAAGTCCAAGAATTTCCATTTA
AGGCCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTT
TAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGT
TGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACCT (配列番号160) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列によってコードされ得る。

【0397】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0398】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、
APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRML
TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL
RPRDLISNINVIVLEELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLTSGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEP
KPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYT TDTECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETN
LGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVF
GKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF
SVQAVIPSRRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREAPTSSSTK
KTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN
INVIVLEELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI
ISTLT (配列番号161) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列を含み得る。

【0399】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、
GCCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGC
TGGAGCATTTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGG
CATCAACAACCTACAAGAACCCTCAAGCTGACTCGTATGCTG
ACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGA

AGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCCTCGA
GGAGGTGCTGAATTTAGCCCCAGTCCAAGAATTTCCATTTA
AGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTT
TAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTTAAATCGT
TGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACCA
GCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTG
GAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCC
AAACCCCGTTAAACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCACCA
AGTCCGGCGACTGGAAGTCCAATGTTTCTATACCACCGA
CACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTG
AAACAGACCTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCG
GCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATA
CGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAAT
TTAGGACAGCCCCACCATCCAAGCTTTGAGCAAGTTGGCA
CAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGT
GCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTT
GGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTT
CTTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGA
GTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTTT
AGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGA
AAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCGATGGGCCAAGAAAA
GGGCGAGTTCCGGGAGGACCTACTTCAAGTTCTACAAAG
AAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTAC
AGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAA
ACTCACCGAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAG
AAGGCCACAGAACTGAAACATCTTTCAGTGTCTAGAAGAAG
AACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAG
CAAAAACCTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAAT
ATCAACGTAATAGTTCTGGAACCTAAAGGGATCTGAAACAA
CATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTTGT
AGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATC
ATCTCAACACTAACT (配列番号162) と少なくとも80%同一 (例えば、

10

20

30

少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

【0400】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ
MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE
LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSSETT
FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSGTTNTVAA
YNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC
FYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSA
GEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQVGTKVNVTVED
ERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAK
TNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVEC
MGQEKGEFREAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L NGINN
YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVL

40

50

NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE
TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT（配列番号163）と少なくとも80
%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一
、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも9
4%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、また
は100%同一）の配列を含み得る。

【0401】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCGCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAA
GACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAG
ATGATTTTAAACGGCATCAACAACCTACAAGAACCCTCAAGC
TGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAA
GGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGGAGGAG
CTGAAGCCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCCCAGTCCA
AGAATTTCCATTTAAGGCCCCCGGGATTTAATCAGCAACAT
CAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACC
TTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACC GCCACCATCGTGG
AGTTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCAT
CTCCACTTTTAACCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCC
TATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCC
TCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAAACCAAGTTTACACCGT
GCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGT
TTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGA
TCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGTGTT
TAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCT
GGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTT
ACCTCGAGACC AATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTT
TGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGGAC
GAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCC
TCCGGGATGTGTTCTGGCAAGATTTAATCTACACACTGTA
TTACTGGAAGTCCTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAA
ACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCG
AAAACCTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCG
GACCGTGAAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGC
ATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGCACTACTT
CAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTT
ACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAAT
TACAAGAATCCCAAACTCACCAAGGATGCTCACATTTAAGT
TTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCA
GTGTCTAGAAGAAGAAGCTCAAACTCTGGAGGAAGTGCTA
AATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTTCACTTAAGACCCAGGG
ACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACCTAAA
GGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAG
ACAGCAACCATTGTAGAAATTTCTGAACAGATGGATTACCT
TTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT（配列番号164）と少
なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくと
も86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99
%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

20

30

40

50

【0402】

一本鎖キメラポリペプチド－タイプCの例示的な実施形態

本明細書に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび／または第2の標的結合ドメインは独立して、IL-15受容体（例えば、ヒトIL-15受容体）に特異的に結合することができる。

【0403】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、互いに直接隣接している。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

10

【0404】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインは、互いに直接隣接している。これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0405】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、可溶性ヒトIL-15タンパク質である。IL-15受容体に特異的に結合するIL-15タンパク質の非限定的な例は、

20

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAM
KCFLLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLS SNGNV
TESGCKECELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS（配列番号8
2）と少なくとも80％同一（例えば、少なくとも82％同一、少なくとも84％同一、
少なくとも86％同一、少なくとも88％同一、少なくとも90％同一、少なくとも92
％同一、少なくとも94％同一、少なくとも96％同一、少なくとも98％同一、少なく
とも99％同一、または100％同一）の配列を含み得る。

【0406】

いくつかの実施形態では、IL-15受容体に特異的に結合するIL-15タンパク質は、

30

A A C T G G G T G A A C G T G A T C A G C G A T T T A A A G A A G A T C G A G G
A T T T A A T C C A G A G C A T G C A C A T C G A C G C C A C T C T G T A C A C
T G A G A G C G A C G T G C A C C C T A G C T G C A A G G T G A C T G C C A T G
A A G T G C T T T T T A C T G G A G C T G C A A G T T A T C T C T T T A G A G A
G C G G C G A T G C C A G C A T C C A C G A C A C T G T G G A G A A T T T A A T
C A T T T T A G C C A A C A A C T C T T T A A G C A G C A A C G G C A A C G T G
A C A G A G A G C G G C T G C A A G G A G T G C G A G G A G C T G G A G G A G A
A G A A C A T C A A G G A G T T T T T A C A G A G C T T C G T G C A C A T C G T
G C A G A T G T T C A T C A A C A C T A G C（配列番号165）と少なくとも80％
同一（例えば、少なくとも82％同一、少なくとも84％同一、少なくとも86％同一、
少なくとも88％同一、少なくとも90％同一、少なくとも92％同一、少なくとも94
％同一、少なくとも96％同一、少なくとも98％同一、少なくとも99％同一、または
100％同一）の配列によってコードされ得る。

40

【0407】

いくつかの実施形態では、IL-15受容体に特異的に結合するIL-15タンパク質は、

A A C T G G G T G A A C G T C A T C A G C G A T T T A A A G A A G A T C G A A G
A T T T A A T T C A G T C C A T G C A T A T C G A C G C C A C T T T A T A C A C
A G A A T C C G A C G T G C A C C C C T C T T G T A A G G T G A C C G C C A T G

50

AAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGA
GCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAAT
CATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTG
ACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGA
AGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTTGT
CCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号166）と少なくとも80%
同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、
少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または
100%同一）の配列によってコードされ得る。

【0408】

これらの一本鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0409】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM
KCFLLLELQVISLESGDASIHDIVENLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGTTNT
VAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWK
SKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVEST
GSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKK
TAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVTNVRKSTDSP
VECMGQEKGEFRENVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT
ESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHDIVENLI
ILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV
QMFINTS（配列番号167）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%
同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくと
も90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、
少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0410】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

AACTGGGTGAACGTGATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAGG
ATTTAATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACTCTGTACAC
TGAGAGCGACGTGCACCCCTAGCTGCAAGGTGACTGCCATG
AAGTGCTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGA
GCGGCGATGCCAGCATCCACGACACTGTGGAGAATTTAAT
CATTTTAGCCAACAACCTCTTTAAGCAGCAACGGCAACGTG
ACAGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGCGAGGAGCTGGAGGAGA
AGAACATCAAGGAGTTTTTACAGAGCTTCGTGCACATCGT
GCAGATGTTTCATCAACACTAGCAGCGGCACAACCAACACA
GTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCA
AAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAAACCAAGT
TTACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAG
TCCAAATGTTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCA
CCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGC
CCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACT
GGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAAT
TTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCAT
CCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACA

GTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCT
TTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTA
CACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGGCAAAGAAG
ACAGCTAAAAACCAACACAACGAGTTTTTAATCGACGTGG
ATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGAT
CCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAAGCACCGATAGCCCC
GTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAAGGGCGAGTTCCGGGGAGA
ACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGA
TTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACA
GAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGA
AATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAG
CGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAAGAATTTAATC
ATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGA
CAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAA
GAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCT
CAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号168）と少なくとも80%同
一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または1
00%同一）の配列によってコードされる。

10

20

【0411】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYS SNWVNVISDLKKIEDLIQSMHID
ATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS
FVHIVQMFINTSSGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPK
PVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVK
QTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNL
GQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFG
KDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF S
VQAVIPSRRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE NWVNVISDL
KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQV
ISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE
EELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS（配列番号169）と少なくとも
80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%
同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくと
も94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、
または100%同一）の配列を含み得る。

30

【0412】

いくつかの実施形態では、一本鎖キメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCAACCTGGGTGAACGTGATCAGCGATTT
AAAGAAGATCGAGGATTTAATCCAGAGCATGCACATCGAC
GCCACTCTGTACACTGAGAGCGACGTGCACCCCTAGCTGCA
AGGTGACTGCCATGAAGTGCTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGCGATGCCAGCATCCACGACACT
GTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAACAACCTCTTTAAGCA
GCAACGGCAACGTGACAGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGCGA
GGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTTTTACAGAGC
TTCGTGCACATCGTG CAGATGTTTCATCAACACTAGCAGCG

40

50

GCACAACCAACACAGTCGCTGCCCTATAACCTCACTTGGAA
GAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAA
CCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCACCAAGT
CCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACAC
CGAGTGC GATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAA
CAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTGTAGCTACCCCGCCGGCA
ATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGA
GAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTA
GGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGGCACAA
AGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGC G
GCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGC
AAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTT
CCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTT
TTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGC
GTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAA
GCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCGCAAGAAAAGGG
CGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTATCAGCGATTTA
AAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACG
CCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTA
GGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTT
ATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCG
TGGAGAATTTAATCATTTTGTAGCCAATAACTCTTTATCCAG
CAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGC GAA
GAGCTGGAGGAGAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCT
TTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号
170）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同
一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも
92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少
なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0413】

例示的な多鎖キメラポリペプチドータイプA

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-18受容体またはIL-12受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0414】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0415】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本

明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0416】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単一ドメイン抗体を含む。

【0417】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性IL-15または可溶性IL-18である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、可溶性IL-15または可溶性IL-18である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの両方が、IL-18受容体またはIL-12受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0418】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-12受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-18受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-18受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-12受容体に特異的に結合する。

【0419】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性IL-18（例えば、可溶性ヒトIL-18）を含む。

【0420】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-18は、YFGKLESKLSVIRNLDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKII SFKEMNPPDN IKDTKSDIIF FQRSVP GH DNKMQFESSSY EGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D（配列番号109）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0421】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-18は、TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGAC AATGCCCCCGGACCATCTTCAATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAA GTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCC CGGTACAGATAACAAGATGCAGTTTCGAATCCTCCTCCTAC GAGGGCTACTTTT TAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTAT

TCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCG
TTCCATCATGTTCAACCGTCCAAAACGAGGAT（配列番号171）
と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0422】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、可溶性IL-12（例えば、可溶性ヒトIL-12）を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-15は、可溶性ヒトIL-12β（p40）配列および可溶性ヒトIL-12α（p35）配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性IL-15ヒトIL-15は、可溶性IL-12β（p40）配列と可溶性ヒトIL-12α（p35）配列との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカー配列のうちのいずれか）をさらに含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカー配列は、GGGSGGGSGGGSGGGGS（配列番号102）を含む。

【0423】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12β（p40）配列は、

IWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTP EEDG I TWTL
DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSL L
LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFT C
WWLTTISTDLTF SVKSSRGSSSDPQGVTCGAATLSAERV RG
DNKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLP I EVMVD AVHKLKYEN
YTSSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW
STPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATV ICRK
NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS（配列番号81）と少なくとも
80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%
同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくと
も94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、
または100%同一）の配列を含む。

【0424】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12β（p40）は、

ATTTGGGAAC TGAAGAAGGACGTCTACGTGGT CGAACTGG
ACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGT GCTCAC
TTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGAC CCTC
GATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGAC CCTCA
CAATCCAAGTTAAGGAGTT CGGAGACGCTGGCCAATACAC
ATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCTCTTATTA
TTATTACACAAGAAGGAAGACGGAAATCTGGTCCACCGACA
TTTTTAAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTT
AAGGTGTGAGGCCA AAAA ACTACAGCGGTCTGTTTCACTTGT
TGGTGGCTGACCACCA TTTCCACCGATT TTAACCTTCTCCG
TGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGAC CCTCAAGGTGTGAC
ATGTGGAGCCGCTAC CCTCAGCGCTGAGAGGGTTCTGTGGC
GATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGGCCAAGAAAG
ATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAAATCTTTACCCATTGA
GGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCG

ATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAG
CCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGG
AGCACACCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGC
AAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAAGACCGGGT
GTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCACTCTGTCTGGAAG
AACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACT
CCAGCAGCTGGTCCGAGTGCGGCCAGCGTGCCCTTGTTCC (配
列番号172)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

10

【0425】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12 α
(p35)は、

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNL LRAVSNMLQKARQTLEFY
PCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET
SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNM L AVIDELMQALNFNSETVPQKSS
LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (配列
番号80)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%
同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む。

20

【0426】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12 α
(p35)は、

CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCC
CTTGTTTACACCACAGCCAGAAATTTACTGAGGGCCGTGAG
CAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAATTTTAC
CCTTGCAACGAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCA
AGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGA
GCTGACAAAGAACGAGTCTTGCTCTCAACTCTCGTGAAACC
AGCTTCAATCAAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGA
CCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGA
GGATTTAAAGATGTACCAAGTGAGTTCAAGACCATGAAC
GCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTTAG
ACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGC
TTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAAGTCCTCC
CTCGAGGAGCCCCGATTTTTTACAAGACAAAGATCAAACCTGT
GCATTTTACTCCACGCCCTTTAGGATCCGGGGCCGTGACCAT
TGACCGGGTCAATGAGCTATTTAAACGCCAGC (配列番号173)
と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な
くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少な
くとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

30

40

【0427】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRD
NAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKI
ISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDKMQFESSY

50

EGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDESGT
TNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSG
DWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNV
ESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQP TIQSFEQVGTKV
NVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSS
GKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKST
DSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
LYTESDVHPSCKV TAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVE
NLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFV
HIVQMFINTS（配列番号174）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも
82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少
なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%
同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含
み得る。

10

【0428】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGA
ATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCG
GCCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGGAC
AATGCCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGG
ACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAA
GTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGAGAACAAAGATC
ATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGG
ACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCC
CGGTACAGATAACAAGATGCAGTTTCGAATCCTCCTCCTAC
GAGGGCTACTTTT TAGCTTG TGAAAAGGAGAGGGATTAT
TCAAGCTGATCCTCAAGAGGAGGACGAGCTGGGCGATCG
TTCCATCATGTTCAACCGTCCAAAACGAGGATAGCGGCACA
ACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCA
CCAACCTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGT
TAACCAAGTTTACACCGTG CAGATCAGCACCAAGTCCGGC
GACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGT
GCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGAC
CTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTG
GAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAA
GCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACA
GCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGA
ACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGGCAAAGA
TTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCTCC
GGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAA
TCGACGTGGATAAAGGCGAAAAC TACTGTTTTCAGCGTGCA
AGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTG AATAGGAAAAGCACCC
GATAGCCCCGTGAGTG CATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGT
TCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAA
GATCGAAGATTTAATT CAGTCCATGCATATCGACGCCACT
TTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGA
CCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTC
TTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGGTGGAG
AATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACG

20

30

40

50

G C A A C G T G A C A G A G T C C G G C T G C A A G G A G T G C G A A G A G C T
G G A G G A G A A G A A C A T C A A G G A G T T T C T G C A A T C C T T T G T G
C A C A T T G T C C A G A T G T T C A T C A A T A C C T C C (配列番号175)と
少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一
、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも9
9%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0429】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

M K W V T F I S L L F L F S S A Y S Y F G K L E S K L S V I R N L N D Q V L F I
D Q G N R P L F E D M T D S D C R D N A P R T I F I I S M Y K D S Q P R G M A V
T I S V K C E K I S T L S C E N K I I S F K E M N P P D N I K D T K S D I I F F
Q R S V P G H D N K M Q F E S S S Y E G Y F L A C E K E R D L F K L I L K K E D
E L G D R S I M F T V Q N E D S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F K T I L E W
E P K P V N Q V Y T V Q I S T K S G D W K S K C F Y T T D T E C D L T D E I V K
D V K Q T Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E
T N L G Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E D E R T L V R R N N T F L S L R D
V F G K D L I Y T L Y Y W K S S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y
C F S V Q A V I P S R T V N R K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E N W V N V I
S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C F L L E
L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K
E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S (配列番号176)と少な
くとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少
なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%
同一、または100%同一)の配列を含み得る。

【0430】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

A T G A A G T G G G T C A C A T T T A T C T C T T T A C T G T T C C T C T T C T
C C A G C G C C T A C A G C T A C T T C G G C A A A C T G G A A T C C A A G C T
G A G C G T G A T C C G G A A T T T A A A C G A C C A A G T T C T G T T T A T C
G A T C A A G G T A A C C G G C C T C T G T T C G A G G A C A T G A C C G A C T
C C G A T T G C C G G G A C A A T G C C C C C C G G A C C A T C T T C A T T A T
C T C C A T G T A C A A G G A C A G C C A G C C C C G G G G C A T G G C T G T G
A C A A T T A G C G T G A A G T G T G A G A A A A T C A G C A C T T T A T C T T
G T G A G A A C A A G A T C A T C T C C T T T A A G G A A A T G A A C C C C C C
C G A T A A C A T C A A G G A C A C C A A G T C C G A T A T C A T C T T C T T C
C A G C G G T C C G T G C C C G G T C A C G A T A A C A A G A T G C A G T T C G
A A T C C T C C T C C T A C G A G G G C T A C T T T T T A G C T T G T G A A A A
G G A G A G G G A T T T A T T C A A G C T G A T C C T C A A G A A G G A G G A C
G A G C T G G G C G A T C G T T C C A T C A T G T T C A C C G T C C A A A A C G
A G G A T A G C G G C A C A A C C A A C A C A G T C G C T G C C T A T A A C C T
C A C T T G G A A G A G C A C C A A C T T C A A A A C C A T C C T C G A A T G G
G A A C C C A A A C C C G T T A A C C A A G T T T A C A C C G T G C A G A T C A
G C A C C A A G T C C G G C G A C T G G A A G T C C A A A T G T T T C T A T A C
C A C C G A C A C C G A G T G C G A T C T C A C C G A T G A G A T C G T G A A A
G A T G T G A A A C A G A C C T A C C T C G C C C G G G T G T T T A G C T A C C
C C G C C G G C A A T G T G G A G A G C A C T G G T T C C G C T G G C G A G C C
T T T A T A C G A G A A C A G C C C C G A A T T T A C C C C T T A C C T C G A G
A C C A A T T T A G G A C A G C C C A C C A T C C A A A G C T T T G A G C A A G

TTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGAC
TTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGAT
GTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGA
AGTCCTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACAC
AAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTAC
TGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGA
ATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCA
AGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCAATC
AGCGATTTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGC
ATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCC
CTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAG
CTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCC
ACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTC
TTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAG
GAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAGAACAATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATAC
CTCC（配列番号177）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90
%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされ
る。

10

20

【0431】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL
DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYCHKGGEVLSHSL
LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFTC
WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
RGDNKEYEYSVECEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL
KYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY
PDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT
VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGG
GSGGGGSRNLPVATPDPMFPC LHHSQNL LRAVSNMLQKAR
QTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNE
SCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMY
QVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNM L AVIDELMQALNFN
SETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRV
MSYLNASITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKR
KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIR（配列番号178）と少なくとも80
%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一
、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも9
4%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、また
は100%同一）の配列を含み得る。

30

40

【0432】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATTTGGGAAC TGAAGAAGGACGTCTACGTGGT CGAAC TGG
ACTGGTATCCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGCTCAC
TTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCTC
GATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCTCA
CAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACAC
ATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCTTTATTA

50

TTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACA
TTTTAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTT
AAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCTTTTCACTTGT
TGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCG
TGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCCTCAAGGTGTGAC
ATGTGGAGCCGCTACCCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCTGTGGC
GATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAG
ATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGA
GGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCG
ATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAG
CCGGCAAGTTGAGGTCTCTTTGGGAATATCCCGACACTTGG
AGCACACCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGC
AAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGT
GTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCCTCATCTGTCTGGGAAG
AACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACT
CCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCTTGTTCGGG
CGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGGCGGAGGA
TCTCGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGT
TCCCTTGTTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGT
GAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTT
TACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCA
CCAAGGACAAAGACATCCACCCTGGAGGGCTTGTTTACCTCT
GGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAA
ACCAGCTTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGA
AGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTA
CGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATG
AACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGGCAGATCTTTT
TAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCA
AGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCCTCCTCAGAAGTCC
TCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTTACAAGACAAAGATCAAAC
TGTGCATTTTACTCCACGCCCTTTAGGATCCGGGGCCGTGAC
CATTGACCGGGTCAATGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACA
TGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGG
TGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTG
TAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACAGCAGCCTC
ACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACT
GGACAACACCTCTTTAAAGTGCATCCGG (配列番号179) と少
なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくと
も86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99
%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

【0433】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSISWELKKDVYVVELDWYPDAPGE
MVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD
AGQYTKHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK
NKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD
PQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVECEQEDSACPAAEE
SLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSEFFIRDIKPDPPKNLQLK

PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKRE
KKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWAS
VPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQN
LLRAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEDIDHEDITKDKTSTVE
ACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALC
LSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNM LAVI
DELMQALNFNSETPVQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHA FR
IRAVTIDRVMSYLNASITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSY SR
ERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI
R（配列番号180）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なく
とも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一
、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも9
8%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

10

【0434】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTTCCTCTTTTA
GCAGCGCCTACTCCATTTGGGAAGTGAAGAAGGACGTCTA
CGTGGTTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAA
ATGGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCGAAGAAGACGGCA
TCACTTGGACCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTC
CGGAAAGACCTCACAAATCCAAGTTAAGGAGTTTCGGAGAC
GCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCA
GCCATTTCTTTATTTATTTACACAAGGAAGGACGGGAAT
CTGGTCCACCGACATTTTAAAGATCAGAAGGAGCCCAAG
AATAAGACCTTTTAAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCG
GTCGTTTCACTTGTGTTGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGA
TTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGAC
CCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTACCTCAGCGCTG
AGAGGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGT
GGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAA
TCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAAC
TCAAGTACGAGAAGTACACCTCCTCCTTTTATCCGGGA
CATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGGAATTTACAGCTGAAG
CCTCTCAAAAATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTTGGGAAT
ATCCCGACACTTGGAGCACACCCACAGCTACTTCTCTTT
AACCTTTTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAGAAGCAAGCGGGAG
AAGAAAGACCGGGGTGTTTACCGACAAAACAGCGCCACCG
TCATCTGTTCGGAAGAACGCCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCA
AGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGAGGGCAGC
GTGCCCTTGTTCGGCGGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCT
CCGGCGGGCGGAGGATCTCGTAACCTCCCGGTGGCTACCCC
CGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAAT
TTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGC
AGACTTTAGAAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGA
CCATGAAGATATCACCAAGGACAAAGACATCCACCCTGGAG
GCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTC
TCAACTCTCGTGAAACCAGCTTTCATCACAAATGGCTCTTG
TTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGC
CTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGG
AGTTCAAGACCATGAACGCCCAAGCTGCTCATGGACCCCTAA

20

30

40

50

ACGGCAGATCTTTTATAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATT
GATGAGCTGATGCAAGCTTTAACTTCAACTCCGAGACCG
TCCCTCAGAAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTACAA
GACAAAGATCAAACCTGTGCATTTTACTCCACGCCCTTTAGG
ATCCGGGGCCGTGACCAATTGACCGGGTCA TGAGCTATTTAA
ACGCCAGCATTTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCA
CGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGG
GAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCG
GCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTAC
CAACGTGGCTCACTGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGCATC
CGG（配列番号181）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少
なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%
同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされ
る。

10

【0435】

例示的な多鎖キメラポリペプチドータイプB

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-21受容体またはTGF- β に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

20

【0436】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

30

【0437】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0438】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

40

【0439】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性IL-21（例えば、可溶性ヒトIL-21ポリペプチド）または可溶性TGF- β 受容体（例えば、可溶性TGF- β RII受容体）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、可溶性IL-2

50

1 または可溶性 TGF- β 受容体（例えば、可溶性 TGF β RII 受容体）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの両方が、IL-21 受容体または TGF- β に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0440】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインは IL-21 受容体に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインは TGF- β に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインは TGF- β に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインは IL-21 受容体に特異的に結合する。

【0441】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインは、可溶性 IL-21（例えば、可溶性 ヒト IL-21）を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 ヒト IL-21 は、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H
Q H L S S R T H G S E D S（配列番号 83）と少なくとも 80% 同一（例えば、少なく
とも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、
少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、
少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一）の配列を含む。

【0442】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 ヒト IL-21 は、
CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC（
配列番号 182）と少なくとも 80% 同一（例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも
84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少
なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98%
同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一）の配列によってコードされる。

【0443】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 の標的結合ドメインは、可溶性 TGF- β 受容体（例えば、可溶性 TGF β RII 受容体（例えば、可溶性 ヒト TGF β RII 受容体））を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 ヒト TGF β RII は、第 1 の可溶性 ヒト TGF β RII 配列および第 2 の可溶性 ヒト TGF β RII 配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 ヒト TGF β RII は、第 1 の可溶性 ヒト TGF β RII 配列と第 2 の可溶性 ヒト TGF β RII 配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカーは、配列 GGGGS

GGGGSGGGGS（配列番号102）を含む。

【0444】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAA SPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEELYNTSNPD（配列番号183）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

10

【0445】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAA SPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEELYNTSNPD（配列番号184）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

20

【0446】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGAT
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAAGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCACGATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGAT（配列番号185）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

30

40

【0447】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAAATAATGACATGA
TCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAATTTCCCCAGCT
GTGCAAAATCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAAC
CAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCACAATCACCTCCATCT
GTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAA
GAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGAT

50

CCCAAGCTGCCCTACCAACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCG
CCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAGAAAAAGAACCTGG
CGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGC
AACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAAGCA
ACCCCGAC（配列番号186）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82
%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なく
とも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一
、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によって
コードされる。

【0448】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGFR β RII受容体は、

ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTTCTGCGATGTTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCACGATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCACA
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAAGCAACCCCGAC（配列番号187）と少なくとも80%同
一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または1
00%同一）の配列によってコードされる。

【0449】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、ヒトTGFR β RII受容体は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCCHD
PKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDEC
NDNIIFSEELYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCCHDPKLPYHDFI
ILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPD（配列番号188）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%
同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくと

10

20

30

40

50

も 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、
少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含む。

【0450】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

QGQDRHMI RMRQL IDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H
Q H L S S R T H G S E D S S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P
K P V N Q V Y T V Q I S T K S G D W K S K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V
K Q T Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N
L G Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E D E R T L V R R N N T F L S L R D V F
G K D L I Y T L Y Y W K S S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F
S V Q A V I P S R T V N R K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E N W V N V I S D
L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C F L L E L Q
V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C
E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S (配列番号189) と少なくと
も 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86
% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少な
くとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一
、または 100% 同一) の配列を含み得る。

【0451】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCT
CCGGCACCAACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATG
GAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCC
AAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGAGATCTCCACCA
AATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGA
CACCGAGTGATTTAACCAGACGAAATCGTCAAGGACGTC
AAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTACCCCGCTG
GCAATGTGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTA
CGAGAATTCCCCCGAATTACCCCTTATTTAGAGACCAAT
TTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCA
CCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGT
GCGGCGGAATAACACATTTTATCCCTCCGGGATGTGTTC
GGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCA
GCTCCTCCGGCAAAGAGACCGCTAAGACCAACACCAACGA
GTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTC
AGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGA
AGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGATGGGCCAAGAAAA
GGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGAT
TTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAAGTCCATGCATATCG

ACGCCACTTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTG
TAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAA
GTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACA
CCGTGGAGAAATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATC
CAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGC
GAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAAT
CCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配
列番号190）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

【0452】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSQGGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKN
YVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGN
NERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKK
PPKEFLERFKSL LQKMIHQHLS SRTHGSEDS SGT TNTVAA
YNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC
FYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSA
GEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSF EQVGTKVNVTVED
ERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTL YWKSSSSSGKK TAK
TNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVEC
MGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD
VHPSCKV TAMKCFLL ELQVISLES GDASIHDTVENLIILA
NNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQS FVHIVQMF
INTS（配列番号191）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90
%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少な
くとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

20

【0453】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCG
GATGAGGCAGCTCATCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAAC
TACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCG
AGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTG
CTTTCAGAAAGGCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAAC
AACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGC
GGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAAGCA
CAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAG
CCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGC
AGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGG
CTCCGAGGACTCCTCCGGCACCAACCAATACCGTGGCCGCT
TATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCT
TGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGT
GCAGATCTCCACCAAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGC
TTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAA
TCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTT
TTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCT
GGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATTCACCCCTT

30

40

50

ATTTAGAGACCAATTTAGGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTT
CGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGAT
GAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTTATCCC
TCCGGGGATGTGTTCTGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTA
CTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAGACCGCTAAG
ACCAACACCAACGAGTTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCG
AGAACTACTGCTTCAGCGTGCAGCGTGCATCCCTTCTCG
TACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGC
ATGGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGGTGA
ACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCA
GTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGAC
GTGCACCCCTCTTGTAAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTT
TACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGC
TAGCATCCACGACACCGTGGAGAAATTTAATCATTTTAGCC
AATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCG
GCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAA
GGAGTTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTT
ATCAATACCTCC（配列番号192）と少なくとも80%同一（例えば、少なく
とも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一
、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも9
6%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列
によってコードされる。

【0454】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCSSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFI
ILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDITC PPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGF
KRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R（配列番号193
）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少
なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%
同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく
とも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0455】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCGGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCA ACTGCA CGATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCA TTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGG

TGGAGGTGGGAGTATTCTCTCCACGTCAGAAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAATTTCTGCGATGTGAGGTTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCACA
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACATCACGTGTCCTCCTCCTA
TGTCCGTGGAACACGACAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAG
CTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTTC
AAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGT
TGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAG
TCTCAAATGTATTAGA（配列番号194）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列によってコードされる。

【0456】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITTSICEKPEVCV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEELYNTSNPDGGGSG
GGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFRSTCDNQKSCMSNCSITTSICEKPEVCVAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFF
MCSCSSDECNDNIIFSEELYNTSNPDITCPPPMSEHADIW
VKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH
WTTPSLKCIIR（配列番号195）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも
82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少
なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%
同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含
み得る。

【0457】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCTGCAATGTCCAACCTGCAC
GATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTCGCTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGA
CCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCAGACTTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACAATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA

GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCTCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTTCTGC
GATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAAGTCCTGTA
TGAGCAACTGCACAATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATCAC
GTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGACATCTGG
GTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTT
GTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAGCCGGCACGTCCAGCCT
GACGGAGTGC GTTGAACAAGGCCACGAATGTGCCCCAC
TGGACAACCCCCAGTCTCAAATGTATTAGA（配列番号196）と
少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一
、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも9
9%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

20

【0458】

例示的な多鎖キメラポリペプチドータイプC

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-7受容体またはIL-21受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

30

【0459】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0460】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

40

【0461】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0462】

50

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性IL-21（例えば、可溶性ヒトIL-21ポリペプチド）または可溶性IL-7（例えば、可溶性ヒトIL-7ポリペプチド）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、可溶性IL-21または可溶性IL-7である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの両方が、IL-21受容体またはIL-7受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

10

【0463】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-21受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-7受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-7受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-21受容体に特異的に結合する。

【0464】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性IL-21（例えば、可溶性ヒトIL-21）を含む。

20

【0465】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSICKKLRKPPSTNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H Q H L S S R T H G S E D S（配列番号83）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

30

【0466】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAAATGCGTCAACTTATAGATATTTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACA AACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCTGTTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTA AAAAGCTGAAGAGGAAACCACTTCCACAAATG CAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTTCATGTGATTTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAAATCTTAGAAAGATTCAAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCTCTAGAACACACGGGAAGTGAAGATTCC（配列番号197）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

40

【0467】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT

50

GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCGAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC (配列番号182) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

【0468】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7配列は、

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFN
FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK
EQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH (配列番号79)
と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列を含む。

【0469】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、
GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGA
GTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCAT
GAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAAC
TTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTA
TGTTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCT
TAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTA
AAAGTTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTG
GCCAGGT TAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGC
CCAACCAACAAGAGTTTGGGAAGAAAATAAATCTTTAAAG
GAACAGAAAAAACTGAATGACTTTGTGTTTCTTAAAGAGAC
TATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAATAAAATTTTGT
GGGCACTAAAGAACAC (配列番号198) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

【0470】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLSSSRTHGSEDS SGTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEP
KPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYT TDT ECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETN
LGQPTIQSF EQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVF

GKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF
SVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISD
LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQ
VISLESGDASIHDIVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC
EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINITS（配列番号199）と少なく
とも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86
%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少な
くとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同
一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0471】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTT
TAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTT
GGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACA
AACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCTGTTTTTCAGAAGGCC
AACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAAT
CAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAACCACTTCC
ACAAATGTCAGGGAGAAAGACAGAAACACAGACTAACATGCC
CTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATT
CCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCA
CAGCATCTGTCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCT
CAGGCACCTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTG
GAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAACCC
AAACCCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTA
AGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGA
CACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTG
AAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAG
GGAATGTGGAGAGCACCGGTCTGCTGGGGAGCCTCTGTA
TGAGAACTCCCCAGAGTTTACACCTTACCTGGAGACAAAC
CTCGGACAGCCAACAATTTCAGAGTTTTTGAACAGGTGGGA
CAAAAGTGAAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGT
CAGAAGGAACAACACTTTCTTAAGCCTCCGGGATGTTTTT
GGCAAGGACTTAATTTATACACTTTATTATTGGAAATCTT
CAAGTTTCAGGAAAGAAAAACAGCCAAAACAACACTAATGA
GTTTTTTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTC
AGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCGAACAGTTAAACCGGA
AGAGTACAGACAGCCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAA
AGGGGAATTCAGAGAAAACTGGGTGAACGTCATCAGCGAT
TTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCG
ACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTG
TAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAA
GTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACA
CCGTGGAGAAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTTTATC
CAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTG
GAAGAGCTGGAGGAGAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAAT
CTTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配
列番号200）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

20

30

40

50

【0472】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MGVKVLFALICIAVAEAQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNY
VNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNN
ERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKP
PKEFLERFKSL LQKMIHQHLS SRTHGSEDS SGT TNTVAAY
NL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF
YTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAG
EPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSF EQVGTKVNVTV EDE
RTLVR RNNTFLSLRDVFGKDLIYTL YWKSSSSSGKKTAKT
NTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECM
GQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV
HPSCKVTAMKCFLL ELQVISLES GDASIHD TVENLIILAN
NSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFI
NTS（配列番号201）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少
なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%
同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

10

【0473】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTGGCCCTTATTTGTATTGCTG
TGGCCGAGGCCCAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAAT
GCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTAT
GTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAG
ATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTCTCTGTTT
TCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAAT
GAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGA
AACCACCTTCCACAAATGCAGGGGAGAAGACAGAAACACAG
ACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCA
CCCAAAGAATTCTCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAA
AGATGATTTCATCAGCATCTGTCTCTAGAACACACGGAAG
TGAAGATTCTCTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATAT
AATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGG
AGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTC A
AATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTT
TACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTG
TGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTC
CTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTCTGCTGGG
GAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACC
TGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGTTTTGA
ACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAA
CGGACTTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCTAAGCCTCC
GGGATGTTTTTTGGCAAGGACTTAATTTATACACTTTATTA
TTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACA
AACACTAATGAGTTTTTTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAA
ACTACTGTTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCGAAC
AGTTAACC GGAAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGATG
GGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAAAAC TGGGTGAACG
TCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATT CAGTC
CATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTG

20

30

40

50

C A C C C C T C T T G T A A G G T G A C C G C C A T G A A A T G T T T T T T A C
T G G A G C T G C A A G T T A T C T C T T T A G A G A G C G G A G A C G C T A G
C A T C C A C G A C A C C G T G G A G A A T T T A A T C A T T T T A G C C A A T
A A C T C T T T A T C C A G C A A C G G C A A C G T G A C A G A G T C C G G C T
G C A A G G A G T G C G A A G A G C T G G A G G A G A A G A A C A T C A A G G A
G T T T C T G C A A T C C T T T G T G C A C A T T G T C C A G A T G T T C A T C
A A T A C C T C C (配列番号202)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも8
2%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少な
くとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同
一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によっ
てコードされる。

10

【0474】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

D C D I E G K D G K Q Y E S V L M V S I D Q L L D S M K E I G S N C L N N E F N
F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L R Q F L K M N S T G D F D L H L L
K V S E G T T I L L N C T G Q V K G R K P A A L G E A Q P T K S L E E N K S L K
E Q K K L N D L C F L K R L L Q E I K T C W N K I L M G T K E H I T C P P P M S
V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T S S L T E C V L N
K A T N V A H W T T P S L K C I R (配列番号203)と少なくとも80%同一(例え
ば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なく
とも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同
一)の配列を含み得る。

20

【0475】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

G A T T G T G A T A T T G A A G G T A A A G A T G G C A A A C A A T A T G A G A
G T G T T C T A A T G G T C A G C A T C G A T C A A T T A T T G G A C A G C A T
G A A A G A A A T T G G T A G C A A T T G C C T G A A T A A T G A A T T T A A C
T T T T T T A A A A G A C A T A T C T G T G A T G C T A A T A A G G A A G G T A
T G T T T T T A T T C C G T G C T G C T C G C A A G T T G A G G C A A T T T C T
T A A A A T G A A T A G C A C T G G T G A T T T T G A T C T C C A C T T A T T A
A A A G T T T C A G A A G G C A C A A C A A T A C T G T T G A A C T G C A C T G
G C C A G G T T A A A G G A A G A A A A C C A G C T G C C C T G G G T G A A G C
C C A A C C A A C A A A G A G T T T G G A A G A A A A T A A A T C T T T A A A G
G A A C A G A A A A A A C T G A A T G A C T T G T G T T T C C T A A A G A G A C
T A T T A C A A G A G A T A A A A A C T T G T T G G A A T A A A A T T T T G A T
G G G C A C T A A A G A A C A C A T C A C G T G C C C T C C C C C A T G T C C
G T G G A A C A C G C A G A C A T C T G G G T C A A G A G C T A C A G C T T G T
A C T C C A G G G A G C G G T A C A T T T G T A A C T C T G G T T T C A A G C G
T A A A G C C G G C A C G T C C A G C C T G A C G G A G T G C G T G T T G A A C
A A G G C C A C G A A T G T C G C C C A C T G G A C A A C C C C C A G T C T C A
A A T G C A T T A G A (配列番号204)と少なくとも80%同一(例えば、少なく
とも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同
一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なく
とも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同
一)の配列によつてコードされる。

30

40

【0476】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

M G V K V L F A L I C I A V A E A D C D I E G K D G K Q Y E S V L M V S I D Q L
L D S M K E I G S N C L N N E F N F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L

50

RQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITLLNCTGQVKGRKPAA
LGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLQLQEIKTWN
KILMGTKEHITCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNS
GFKRKAGTSSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R (配列番号 2
05) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、
少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、
少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なく
とも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含み得る。

【0477】

いくつかの実施形態では、第 2 のキメラポリペプチドは、

ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTGGCCCTTATTTGTATTGCTG
TGGCCGAGGCCGATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAA
ACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTA
TTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCCTGAATA
ATGAATTTTAACTTTTTTAAAGACATATCTGTGATGCTAA
TAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTG
AGGCAATTTCTTAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGTATC
TCCACTTATTAAAGTTTTCAGAAAGGCACAACAATACTGTT
GAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAACCAGCTGCC
CTGGGTGAAGCCCAACCAACAAGAGTTTGGAAAGAAAATA
AATCTTTAAAGGAACAGAAATAAAGTGAATGACTTGTGTTT
CCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAACTTGTGTGAAT
AAAATTTTGTATGGGCACTAAAGAACACATCACGTGCCCTC
CCCCCATGTCCGTGGAACACGCGACATCTGGGTCAAGAG
CTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCT
GGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGT
GCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAAC
CCCCAGTCTCAAATGCATTAGA (配列番号 206) と少なくとも 80%
同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、
少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94
% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または
100% 同一) の配列によってコードされる。

【0478】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプ D

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、
第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインは各々独立して、IL-7 受容
体または IL-21 受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいく
つかの例では、第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第 1 のキメラポリ
ペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例
では、第 1 のキメラポリペプチドは、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメ
インと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的
なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0479】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメイン
と一対の親和性ドメインの第 1 のドメインは、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接
隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 のキメ
ラポリペプチドは、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和
性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的な
リンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0480】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0481】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0482】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性IL-21（例えば、可溶性ヒトIL-21ポリペプチド）または可溶性IL-7（例えば、可溶性ヒトIL-7ポリペプチド）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、可溶性IL-21または可溶性IL-7である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの両方が、IL-21受容体またはIL-7受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0483】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-21受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-7受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-7受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-21受容体に特異的に結合する。

【0484】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H Q H L S S R T H G S E D S（配列番号83）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0485】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACA AACTGTGAGTGGTCAGCTTTTCTCTGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAAGCAAATACAGGAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCAACCCAAAGAATTCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAGATGATTCAAT

CAGCATCTGTCTCTAGAACACACGGAGTGAAGATTCC (配列番号197)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0486】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCTTCCCGAGGACGTGGAGACC AACTGCGAGTGGTCCGCTTCTCCTGCTTTCAGAAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCATCAGCACCTGTCTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC (配列番号182)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0487】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7配列は、

DCDIEGKDQKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH (配列番号79)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む。

【0488】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTA TGTTTTTTATTTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTA AAAGTTTTCAGAAGGCAACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAGAGTTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACTTTGTGTTTCTCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTAAAGAACAAC (配列番号198)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0489】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFN
FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK
EQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTK EHS GTTNTVA
AYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSK
CFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGS
AGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV TVE
DERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY TLYYWKSSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVE
CMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES
DVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHD TVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQM
FINTS（配列番号207）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、
少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、
少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

10

【0490】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

GATTGCGACATCGAGGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTT CAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCT
GAAGATGAACCTCCACCGGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGGAGAGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGGAGAACAAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGC
TGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAAACCAACACAGTCGCT
GCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCACCAACTTCAAAACCA
TCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACAC
CGTGCGAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA
TGTTTCTATACCAACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATG
AGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGT
GTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCC
GCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCC
CTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAG
CTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAG
GACGAGCGGACTTTAGTGCGGGCGGAACAACACCTTTCTCA
GCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACT
GTATTACTGGAAGTCTCTTCTCCTCCGGCAAAGAAGACAGCT
AAAACCAACACAAACGAGTTTTTAAATCGACGTGGATAAAG
GCGAAAAC TACTGTTTTAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTC
CCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAG
TGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGG
TGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAAT
TCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCC

20

30

40

50

GACGTGCACCCCTCTTGTAAAGGTGACCGCCATGAAATGTT
TTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGA
CGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTA
GCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACAT
CAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGACATTGTCCAGATG
TTCATCAATACCTCC (配列番号208)と少なくとも80%同一(例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
)の配列によってコードされる。

10

【0491】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSDDCDIEGKDGKQYESVLMVSIIDQ
LLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK
LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITLLNCTGQVKGRKPA
ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLQLQEIKTCW
NKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV
NQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQT
YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQ
PTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKD
LIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQ
AVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKK
IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKCFLLLELQVIS
LES GDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL
EEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS (配列番号209)と少なくとも80
%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一
、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも9
4%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、また
は100%同一)の配列を含み得る。

20

30

【0492】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTTCT
CCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGG
CAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAG
CTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCA
ACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGC
CAACAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTCAAGGGCCGCCAGGAAA
CTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACCTCCACCGGCGACTTTCG
ACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGGCAACCACCATCCT
GCTGAACCTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCT
GCTCTGGGAGAGGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGA
ACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAGAAGAGCTGAACGACCTGTG
CTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAAGGAGATCAAGACCTGCTGG
AACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAA
CCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCAC
CAACTTCAAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCACCAAGTCCGGCG
ACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTG
CGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACC

40

50

TACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGG
AGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAG
CCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAG
CCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGA
ATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAA
CAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGAT
TTAATCTACACACTGTATTACTGGAAAGTCCTCTTCCTCCG
GCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAAT
CGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAA
GCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCG
ATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCGCAAGAAAAGGGCGAGTT
CCGGGAGAACTGGGTGAACGTCAATCAGCGATTTAAAGAAG
ATCGAAGATTTAATTCAAGTCCATGCATATCGACGCCACTT
TATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGAC
CGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCT
TTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGA
ATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGG
CAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTG
GAGGAGAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGC
ACATTTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号210）と少
なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99
%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0493】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLSSSRTHGSEDSITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERY
ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLK CIR（配
列番号211）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0494】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCGAGCTCA
TCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGG CAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCA
TTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACAT
CTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTAT
ATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGCA

GCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG（配列番号212）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0495】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSQGGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKN
YVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGN
NERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKK
PPKEFLERFKSL LQKMIHQHLS SRTHGSEDSITCPPPM SV
EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNK
ATNVAHWTTPSLK CIR（配列番号213）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0496】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCG
GATGAGGCGAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAAC
TACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCTGCCCCCG
AGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG
CTTTCAGAAGGCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAAC
AACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGC
GGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAAGCA
CAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAAGAAAG
CCCCCCAAGGAGTTCTTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGC
AGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCTCCTCCAGGACCCACGG
CTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTG
GAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACA
GCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAA
GGCCGGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGT
GCATCCGG（配列番号214）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0497】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプE

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-18（例えば、可溶性ヒトIL-18）受容体、IL-12（例えば、可溶性ヒトIL-12）受容体、またはCD16（例えば、抗CD16 s c F v）に特異的に結合する。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的

結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、CD16またはIL-12受容体に特異的に結合する。

【0498】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0499】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0500】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0501】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0502】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一对の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0503】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0504】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0505】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の抗原結合ドメインのうちの1つ以上は、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の抗原結合ドメイン

10

20

30

40

50

は各々、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単ドメイン抗体を含む。

【0506】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方は、可溶性IL-15または可溶性IL-18である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、可溶性IL-15または可溶性IL-18である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの両方が、IL-18受容体またはIL-12受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

10

【0507】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-12受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-18受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-18受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-12受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはCD16に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-18受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-18受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはCD16に特異的に結合する。

20

【0508】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じ抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じアミノ酸配列を含む。

30

【0509】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性IL-18（例えば、可溶性ヒトIL-18）を含む。

【0510】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-18は、YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTTVQNED（配列番号109）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

40

【0511】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-18は、TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAAATGCCCCCGGACCATCTTCAATTATCTCCATGTACAAGG

50

ACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAA
GTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATC
ATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGG
ACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCC
CGGTCAAGATAACAAGATGCAGTTTCGAATCCTCCTCCTAC
GAGGGCTACTTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGGATTTAT
TCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCG
TTCCATCATGTTCAACCGTCCAAAACGAGGAT（配列番号171）
と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な
くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも
99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0512】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメイン
は、可溶性IL-12（例えば、可溶性ヒトIL-12）を含む。これらの多鎖キメラポ
リペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-15は、可溶性ヒトIL-12
β（p40）配列および可溶性ヒトIL-12α（p35）配列を含む。これらの多鎖キ
メラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性IL-15（例えば、可溶性ヒト
IL-15）は、可溶性IL-12β（p40）配列と可溶性ヒトIL-12α（p35）
配列との間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカー配列のうちのい
ずれか）をさらに含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカー
配列は、GGGGSGGGSGGGGS（配列番号102）を含む。

【0513】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12β
（p40）配列は、
IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL
DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYCHKGGEVLSHSL
LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTC
WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
RGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLP I EVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW
STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRK
NASISVRAQDRYYSSSSWSEWASVPCS（配列番号81）と少なくとも
80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%
同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少な
くとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、
または100%同一）の配列を含む。

【0514】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12β
（p40）は、
ATTTGGGAACCTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCTGAACCTGG
ACTGGTATCCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGGTCTCAC
TTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCCTC
GATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCCCTCA
CAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACAC
ATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCTCTTATTA
TTATTACACAAGAAGGAAGACGGAAATCTGGTCCACCGACA
TTTTAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTT
AAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCTTTTCACTTGT
TGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCG

TGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCCTCAAGGTGTGAC
ATGTGGAGCCGCTACCCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCTGTGGC
GATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAG
ATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGA
GGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCG
ATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAG
CCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGG
AGCACACCCACAGCTACTTCTCTTTAACTTTTGTGTGC
AAGTTCAAGGTAAGAGCAAGCGGGAGAAAGAACCGGGT
GTTTACCGACAAAACCAGCGCCACC GTCATCTGTGCGGAAG
AACGCCCTCCATCAGCGTGAAGGGCTCAAGATCGTTATTACT
CCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCCTTGTTC C (配
列番号172)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0515】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12 α
(p35)は、

RNLPVATPDPMFPC LHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY
PCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET
SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNM L AVIDELMQALNFNSE TVPQKSS
LEEPDFYKTKIKLCIL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (配列
番号80)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%
同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なく
とも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、
少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む。

【0516】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-12 α
(p35)は、

CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCC
CTTGTTTACACCAACAGCCAGAAATTTACTGAGGGCCGTGAG
CAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAATTTTAC
CCTTGCAACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACC
AGGACAAGACATCCACC GTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGA
GCTGACAAAGAACGAGTCTTGCTCTCAACTCTCGTGAAACC
AGCTTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCCGGAAGA
CCTCCTTTTATGATGGCTTTTATGCCCTCAGCTCCATCTACGA
GGATTTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAAC
GCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGGCAGATCTTTT TAG
ACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGC
TTTAAACTTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAAGTCCTCC
CTCGAGGAGCCCCGATTTT TACAAGACAAAGATCAAAC TGT
GCATTTTACTCCACGCC TTTAGGATCCGGGCCGTGACCAT
TGACCGGGT CATGAGCTATTTAAACGCCAGC (配列番号173)
と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な
くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく

10

20

30

40

50

99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0517】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、CD16に特異的に結合するscFv(例えば、抗CD16 scFv)を含む。

【0518】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

SELTDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ
APVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSRDS SGNHVVFGGGTKLTVGH(配列番号215)と少なく
くとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも
86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少
なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%
同一、または100%同一)の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0519】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGG
GCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAG
GTCCTACTACGCCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAG
GCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCCCT
CCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAA
CACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGAC
GAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCA
ACCATGTGTGGTGTTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGG
CCAT(配列番号216)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90
%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の軽鎖可変ドメイン配列
によってコードされる。

【0520】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQA
PGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDDYWGQGTLLVTVSR(配列
番号217)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84
%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なく
とも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一
、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0521】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGC
CTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTT
CACCTTCGACGACTACGGCATGTCTCTGGGTGAGGCAGGCT
CCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGA
ACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAG
GTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTAC
CTGCAGATGAACCTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGT

ACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTTCGACTACTG
GGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGG（配列番号218）
と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な
くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも
99%同一、または100%同一）の重鎖可変ドメイン配列によってコードされる。

【0522】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRD
NAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKI
ISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDKMQFESSY
EGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE DSGT
TNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSG
DWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNV
ESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSF EQVGTKV
NVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTL YWKSSSS
GKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKST
DSPVECMGQEKGEFRE NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
LYTESDVHPSCKV TAMKCFLLLELQVISLESGDAS IHD TVE
NLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKN IKEFLQSFV
HIVQMFIN TS（配列番号174）と少なくとも80%同一（例えば、少な
くとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少
なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%
同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含
み得る。

【0523】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

TACTTCGGCAAAC TGGAAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGA
ATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCG
GCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGAC
AATGCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGG
ACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAA
GTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGAGAGAACAGATC
ATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGG
ACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCC
CGGTCAAGATAACAAGATGCAGTTTGAATCCTCCTCCTAC
GAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTAT
TCAAGCTGATCCTCAAGAGGAGGACGAGCTGGGCGATCG
TTCCATCATGTTCAACCGTCCAAAACGAGGATAGCGGCACA
ACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCA
CCAACCTTCAAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGT
TAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGC
GACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCAACCGACACCGAGT
GCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGAC
CTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTG
GAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAAC A
GCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACA
GCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGA
ACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGA

TTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCTCC
GGCAAGAAGACAGCTAAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAA
TCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTTTTCAGCGTGCA
AGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCC
GATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCGCAAGAAAAGGGCGAGT
TCCGGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTTAAAGAA
GATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACT
TTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGA
CCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTC
TTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAG
AATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACG
GCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCT
GGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTG
CACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号175）と
少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一
、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも9
9%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0524】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYS SYFGKLESKLSVIRN LNDQVLFI
DQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAV
TISVKCEKISTLSCENKIIISFKEMNPPDNIKDKSDIIF
QRSVPGHDKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNE DSGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEW
EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYT TDTECDLTDEIVK
DVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLE
TNLGQPTIQSF EQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRD
VFGKDLIYTLIYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENY
CFSVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREWNVNI
SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKCFLL
LQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCK
ECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS（配列番号176）と少な
くとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少
なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%
同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0525】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTACATTTATCTCTTTACTGTTCTCTCTCT
CCAGCGCCTACAGCTACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCT
GAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATC
GATCAAGGTAACCGGCCCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACT
CCGATTGCGGGACAATGCCCCCGGACCATCTTCATTAT
CTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTG
ACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTT
GTGAGAACAAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCC
CGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTC
CAGCGGTCCGTGCCCGGTACGATAACAAGATGCAGTTTCG
AATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTATAGCTTGTTGAAAA

GGAGAGGGATTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGAC
GAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCAACCGTCCAAAACG
AGGATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCT
CACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAAACCATCCTCGAATGG
GAACCCCAAACCCGTTAACCAGTTTACACCGTGCGAGATCA
GCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATAC
CACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA
GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACC
CCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCC
TTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAG
ACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAG
TTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGAC
TTTAGTGC GGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGAT
GTGTTCCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGA
AGTCCTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACAC
AAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTAC
TGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGA
ATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCGATGGGCCA
AGAAAAGGGCGAGTTCCGGGGAGAACTGGGTGAACGTCATC
AGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGC
ATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCC
CTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAG
CTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCC
ACGACACCGTGGAAGAATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTC
TTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGGCTGCAAG
GAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTTGTCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATAC
CTCC (配列番号177) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90
%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列によってコードさ
れる。

【0526】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL
DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTKHKGGEVLSHSL
LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTC
WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
RGDNKEYEYSVECEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKY
ENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTW
STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRK
NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGG
SRNLPVATPDPMFPC LHH SQNL LRAVSNMLQKARQTLEF
YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE
TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM
NAKL LMDPKRQIFLDQNM L AVIDELMQALNFNSETVPQKS
SLEEPDFYKTKIKLCIL L HAFRIRAVTIDRVMSYLNASIT
CPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSL
TECVLNKATNVAHWTTPSLKCI RSELTQDPAVSVALGQTV
RITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIY GKNNRPSGIP

DRFSGSSSGNTASLTITGAQAED EADYYCNSRDS SGNHVV
FGGGTKLTVGHGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRP
GGSRLRLSCAASGFTFDDYGM SWVRQAPGKGLEWVSGINWN
GGSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY
YCARGRSL LFDYW GQGT LVT VSR (配列番号223)と少なくとも80
%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、
少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、
少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含み得る。

【0527】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATTTGGGAAC TGAAGAAGGACGTC TACGTGGT CGAAC TGG
ACTGGTATCCC GATGCTCCC GGC GAAATGGTGGT GCTCAC
TTGTGACACCC CCGAAGAAGACGGC ATCACTTGG ACCCTC
GATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAGACCTCA
CAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACAC
ATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCTCTTATTA
TTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACA
TTTTAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTT
AAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCTTTTCACTTGT
TGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCG
TGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGAC
ATGTGGAGCCGCTACCTCAGCGCTGAGAGGGTTCTGTGGC
GATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAAG
ATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGA
GGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCG
ATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAG
CCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGG
AGCACACCC CACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGC
AAGTTCAAGGTAAGAGCAAGCGGGAGAAAGAACCGGGT
GTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTGCGGAAG
AACGCCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACT
CCAGCAGCTGGTCCGAGTGCGGCCAGCGTGCTTGTTCGG
CGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGGCGGAGGA
TCTCGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGT
TCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAAATTTACTGAGGGCCGT
GAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAATTT
TACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCA
CCAAGGACAAGACATCCACC GTGGAGGCTTGTTTACCTCT
GGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAA
ACCAGCTTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGA
AGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTA
CGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATG
AACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTT
TAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCA
AGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACC GTCCCTCAGAAAGTCC
TCCCTCGAGGAGCCCGATT TTTTACAAGACAAAGATCAAAC
TGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGGCCGTGAC
CATTGACCGGGTCA TGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACA

10

20

30

40

50

TGCCCCCCTCCCATGAGCGTGAGCACGCCGACATCTGGG
TGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTG
TAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTC
ACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACT
GGACAACACCCCTCTTTAAAGTGCATCCGGTCCGAGCTGAC
CCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCCTG
AGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCTTACTACG
CCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCT
GGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCCCTCCGGGCATCCCT
GACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCC
TGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTA
CTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTG
TTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCCTGGGCCATGGCGGGC
GCGGCTCCGGAGGGCGGGCAGCGGGCAGGAGGATCCGA
GGTGACAGCTGGTGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCCT
GGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGGCTTCA
CCTTCGACGACTACGGCATGTCTGGGTGAGGCAGGCTCC
TGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAAC
GGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGT
TCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCT
GCAGATGAACTCCCTGAGGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC
TACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCTGTTTCTGACTACTGGG
GACAGGGCACCCCTGGTGACCCTGTCCAGG（配列番号224）と少
なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくと
も86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99
%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0528】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSISWELKKDVYVVELDWYPDAPGE
MVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD
AGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKE DGIWSTDILKDQKEPK
NKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD
PQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAAEE
SLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLK
PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKRE
KKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWAS
VPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPC LHH SQN
LLRAVSNMLQKARQTL EFPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE
ACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALC
LSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVI
DELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHA FR
IRAVTIDRVMSYLNASITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSR
ERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCI
RSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPG
QAPVLVIY GKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
DEADYYCNSRDSSGNHVVF GGGTKLTVGHGGGGSGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTTFDDYGM SW
VRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDN AK
NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSL LFDYWGGGTLVTVS

R（配列番号 225）と少なくとも 80% 同一（例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一）の配列を含み得る。

【0529】

いくつかの実施形態では、第 2 のキメラポリペプチドは、

```
ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCTCTTTA
GCAGCGCCTACTCCATTTGGGAAGTGAAGAAGGACGTCTA
CGTGGTTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAA
ATGGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCGAAGAAGACGGCA
TCACCTTGGACCCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTC
CGGAAAGACCCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCTGGAGAC
GCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCA
GCCATTCTTTATTATTATTACACAAGGAAGACGGGAAT
CTGGTCCACCGACATTTTAAAGATCAGAAGGAGCCCAAG
AATAAGACCTTTTAAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCG
GTCGTTTCACTTGTGTTGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGA
TTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAAGCTCCGAC
CCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTACCCCTCAGCGCTG
AGAGGGGTTCTGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGT
GGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAA
TCTTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAAC
TCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGA
CATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAG
CCTCTCAAAAATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAAT
ATCCCGACACTTGGAGCACACCCCAACAGCTACTTCTCTTT
AACCTTTTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAG
AAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCG
TCATCTGTTCGGAAGAACGCCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCA
AGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGAGGCGCAGC
GTGCCCTTGTTCGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCT
CCGGCGGGCGGAGGATCTCGTAACCTCCCCGTGGCTACCCC
CGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAAT
TTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGC
AGACTTTAGAAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGA
CCATGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCCTGGAG
GCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTC
TCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCAACACAAATGGCTCTTG
TTTAGCTTCCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGC
CTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGG
AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCCTAA
ACGGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATT
GATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCG
TCCCTCAGAAGTCTCCTCCTCGAGGAGCCCGATTTTACAA
GACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCCTTTAGG
ATCCGGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAA
ACGCCAGCATTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCA
CGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGG
GAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCG
GCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTAC
```

10

20

30

40

50

CAACGTGGCTCACTGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGCAATC
CGGTCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTC
TGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCT
GAGGTCCCTACTACGCCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGC
CAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAAACAGGC
CCTCCGGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGG
CAACACCGGCCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAG
GACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCG
GCAACCATGTGGTGTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGT
GGGCCCATGGCGGGCGGGCTCCGGAGGCGGGCGGCAGCGGC
GGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAG
GAGTGGTGAGGCTCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGC
TGCCTCCGGCTTCACTTTCGACGACTACGGCATGTCTCTGG
GTGAGGCGAGGCTCCTGGAAAGGGCCCTGGAGTGGGTGTCCG
GCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGGCTACGCCGATTC
CGTGAAAGGGCAGGTTCAACCATCAGCAGGGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGAGGGCCGAGG
ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCT
GTTTCGACTACTGGGGACAGGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCC
AGG（配列番号226）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少
なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%
同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされ
る。

10

20

【0530】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプF

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-7（例えば、可溶性ヒトIL-7）受容体、CD16（例えば、抗CD16 scFv）、またはIL-21（例えば、可溶性ヒトIL-21）受容体に特異的に結合する。本明細書に
記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリ
ペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメ
ラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的結合
ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの
実施形態では、追加の標的結合ドメインは、CD16またはIL-21受容体に特異的に
結合する。

30

【0531】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶
性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これら
の多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキ
メラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカ
ー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

40

【0532】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメイン
と一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接
隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメ
ラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和
性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的な
リンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0533】

50

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0534】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0535】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一对の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0536】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0537】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0538】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の抗原結合ドメインのうちの1つ以上は、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の抗原結合ドメインは各々、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単一ドメイン抗体を含む。

【0539】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは受容体I L-7に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはC D 16またはI L-21受容体に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性I L-7タンパク質を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性I L-7タンパク質は、可溶性ヒトI L-7である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、C D 16に特異的に結合する標的結合ドメインを含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、C D 16に特異的に結合するs c F vを含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、I L-21受容体に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、可溶性I L-21を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、可溶性IL-21は、可溶性ヒトIL-21である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、IL-21受容体に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、可溶性IL-21を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性IL-21は、可溶性ヒトIL-21である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、CD16に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0540】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じ抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じアミノ酸配列を含む。

【0541】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性IL-7（例えば、可溶性ヒトIL-7）を含む。

【0542】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH（配列番号79）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0543】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTA TGT TTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTA AAAGTTTTCAGAAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGC CCAACCAACAAGAGTTTGGAAAGAAAATAAATCTTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACTTGTGTTTCTCTAAAGAGAC TATTACAAGAGATAAAAACCTTGTTGGAATAAAAATTTTGATGGGCCTAAAGAACAC（配列番号198）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0544】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、

G A T T G C G A C A T C G A G G G C A A G G A C G G C A A G C A G T A C G A G A
G C G T G C T G A T G G T G T C C A T C G A C C A G C T G C T G G A C A G C A T
G A A G G A G A T C G G C T C C A A C T G C C T C A A C A A C G A G T T C A A C
T T C T T C A A G C G G C A C A T C T G C G A C G C C A A C A A G G A G G G C A
T G T T C C T G T T C A G G G C C G C C A G G A A A C T G C G G C A G T T C C T
G A A G A T G A A C T C C A C C G G C G A C T T C G A C C T G C A C C T G C T G
A A G G T G T C C G A G G G C A C C A C C A T C C T G C T G A A C T G C A C C G
G A C A G G T G A A G G G C C G G A A A C C T G C T G C T C T G G G A G A G G C
C C A A C C C A C C A A G A G C C T G G A G G A G A A C A A G T C C C T G A A G
G A G C A G A A G A A G C T G A A C G A C C T G T G C T T C C T G A A G A G G C
T G C T G C A G G A G A T C A A G A C C T G C T G G A A C A A G A T C C T G A T
G G G C A C C A A G G A G C A T (配列番号 227) と少なくとも 80% 同一 (例えば、
少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、
少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なく
とも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一
の配列によってコードされる。

【0545】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト IL-21 配
列は、

Q G Q D R H M I R M R Q L I D I V D Q L K N Y V N D L V P E F L P A P E D V E T
N C E W S A F S C F Q K A Q L K S A N T G N N E R I I N V S I K K L K R K P P S
T N A G R R Q K H R L T C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H
Q H L S S R T H G S E D S (配列番号 83) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なく
とも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、
少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なく
とも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列
を含む。

【0546】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト IL-21 は、
C A A G G T C A A G A T C G C C A C A T G A T T A G A A T G C G T C A A C T T A
T A G A T A T T G T T G A T C A G C T G A A A A T T A T G T G A A T G A C T T
G G T C C C T G A A T T T C T G C C A G C T C C A G A A G A T G T A G A G A C A
A A C T G T G A G T G G T C A G C T T T T T C C T G T T T T C A G A A G G C C C
A A C T A A A G T C A G C A A A T A C A G G A A A C A A T G A A A G G A T A A T
C A A T G T A T C A A T T A A A A A G C T G A A G A G G A A A C C A C C T T C C
A C A A A T G C A G G G A G A A G A C A G A A A C A C A G A C T A A C A T G C C
C T T C A T G T G A T T C T T A T G A G A A A A A A C C A C C C A A A G A A T T
C C T A G A A A G A T T C A A A T C A C T T C T C C A A A A G A T G A T T C A T
C A G C A T C T G T C C T C T A G A A C A C A C G G A A G T G A A G A T T C C (配
列番号 197) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なく
とも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少
なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なく
とも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列によってコードされる。

【0547】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト IL-21 は、
C A G G G C C A G G A C A G G C A C A T G A T C C G G A T G A G G C A G C T C A
T C G A C A T C G T C G A C C A G C T G A A G A A C T A C G T G A A C G A C C T
G G T G C C C G A G T T T C T G C C T G C C C C G A G G A C G T G G A G A C C
A A C T G C G A G T G G T C C G C C T T C T C C T G C T T T C A G A A G G C C C
A G C T G A A G T C C G C C A A C A C C G G C A A C A A C G A G C G G A T C A T

CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCTCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC (配列番号182) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

【0548】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、CD16に特異的に結合するscFv (例えば、抗CD16 scFv) を含む。

【0549】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ
APVLVIYGNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSRDS SGNHVVFGGGTKLTVGH (配列番号215) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0550】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGG
GCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAG
GTCCTACTACGCCCTCCTGGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAG
GCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCCCT
CCGGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAA
CACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGAC
GAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCA
ACCATGTGGTGTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGG
CCAT (配列番号216) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の軽鎖可変ドメイン配列によってコードされる。

【0551】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQA
PGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDDYWGQGTLVTVSR (配列番号217) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0552】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合

10

20

30

40

50

する s c F v は、

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGC
CTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTT
CACCTTCGACGACTACGGCATGTCTGGGTGAGGCGAGGCT
CCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGA
ACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAG
GTTCAACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCTGTTTCGACTACTG
GGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGG (配列番号 218)
と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少な
くとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同
一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも
99% 同一、または 100% 同一) の重鎖可変ドメイン配列によってコードされる。

【0553】

いくつかの実施形態では、第 1 のキメラポリペプチドは、

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFN
FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK
EQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTK EHS GTTNTVA
AYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSK
CFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGS
AGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV TVE
DERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY TLYYWKSSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVE
CMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES
DVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQM
FINTS (配列番号 207) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一
、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 9
0% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少な
くとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含み得る。

【0554】

いくつかの実施形態では、第 1 のキメラポリペプチドは、

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGCTCCAAC TGCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTT CAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCT
GAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGGCAACCACCATCCTGCTGAACTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGC
TGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCT
GCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCACCAACTTCAAAACCA
TCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACAC
CGTG CAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA
TGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATG

AGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGT
GTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCC
GCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCC
CTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAG
CTTTGAGCAAGTTGGCACAAGGTGAATGTGACAGTGGAG
GACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCA
GCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACT
GTATTACTGGAAGTCTCTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCT
AAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAG
GCGAAAACACTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTC
CCGGACCGGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAG
TGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGG
TGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAAT
TCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCC
GACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTT
TTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGA
CGCTAGCATCCACGACACCGTGAGAAATTTAATCATTTTA
GCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAGACAT
CAAGGAGTTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATG
TTCATCAATACCTCC（配列番号208）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列によってコードされる。

【0555】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSDDCDIEGKDGKQYESVLMVSIIDQ
LLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK
LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITLLNCTGQVKGRKPA
ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLQLQEIKT
CNKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV
NQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQT
YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQ
PTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKD
LIYTYLYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF
SVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKK
IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVIS
LES GDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL
EEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS（配列番号209）と少なくとも80
%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一
、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも9
4%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、また
は100%同一）の配列を含み得る。

【0556】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGG
CAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAG
CTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCA

ACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGC
CAACAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTCAAGGGCCGCCAGGAAA
CTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTTCG
ACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGGCACCAACCATCCT
GCTGAACCTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCT
GCTCTGGGAGAGGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGA
ACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTG
CTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGG
AACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAA
CCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCAC
CAACTTCAAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCG
ACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTG
CGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACC
TACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGG
AGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAG
CCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAG
CCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGA
ATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAA
CAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGAT
TTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCG
GCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAAT
CGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCGTGCAA
GCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGGTGAATAGGAAAAGCACCG
ATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTT
CCGGGAGAACTGGGTGAACGTCAATCAGCGATTTAAAGAAG
ATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTT
TATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGAC
CGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCT
TTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGA
ATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGG
CAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTG
GAGGAGAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGC
ACATTTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号210）と少
なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99
%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0557】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

SELTDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ
APVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSRDS SGNHVVFGGGTKLTVGHGGGSGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTTFDDYGMWV
RQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKN
SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGRSL LFDYWGGQGLVTVSR
ITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTS
SLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIRQGQDRHMI RMRQLID
IVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQL
KSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPS

CDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIHQHLSSRTHGSEDS（配列番号232）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0558】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGG
GCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAG
GTCCTACTACGCCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAG
GCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCCCT
CCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAA
CACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGAC
GAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCA
ACCATGTGGTGTTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGG
CCATGGCGGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGA
GGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAG
TGGTGAGGCCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGC
CTCCGGCTTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCTCTGGGTG
AGGCAGGCTCCTGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCCGGCA
TCAACTGGAAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGT
GAAGGGCAGGTTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAAC
TCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACA
CCGCCGCTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTT
CGACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCAGG
ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGAGGCACGCCGACA
TCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTA
TATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGC
AGCCTCACCCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGG
CTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGCAGGG
CCAGGACAGGCAACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGAC
ATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTG
CCGAGTTTCTGCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTG
CGAGTGGTCCGCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCCCAAGCTG
AAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACG
TGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAA
CGCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGC
TGTGACTCCTACGAGAAAGAACCCCAAGGAGTTCTCTGG
AGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCATCAGCA
CCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC（配列番号2

33）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0559】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSSEL TQDPAVSVALGQTVRITCQ
GDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSG
SSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGT
KLTVGHGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLR

L S C A A S G F T F D D Y G M S W V R Q A P G K G L E W V S G I N W N G G S T G
Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G
R S L L F D Y W G Q G T L V T V S R I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y
S R E R Y I C N S G F K R K A G T S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K
C I R Q G Q D R H M I R M R Q L I D I V D Q L K N Y V N D L V P E F L P A P E D
V E T N C E W S A F S C F Q K A Q L K S A N T G N N E R I I N V S I K K L K R K
P P S T N A G R R Q K H R L T C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K
M I H Q H L S S R T H G S E D S (配列番号234)と少なくとも80%同一(例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
)の配列を含み得る。

10

【0560】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C T
C C A G C G C C T A C T C C T C C G A G C T G A C C C A G G A C C C T G C T G T
G T C C G T G G C T C T G G G C C A G A C C G T G A G G A T C A C C T G C C A G
G G C G A C T C C C T G A G G T C C T A C T A C G C C T C C T G G T A C C A G C
A G A A G C C C G G C C A G G C T C C T G T G C T G G T G A T C T A C G G C A A
G A A C A A C A G G C C C T C C G G C A T C C C T G A C A G G T T C T C C G G A
T C C T C C T C C G G C A A C A C C G C C T C C C T G A C C A T C A C A G G C G
C T C A G G C C G A G G A C G A G G C T G A C T A C T A C T G C A A C T C C A G
G G A C T C C T C C G G C A A C C A T G T G G T G T T C G G C G G C G G C A C C
A A G C T G A C C G T G G G C C A T G G C G G C G G C G G C T C C G G A G G C G
G C G G C A G C G G C G G A G G A G G A T C C G A G G T G C A G C T G G T G G A
G T C C G G A G G A G G A G T G G T G A G G C C T G G A G G C T C C C T G A G G
C T G A G C T G T G C T G C C T C C G G C T T C A C C T T C G A C G A C T A C G
G C A T G T C C T G G G T G A G G C A G G C T C C T G G A A A G G G C C T G G A
G T G G G T G T C C G G C A T C A A C T G G A A C G G C G G A T C C A C C G G C
T A C G C C G A T T C C G T G A A G G G C A G G T T C A C C A T C A G C A G G G
A C A A C G C C A A G A A C T C C C T G T A C C T G C A G A T G A A C T C C C T
G A G G G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C A G G G G C
A G G T C C C T G C T G T T C G A C T A C T G G G G A C A G G G C A C C C T G G
T G A C C G T G T C C A G G A T T A C A T G C C C C C C T C C C A T G A G C G T
G G A G C A C G C C G A C A T C T G G G T G A A G A G C T A T A G C C T C T A C
A G C C G G G A G A G G T A T A T C T G T A A C A G C G G C T T C A A G A G G A
A G G C C G G C A C C A G C A G C C T C A C C G A G T G C G T G C T G A A T A A
G G C T A C C A A C G T G G C T C A C T G G A C A A C A C C C T C T T T A A A G
T G C A T C C G G C A G G G C C A G G A C A G G C A C A T G A T C C G G A T G A
G G C A G C T C A T C G A C A T C G T C G A C C A G C T G A A G A A C T A C G T
G A A C G A C C T G G T G C C C G A G T T T C T G C C T G C C C C C G A G G A C
G T G G A G A C C A A C T G C G A G T G G T C C G C C T T C T C C T G C T T T C
A G A A G G C C C A G C T G A A G T C C G C C A A C A C C G G C A A C A A C G A
G C G G A T C A T C A A C G T G A G C A T C A A G A A G C T G A A G C G G A A G
C C T C C C T C C A C A A A C G C C G G C A G G A G G C A G A A G C A C A G G C
T G A C C T G C C C C A G C T G T G A C T C C T A C G A G A A G A A G C C C C C
C A A G G A G T T C C T G G A G A G G T T C A A G T C C C T G C T G C A G A A G
A T G A T C C A T C A G C A C C T G T C C T C C A G G A C C C A C G G C T C C G
A G G A C T C C (配列番号235)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82
%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少な

20

30

40

50

とも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0561】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプG

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、TGFβ (例えば、ヒトTGFβRII受容体)、CD16 (例えば、抗CD16 scFv)、またはIL-21 (例えば、可溶性ヒトIL-21)受容体に特異的に結合する。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、CD16またはIL-21受容体に特異的に結合する。

【0562】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0563】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0564】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0565】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0566】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一对の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一对の親和性ドメインの第2のドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0567】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインと

の間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0568】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0569】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の抗原結合ドメインのうちの1つ以上は、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の抗原結合ドメインは各々、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v または単一ドメイン抗体を含む。

【0570】

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、T G F - β 、C D 1 6、またはI L - 2 1 受容体に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはT G F - β に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはC D 1 6 またはI L - 2 1 受容体に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性T G F - β 受容体である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性T G F - β 受容体は、可溶性T G F β R I I 受容体である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、C D 1 6 に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、C D 1 6 に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、C D 1 6 に特異的に結合するs c F v を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、I L - 2 1 受容体に特異的に結合する。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、可溶性I L - 2 1 を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、可溶性ヒトI L - 2 1 を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、I L - 2 1 受容体に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、可溶性I L - 2 1 を含む。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、可溶性I L - 2 1 は、可溶性ヒトI L - 2 1 である。本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、C D 1 6 に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0571】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じ抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上は、同じアミノ酸配列を含む。

【0572】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、TGFβRII受容体（例えば、可溶性ヒトTGFβRII受容体）を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGFβRIIは、第1の可溶性ヒトTGFβRII配列および第2の可溶性ヒトTGFβRII配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGFβRIIは、第1の可溶性ヒトTGFβRII配列と第2の可溶性ヒトTGFβRII配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカーは、配列GGGSGGGSGGGGS（配列番号102）を含む。

【0573】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGFβRII受容体配列は、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSI CEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETF FMCSCSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPD（配列番号183）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0574】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGFβRII受容体配列は、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSI CEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETF FMCSCSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPD（配列番号184）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0575】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGFβRII受容体配列は、
ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGAT
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCA ACTGTCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCA TTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAAGAAGACCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCTTGAT（配列番号185）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0576】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RII受容体配列は、

ATTCTCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTTCTGCGATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAAC CAGAAGTCTCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAA GAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAGAAAAAGAACCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC（配列番号186）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0577】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF β 受容体は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEV CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE EYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEV CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE EYNTSNPD（配列番号188）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0578】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF β RII受容体は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTTCTGCGATGTTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCTCTGCAATGTCCAACCTGCGAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA AAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTGCCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCCGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCGAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCCGTGA AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTTCTGCGATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG

CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCGAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGAC（配列番号187）と少なくとも80%同
一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または1
00%同一）の配列によってコードされる。

10

【0579】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21配
列は、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLS SRTHGSEDS（配列番号83）と少なくとも80%同一（例えば、少なく
とも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一
、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも9
6%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列
を含む。

20

【0580】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、
CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAAATGCGTCAACTTA
TAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTT
GGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACA
AACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTTCTGTTTTCAGAAAGGCC
AACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAAT
CAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACTTCC
ACAAATGCGAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCC
CTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATT
CCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATT CAT
CAGCATCTGTCTCTAGAACACACGGAAGTGAAAGATTCC（
配列番号197）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも
84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少
なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%
同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

30

【0581】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、
CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTCCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAAGAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCTCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC（
配列番号182）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも

40

50

84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0582】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED EADYYCNSRDS SGNHVVFGGGTKLTVGH (配列番号215)と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0583】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGTCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAA CACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGTGGTGTTCCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGGTGGGCCAT (配列番号216)と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の軽鎖可変ドメイン配列によってコードされる。

【0584】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDDYWGQGTLVTVSR (配列番号217)と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0585】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合するscFvは、

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGGAGGCTGTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCTCTGGGTGAGGCGAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACTGTCAGATGAACCTCCCTGAGGGGCCGAGGACACCGCCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTG

GGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCAGG（配列番号218）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の重鎖可変ドメイン配列によってコードされる。

【0586】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCCHD
PKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCS SCSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCCHD PKLPYHDFI
LEDAASPKCKIMKEKKKPGETFFMCS SCSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDSGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQV
YTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLA
RVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTI
QSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY
TLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVI
PSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIED
LIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEK
NIKEFLQS FVHIVQMFINTS（配列番号236）と少なくとも80%同一

（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0587】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCTGCGATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCAACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG CATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA

TACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAG
TCGCTGCCTATAACCTCACTTGGGAAGAGCACCAACTTCAA
AACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTT
TACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGT
CCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCAC
CGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCC
CGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTG
GTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATC
CAAAGCTTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTT
TCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTGGCAAAAGATTTAATCTAC
ACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGA
TAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATC
CCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCG
TTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAA
CTGGGTGAACGTCAATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGAT
TTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAG
AATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAA
ATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGC
GGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCA
TTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGAC
AGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAG
AACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCC
AGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号237）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列によってコードされる。

【0588】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV CV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKE
KKKPGETFFMCS SDECNDNIIFSE EYNTSNPDGGGSG
GGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV CVAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFF
MCS SDECNDNIIFSE EYNTSNPD SGTNTVAAYNL TWK
STNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYE
NSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVR
RNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEF
LIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECMGQEK
EFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCK
VTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHD TVENLIILANNSLS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS（配
列番号238）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な

10

20

30

40

50

くとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含み得る。

【0589】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGA
CCGTGTGTCAACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAATAATTCCCCCAGCTGTGCAAAATTCG
GATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAAGTCCCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGG
CACAAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAAG
AGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAAC
CCGTTAAACCAAGTTTACACCGGTGCGAGATCAGCACCAAGTC
CGGCGACTGGAAAGTCCAAATGTTTTCTATACCACCGACACC
GAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAAC
AGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAA
TGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAG
AACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAG
GACAGCCCAACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAA
GGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGG
CGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTTACTGGAAGTCTCTTTC
CTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTT
TTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTAGCG
TGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAAG
CACCGATAGCCCCGTGTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAAGGGC
GAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTATCAGCGATTTTAA
AGAAGATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGC
CACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAG
GTGACCGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTA
TCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGT
GGAGAATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAG

10

20

30

40

50

AGCTGGAGGAGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号2
39）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、
少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく
とも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0590】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ
APVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSRDS SGNHVVFGGGTKLTVGHGGGSGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTTFDDYGMSWV
RQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKN
SLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGRSL LFDYWGGGTLVTVSR
ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTS
SLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI RQGQDRHMI RMRQLID
IVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQL
KSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLT CPS
CDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIHQHLSSRTHGSEDS（配
列番号232）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0591】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGG
GCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAG
GTCCTACTACGCCCTCCTGGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAG
GCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCCCT
CCGGGCATCCCTGACAGGTTCCTCCGGATCCTCCTCCGGCAA
CACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGAC
GAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCA
ACCATGTGGTGTTCCGGCGGCGGCAACCAAGCTGACCGTGGG
CCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCGGCGGCA
GGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGAGTCCGGAGGAGGAG
TGGTGAGGCCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGC
CTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTG
AGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCA
TCAACTGGAAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGT
GAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAAC
TCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTT
CGACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCAGG
ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACA
TCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTA
TATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGC
AGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGG
CTCACTGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGATCCGGGCAGGG
CCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGAC
ATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTG

CCGAGTTTCTGCTGCCCGAGGACGTGGAGACCAACTG
CGAGTGGTCCGCTTCTCCTGCTTTCAGAAAGGCCAGCTG
AAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACG
TGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAA
CGCCGGCAGGAGGCAAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGC
TGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGG
AGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAAGAAGATGATCCATCAGCA
CCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC（配列番号2
33）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、
少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも9
2%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少な
くとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

【0592】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSSELTDPAVSVALGQTVRITCQ
GDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLLVIYGKNNRPSGIPDRFSG
SSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGT
KLTVGHGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLR
LSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTG
YADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG
RSLFLFDYWGGQGLVTVSRITCPPPMSEHADIWVKSYSLY
SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK
CIRQGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPED
VETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRK
PPSTNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K
MIHQHLSSRTHGSEDS（配列番号234）と少なくとも80%同一（例えば
、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列を含み得る。

20

30

【0593】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCTCCGAGCTGACCCAGGACCTGCTGT
GTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAG
GGCGACTCCCTGAGGTCTACTACGCCTCCTGGTACCAGC
AGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAA
GAACAACAGGCCCTCCGGGCATCCCTGACAGGTTCCTCCGGA
TCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCG
CTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAG
GGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCTGGCGGCGGCACC
AAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGGCGGCGGCTCCGGGAGGCG
GCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGA
GTCCGGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGG
CTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACG
GCATGTCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAGGGCCTGGA
GTGGGTGTCCGGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGC
TACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCAACCATCAGCAGGG
ACAACGCCAAGA AACTCCCTGTACCTGCAGATGA AACTCCCT
GAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGC

40

50

AGGTCCCTGCTGTTTCGACTACTGGGGACAGGGGCACCCCTGG
TGACCGTGTTCCAGGATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGT
GGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTAC
AGCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGA
AGGCCGGGCACAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAG
TGCATCCGGCAGGGCCAGGACAGGACACATGATCCGGATGA
GGCAGCTCATCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAACTACGT
GAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCTGCCCCCGAGGGAC
GTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCTTCTCCTGCTTTTC
AGAAGGCCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGA
GCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAG
CCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAAGACACAGGC
TGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCC
CAAGGAGTTTCTGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAG
ATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCG
AGGACTCC（配列番号235）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82
%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なく
とも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一
、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によって
コードされる。

【0594】

例示的な多鎖キメラポリペプチドータイプH

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-7受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0595】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0596】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0597】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0598】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-7受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0599】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、可溶性IL-7（例えば、可溶性ヒトIL-7）を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTK E H（配列番号79）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0600】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCTGAAGATGAACTCCACC GGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAA GCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT（配列番号227）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0601】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTK E HSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSF EQVGTKVNV TVE DERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY TLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIIL

ANNSSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQM
FINTS（配列番号207）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、
少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0602】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTTTCAAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCT
GAAGATGAACCTCCACCGGCGACTTTCGACCCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGGCACCAACCATCCTGCTGAACCTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGGC
TGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAAACCAACACAGTCGCT
GCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCACCAACTTCAAAAACCA
TCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACAC
CGTGCGAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAAGTCCAAA
TGTTTCTATACCAACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATG
AGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGT
GTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCC
GCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCC
CTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAG
CTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAG
GACGAGCGGACTTTAGTGCGGGCGGAACAACACCTTTCTCA
GCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAAGATTTAATCTACACACT
GTATTACTGGAAGTCTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCT
AAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAG
GCGAAAACCTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTC
CCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAG
TGCATGGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGGAGAACTGGG
TGAACGTCAATCAGCGATTTTAAAGAAGATCGAAGATTTAAT
TCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCC
GACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTT
TTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGA
CGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAAATTTAATCATTTTA
GCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAGAACAT
CAAGGAGTTTTCTGCAATCCTTTGTGCAATTGTCCAGATG
TTCATCAATACCTCC（配列番号208）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、
少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なく
とも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列によってコードされる。

【0603】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

10

20

30

40

50

MKWVTFISLLFLFSSAYS SDCDIEGKD GKGQYESVLMV SIDQ
LLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK
LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPA
ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCW
NKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV
NQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQT
YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQ
PTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKD
LIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQ
AVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKK
IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKCFLLLELQVIS
LES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL
EEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS（配列番号209）と少なくとも80
%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一
、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも9
4%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、また
は100%同一）の配列を含み得る。

【0604】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGG
CAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAG
CTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCA
ACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGC
CAACAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAA
CTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACCTCACCGGCGACTTCTG
ACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCT
GCTGAACCTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCT
GCTCTGGGAGAGGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGA
ACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTG
CTTCTCTGAAGAGGCTGCTGCGAGGAGATCAAGACCTGCTGG
AACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAA
CCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCAC
CAACTTCAAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCACCAAGTCCGGCG
ACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCAACCGACACCGAGTG
CGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACC
TACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGG
AGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAG
CCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAG
CCCAACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGA
ATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGGCGGAA
CAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCTGGCAAAGAT
TTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTCTCTCCG
GCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAAT
CGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCGTGCAA
GCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCG
ATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTT
CCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAG
ATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTT

10

20

30

40

50

TATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGAC
CGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCT
TTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGA
ATTTAATCATTTTAGCCAAATAACTCTTTATCCAGCAACGG
CAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTG
GAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGC
ACATTTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号210）と少
なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくと
も86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99
%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

【0605】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQL LDSMKEIGSNCLNNEFN
FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK
EQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEHITCPPPMS
VEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLN
KATNVAHWTTTPSLKCI R（配列番号203）と少なくとも80%同一（例え
ば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくと
も88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少
なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同
一）の配列を含み得る。

20

【0606】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGA
GTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCAT
GAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCCTGAATAATGAATTTAAC
TTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTA
TGTTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCT
TAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTA
AAAGTTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTG
GCCAGGT TAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGC
CCAACCAACAAGAGTTTGGGAAGAAAATAAATCTTTTAAAG
GAACAGAAAAAACTGAATGACTTTGTGTTTCTTAAAGAGAC
TATTACAAGAGATAAAAACTTGTGTTGGAATAAAAATTTTGAT
GGGCACTAAAGAACACATCACGTGCCCTCCCCCATGTCC
GTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGT
ACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCG
TAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGTAAC
AAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCA
AATGCATTAGA（配列番号204）と少なくとも80%同一（例えば、少なくと
も82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、
少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96
%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列に
よってコードされる。

30

40

【0607】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYS DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQ
LLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK

50

LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPA
ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCW
NKILMGTKEHITCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICN
SGFKRKAGTSSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIR (配列番号
250) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同
一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも
92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少
なくとも99%同一、または100%同一) の配列を含み得る。

【0608】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCT
CCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGG
CAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAG
CTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCA
ACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGC
CAACAAGGAGGGGCATGTTCTCTGTTCAAGGGCCGCCAGGAAA
CTGCGGCAGTTCTCTGAAGATGAACCTCCACCGGCGACTTCG
ACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCT
GCTGAACCTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCT
GCTCTGGGAGAGGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGA
ACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTG
CTTCTCTGAAGAGGCTGCTGCGAGGAGATCAAGACCTGCTGG
AACAAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATATTACATGCC
CCCCCTCCCATGAGCGTGGAAGCACGCCGACATCTGGGTGAA
GAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAAAC
AGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGCAGCCTCACCG
AGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGAC
AACACCCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG (配列番号251) と少なくとも
80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%
同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なく
とも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、
または100%同一) の配列によってコードされる。

【0609】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプI

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、TGF- β に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0610】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0611】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0612】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

10

【0613】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、TGF- β に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じエピトープに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。

【0614】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは、可溶性TGF- β 受容体（例えば、可溶性TGF β RII受容体、例えば、可溶性ヒトTGF β RII）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF β RII配列および第2の可溶性ヒトTGF β RII配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF β RII配列と第2の可溶性ヒトTGF β RII配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカーは、配列GGGGSGGGSGGGGS（配列番号102）を含む。

20

【0615】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF β RII受容体配列は、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSI CEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETF FMCSCSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPD（配列番号183）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

30

【0616】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RII受容体配列は、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSI CEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETF FMCSCSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPD（配列番号184）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

40

50

【0617】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

ATCCCCCCCCCATGTGC AAAAGAGCGTGAAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGT CAGGTT CAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCCTGCATGTCCA ACTTG CAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTTCTGGAGGACGCTGCCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCCGAGAGACCTTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCCTGAT（配列番号185）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

【0618】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

ATTCTCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTGAAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA AATTTCCCCAGCTGTGCA AATTTCTGCGATGTGAGGTTTTCACCTGCGACAAC CAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAA GAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGA AAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC（配列番号186）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

20

30

【0619】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF β 受容体は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEV CVAVWRKNDENITLET VCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEV CVAVWRKNDENITLET VCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD（配列番号188）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

40

50

【0620】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF- β 受容体は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGAC（配列番号187）と少なくとも80%同
一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または1
00%同一）の配列によってコードされる。

【0621】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEELYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFI
LEDAASPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDSTGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQV
YTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLA
RVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPLYLETNLGQPTI
QSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY
TLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVI
PSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIED
LIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKCFLLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK
NIKEFLQS FVHIVQMFINITS（配列番号236）と少なくとも80%同
一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10

0%同一)の配列を含み得る。

【0622】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCTTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCTCGACAGCGGCACAACCAACACAG
TCGCTGCCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAA
AACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTT
TACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGT
CCAAATGTTTCTATACCACCGACACCCGAGTGCGATCTCAC
CGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCC
CGGGTGTTTATAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTG
GTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATC
CAAAGCTTTTGAGCAAGTTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTT
TCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCTGGCAAAAGATTTAATCTAC
ACACTGTATTACTGGAAGTCCCTCTTCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAACAGAGTTTTTAATCGACGTGGA
TAAAGGCGAAAACCTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATC
CCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCG
TTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAA
CTGGGTGAACGTATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGAT
TTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAG
AATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAA
ATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGC
GGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCA
TTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGAC
AGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAG
AACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCC
AGATGTTTCATCAATACCTCC (配列番号237)と少なくとも80%同一

10

20

30

40

50

(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0623】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSISPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCS
SSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGSG
GGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCS
SSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDVQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYE
NSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVR
RNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEF
LIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEK
GEFRENVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCK
VTAMKCFLLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN
TS(配列番号238)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含み得る。

【0624】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCA
ACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAAGCCCCAAGAA
GTGTGCGTGGCCGTGGCGGAAAAATGACGAGAA
CATCACCTCTGGAGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATG
CATCATGAAGGAGAAGAAGAGCCCGGAGAGACCTTCT
TTATGTGTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACA
ACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACC
CTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAAGGTGGAGGTTCT
GGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAA
GAGCGTGGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACA
AATGGCGCCGTGAATAATCCCCAGCTGTGCAAAAT
CTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGA
AGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCT
GTGAGAAAGCCTCAGGAGGTGTCTGGCGGAAGAAT
GACGAGAAATATCACCTTGGAACCGTCTGCCACGAT
CCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAG
ACGCCGCGCCAGCCCTAAGTGATCATGAAGAAGAG
AAAAAGAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCT
CCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA

TCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGG
CACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGGAAG
AGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAAC
CCGTTAACCAAGTTTACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTC
CGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACC
GAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAAC
AGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAA
TGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAG
AACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAG
GACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAA
GGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGC GG
CGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTC
CTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTT
TTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCG
TGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAG
CACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGC
GAGTTCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAA
AGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGC
CACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAG
GTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTA
TCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGT
GGAGAATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGC GAAG
AGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号2
39）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、
少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく
とも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

20

30

【0625】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSI CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPDGGGGSGGGGS IPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSI CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HDPKLPYHDFI
LED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDITC PPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGF
KRKAGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCI R（配列番号193
）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少
なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく
とも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

40

【0626】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTT CAGCACCTGCGATAAT

50

CAG AAGT CCTGC ATGTCCA AACTG CAGCATCAC CTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCAC CCTTGGAGACCGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCAGACTTTCATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAAGAAAGAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAATATCACCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCAACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCTCCCA
TGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAG
CCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTC
AAGAGGAAGGCCGCCAGCAGCCTCACCGAGTGC GTGC
TGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCTC
TTTAAAGTGCATCCGG (配列番号257) と少なくとも80%同一 (例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
) の配列によってコードされる。

【0627】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKE
KKKPGETFFMCS SDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGSG
GGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFF
MCS SDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSEHADIW
VKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV AH
WTTPSLKCIR (配列番号195) と少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも
82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少
なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%
同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一) の配列を含
み得る。

【0628】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA

GCACCTGCGATAATCAGAAGTCTCTGCATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGC
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGA
CCGTGTGTACACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTTCTGC
GATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCTCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAGAAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTAC
ATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGG
GTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCT
GTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCCGGCACCAGCAGCCT
CACCGAGTGCCTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCAC
TGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGCATCCGG (配列番号259)と
少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一
、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも9
9%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

【0629】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプJ

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-7受容体、IL-21受容体、またはCD137L受容体に特異的に結合する。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、IL-21 (例えば、可溶性IL-21、例えば、可溶性ヒトIL-21) 受容体またはCD137L (例えば、可溶性CD137L、例えば、可溶性ヒトCD137L) 受容体に特異的に結合する。

【0630】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0631】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的な

リンカーのうちのいずれか)をさらに含む。

【0632】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか)をさらに含む。

【0633】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

10

【0634】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一对の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか)をさらに含む。

【0635】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列(例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか)をさらに含む。

20

【0636】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

30

【0637】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインおよび

【0638】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の標的結合ドメインは各々、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F vまたは単一ドメイン抗体を含む。

40

【0639】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-7受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-21受容体またはCD137L受容体に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、IL-21受容体またはCD137L受容体に特異的に結合する。

【0640】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性IL-7(例えば、可溶性ヒトIL-7)である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、
D C D I E G K D G K Q Y E S V L M V S I D Q L L D S M K E I G S N C L N N E F N

50

FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK
EQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH（配列番号79）
と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも
99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0641】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、
GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCT
GAAGATGAACCTCCACC GGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAAACAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGC
TGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCAT（配列番号227）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列によってコードされる。

【0642】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメイン
または追加の標的結合ドメインは、IL-21受容体に特異的に結合する。これらの多鎖
キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインまたは追加の標
的結合ドメインは、可溶性IL-21（例えば、可溶性ヒトIL-21）である。

【0643】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、
QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS IKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLT CPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLS SRTHGSEDS（配列番号83）と少なくとも80%同一（例えば、少なく
とも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一
、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも9
6%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列
を含む。

【0644】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、
CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCCAACACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT

CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC (配列番号182)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0645】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、CD137L受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、CD137L受容体に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインおよび／または追加の標的結合ドメインは、可溶性CD137L(例えば、可溶性ヒトCD137L)である。

【0646】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137Lは、

REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY
SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELR
RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASS
EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ
GATVVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE (配列番号260)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む。

【0647】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137Lは、

CGCGAGGGTCCCCGAGCTTTTCGCCCGACGATCCCCGCCGGCC
TCTTGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGC
CCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTAC
AGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCTGACGGGGGGCC
TGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAA
GGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGG
CGCGTGGTGGCCGGCGAGGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTG
CGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGC
CGCCCTGGCTTTTGACCGTGGAACCTGCCACCCGCCCTCCTCC
GAGGCTCGGAACTCGGCCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGC
TGCAACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCA
CACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAG
GGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAA
TCCCAGCCGGACTCCCTTCAACCGAGGTGGGAA (配列番号261)
)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0648】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137Lは、

DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS

LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSG
SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF
QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFR
VTPEI（配列番号262）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、
少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、
少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0649】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137L
は、

GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGG
CGCAGCTGGTGGCCCAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCC
CCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCC
CTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGC
TGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCA
ACTAGAGCTGCGGCGCGTGTTGGCCGGCGAGGGCTCAGGC
TCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTG
CTGCTGGGGCCGCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCC
ACCCGCCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCTTCGGTTTC
CAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGG
GCGTCCATCTTCACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTG
GCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGG
GTGACCCCCGAAATC（配列番号263）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、
少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、
少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）
の配列によってコードされる。

【0650】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

DCDIEGKDGKQYESVLMV SIDQLLD SMKEIGSNCLNNEFN
FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK
EQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTK EHS GTTNTVA
AYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSK
CFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGS
AGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSF EQVGT KVNVTVE
DERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTA
KTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVE
CMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES
DVHPSCKV TAMKCFLLLELQVISLES GDASIHD TVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQM
FINTS（配列番号207）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、
少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、
少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0651】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAAC

10

20

30

40

50

TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACCAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCT
GAAGATGAACTCCACCGGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGC
TGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAAACCAACACAGTCGCT
GCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCACCAACTTCAAAACCA
TCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACAC
CGTGCGAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA
TGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATG
AGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGT
GTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCC
GCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCC
CTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAG
CTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAG
GACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAAACAACACCTTTCTCA
GCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACT
GTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGGCAAAGAAGACAGCT
AAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAG
GCGAAAACCTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTC
CCGGACCGGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAG
TGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGG
TGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAAT
TCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCC
GACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTT
TTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGA
CGCTAGCATCCACGACACCGGTGGAGAATTTAATCATTTTA
GCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACAT
CAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATG
TTCATCAATACCTCC

（配列番号208）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0652】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDQYESVLMVSI DQ
LLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK
LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILNCTGQVKGRKPA
ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCW
NKILMGTKEHSGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPV
NQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQT
YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQ
PTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKD
LIYTLYYWKSSSSGKK TAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQ
AVIPSR TVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKK

I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C F L L E L Q V I S
L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E L
E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S (配列番号209)と少なくとも80
%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一
、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも9
4%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、また
は100%同一)の配列を含み得る。

【0653】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C T
C C A G C G C C T A C T C C G A T T G C G A C A T C G A G G G C A A G G A C G G
C A A G C A G T A C G A G A G C G T G C T G A T G G T G T C C A T C G A C C A G
C T G C T G G A C A G C A T G A A G G A G A T C G G C T C C A A C T G C C T C A
A C A A C G A G T T C A A C T T C T T C A A G C G G C A C A T C T G C G A C G C
C A A C A A G G A G G G C A T G T T C C T G T T C A G G G C C G C C A G G A A A
C T G C G G C A G T T C C T G A A G A T G A A C T C C A C C G G C G A C T T C G
A C C T G C A C C T G C T G A A G G T G T C C G A G G G C A C C A C C A T C C T
G C T G A A C T G C A C C G G A C A G G T G A A G G G C C G G A A A C C T G C T
G C T C T G G G A G A G G C C C A A C C C A C C A A G A G C C T G G A G G A G A
A C A A G T C C C T G A A G G A G C A G A A G A A G C T G A A C G A C C T G T G
C T T C C T G A A G A G G C T G C T G C A G G A G A T C A A G A C C T G C T G G
A A C A A G A T C C T G A T G G G C A C C A A G G A G C A T A G C G G C A C A A
C C A A C A C A G T C G C T G C C T A T A A C C T C A C T T G G A A G A G C A C
C A A C T T C A A A A C C A T C C T C G A A T G G G A A C C C A A A C C C G T T
A A C C A A G T T T A C A C C G T G C A G A T C A G C A C C A A G T C C G G C G
A C T G G A A G T C C A A A T G T T T C T A T A C C A C C G A C A C C G A G T G
C G A T C T C A C C G A T G A G A T C G T G A A A G A T G T G A A A C A G A C C
T A C C T C G C C C G G G T G T T T A G C T A C C C C G C C G G C A A T G T G G
A G A G C A C T G G T T C C G C T G G C G A G C C T T T A T A C G A G A A C A G
C C C C G A A T T T A C C C C T T A C C T C G A G A C C A A T T T A G G A C A G
C C C A C C A T C C A A A G C T T T G A G C A A G T T G G C A C A A A G G T G A
A T G T G A C A G T G G A G G A C G A G C G G A C T T T A G T G C G G C G G A A
C A A C A C C T T T C T C A G C C T C C G G G A T G T G T T C G G C A A A G A T
T T A A T C T A C A C A C T G T A T T A C T G G A A G T C C T C T T C C T C C G
G C A A G A A G A C A G C T A A A A C C A A C A C A A A C G A G T T T T T A A T
C G A C G T G G A T A A A G G C G A A A A C T A C T G T T T C A G C G T G C A A
G C T G T G A T C C C C T C C C G G A C C G T G A A T A G G A A A A G C A C C G
A T A G C C C C G T T G A G T G C A T G G G C C A A G A A A A G G G C G A G T T
C C G G G A G A A C T G G G T G A A C G T C A T C A G C G A T T T A A A G A A G
A T C G A A G A T T T A A T T C A G T C C A T G C A T A T C G A C G C C A C T T
T A T A C A C A G A A T C C G A C G T G C A C C C C T C T T G T A A G G T G A C
C G C C A T G A A A T G T T T T T A C T G G A G C T G C A A G T T A T C T C T
T T A G A G A G C G G A G A C G C T A G C A T C C A C G A C A C C G T G G A G A
A T T T A A T C A T T T T A G C C A A T A A C T C T T T A T C C A G C A A C G G
C A A C G T G A C A G A G T C C G G C T G C A A G G A G T G C G A A G A G C T G
G A G G A G A A G A A C A T C A A G G A G T T T C T G C A A T C C T T T G T G C
A C A T T G T C C A G A T G T T C A T C A A T A C C T C C (配列番号210)と少
なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくと
も86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99

10

20

30

40

50

%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0654】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H
Q H L S S R T H G S E D S I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y
I C N S G F K R K A G T S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R G G
G G S G G G G S G G G G S R E G P E L S P D D P A G L L D L R Q G M F A Q L V A
Q N V L L I D G P L S W Y S D P G L A G V S L T G G L S Y K E D T K E L V V A K
A G V Y Y V F F Q L E L R R V V A G E G S G S V S L A L H L Q P L R S A A G A A
A L A L T V D L P P A S S E A R N S A F G F Q G R L L H L S A G Q R L G V H L H
T E A R A R H A W Q L T Q G A T V L G L F R V T P E I P A G L P S P R S E (配列
番号268)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84
%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一
、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含み得る。

10

【0655】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCTTCTCCTGCTTTTCAGAAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCTCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCA
TTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGAGGACACGCCGACAT
CTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTAT
ATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGCA
GCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGC
TCACTGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTC
GCGAGGGTCCCGAGCTTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCT
CTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTTCGCGCAGCTGGTGGCC
CAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTACA
GTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGCTCCCTGACGGGGGGCCT
GAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAG
GCTGGAGTCTACTATGTCTTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGC
GCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTTCACTTGC
GCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCC
GCCCTGGCTTTTGACCGTGAGCCTGCCACCCGCCCTCCTCCG
AGGCTCGGAACCTCGGCCCTTCGGTTTTCAGGGCCGCTTGCT
GCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCA
ACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCCTGGCAGCTTACCCAGG
GCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAAT
CCCAGCCGGACTCCCTTTCACCGAGGTCGGAA (配列番号269)
と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な

20

30

40

50

くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0656】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSQGGQDRHMRQLIDIVDQLKN
YVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGN
NERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRQKHRLTCPSCDSYEKK
PPKEFLERFKSL LQKMIHQHLSSTRTHGSEDSITCPPPM SV
EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSSLTECVLNK
ATNVAHWTTPSLKCI RGGGSGGGGSGGGGSGREGPELSPD
DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS
LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSG
SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASSEARNSAFGF
QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFR
VTPEIPAGLPSPRSE (配列番号270)と少なくとも80%同一(例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88
%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なく
とも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)
の配列を含み得る。

【0657】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCG
GATGAGGCAGCTCATCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAAC
TACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCG
AGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTG
CTTTCAGAAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAAC
AACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGC
GGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAGCA
CAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAAG
CCCCCAAGGAGTTCTTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGC
AGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGG
CTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTG
GAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACA
GCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAA
GGCCGGCACCCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGT
GCATCCGGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGG
CGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTTTCGCCCGAC
GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTG
CGCAGCTGGTGGCCCAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCC
CCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCCTGGCAGGCGTGTC
CTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGC
TGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTTCTTCA
ACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGC
TCCGTTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTG
CTGCTGGGGCCGCCCGCCCTGGCTTTTGACCGTGGAACCTGCC
ACCCGCCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCCTTCGGTTTC
CAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGG

GCGTCCATCTTCACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCCTG
GCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGG
GTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGT
CGGAA（配列番号271）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、
少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコード
される。

【0658】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H
Q H L S S R T H G S E D S I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y
I C N S G F K R K A G T S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R G G
G G S G G G G S G G G G S D P A G L L D L R Q G M F A Q L V A Q N V L L I D G P
L S W Y S D P G L A G V S L T G G L S Y K E D T K E L V V A K A G V Y Y V F F Q
L E L R R V V A G E G S G S V S L A L H L Q P L R S A A G A A A L A L T V D L P
P A S S E A R N S A F G F Q G R L L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R H A W
Q L T Q G A T V L G L F R V T P E I（配列番号272）と少なくとも80%同一（例
えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なく
とも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、
少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%
同一）の配列を含み得る。

【0659】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCTCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCA
TTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACAT
CTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTAT
ATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACACAGCA
GCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGC
TCACTGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTG
ATCCCGCCGGCCTCTTGGA CCTGCGGCAGGGCATGTTTGC
GCAGCTGGTGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCC
CTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCT
TGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCT
GGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAA
CTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCT
CCGTTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGC
TGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGA CCTGCCA

CCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCTTTCGGTTTTCC
AGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGG
CGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGG
CAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGG
TGACCCCCGAAATC（配列番号273）と少なくとも80%同一（例えば、少
なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%
同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なく
とも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の
配列によってコードされる。

【0660】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKN
YVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGN
NERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKK
PPKEFLERFKSL LQKMIHQHLS SRTHGSEDSITCPPPMSV
EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNK
ATNVAHWTTTSLKCI RGGGSGGGGSGGGGSDPAGLLDLR
QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE
DTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQ
PLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSA
GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI（配列番
号274）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%
同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なく
とも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、
少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0661】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCG
GATGAGGCAGCTCATCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAAC
TACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCG
AGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG
CTTTCAGAAAGGCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAAC
AACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGC
GGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCA
CAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAG
CCCCCAAGGAGTTCTTGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGC
AGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGG
CTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTG
GAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACA
GCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAA
GGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCCTCTTTAAAGT
GCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGG
CGGCGGAGGATCTGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGG
CAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAATGTTCTGC
TGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCCT
GGCAGGCGTGTCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAG
GACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACT
ATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGG

CGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAG
CCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGA
CCGTGGACCTGCCACCCGCTCTCCGAGGCTCGGAATC
GGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCC
GGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACTGAGGCCAGGG
CACGCCATGCCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTT
GGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC（配列番号275）と少な
くとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも
86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少
なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%
同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

【0662】

例示的な多鎖キメラポリペプチドータイプK

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、IL-7受容体またはTGF- β に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

20

【0663】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0664】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

30

【0665】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

40

【0666】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはIL-7受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはTGF- β に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはTGF- β に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-7受容体に特異的に結合する。

【0667】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性IL-7タンパク質（例えば、可溶性ヒトIL-7タンパク質）を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7タンパク質

50

は、

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQL L D S M K E I G S N C L N N E F N
F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L R Q F L K M N S T G D F D L H L L
K V S E G T T I L L N C T G Q V K G R K P A A L G E A Q P T K S L E E N K S L K
E Q K K L N D L C F L K R L L Q E I K T C W N K I L M G T K E H (配列番号 79)
と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な
くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも
99%同一、または100%同一)の配列を含む。

【0668】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-7は、
G A T T G C G A C A T C G A G G G C A A G G A C G G C A A G C A G T A C G A G A
G C G T G C T G A T G G T G T C C A T C G A C C A G C T G C T G G A C A G C A T
G A A G G A G A T C G G C T C C A A C T G C C T C A A C A A C G A G T T C A A C
T T C T T C A A G C G G C A C A T C T G C G A C G C C A A C A A G G A G G G C A
T G T T C C T G T T C A G G G C C G C C A G G A A A C T G C G G C A G T T C C T
G A A G A T G A A C T C C A C C G G C G A C T T C G A C C T G C A C C T G C T G
A A G G T G T C C G A G G G C A C C A C C A T C C T G C T G A A C T G C A C C G
G A C A G G T G A A G G G C C G G A A A C C T G C T G C T C T G G G A G A G G C
C C A A C C C A C C A A G A G C C T G G A G G A G A A C A A G T C C C T G A A G
G A G C A G A A G A A G C T G A A C G A C C T G T G C T T C C T G A A G A G G C
T G C T G C A G G A G A T C A A G A C C T G C T G G A A C A A G A T C C T G A T
G G G C A C C A A G G A G C A T (配列番号 227) と少なくとも80%同一(例えば
、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
)の配列によってコードされる。

【0669】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメイン
は、TGF- β に特異的に結合する標的結合ドメインを含む。これらの多鎖キメラポリペ
プチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、可溶性TGF- β 受容体
(例えば、可溶性TGF- β RII受容体、例えば、可溶性ヒトTGF- β RII受容体)で
ある。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF- β
RIIは、第1の可溶性ヒトTGF- β RII配列および第2の可溶性ヒトTGF- β RII配列を
含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性
ヒトTGF- β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF- β RII配列と第2の可溶性ヒトTGF- β
RII配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチ
ドのいくつかの例では、リンカーは、配列GGGGSGGGSGGGGS(配列番号 1
02)を含む。

【0670】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF- β
RII受容体配列は、
I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D (配列番号 183) と少なくとも80%同一(例えば
、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
)の配列を含む。

10

20

30

40

50

【0671】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D（配列番号184）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列を含む。

10

【0672】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G A
T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C T
C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A T
C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C T
G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A A
A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A C
C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T G
C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G G
A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G T
A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C A
A C C C T G A T（配列番号185）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82
%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少な
くとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一
、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によって
コードされる。

20

【0673】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T G A A T A A T G A C A T G A
T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G A A A T T T C C C C A G C T
G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T C C A C C T G C G A C A A C
C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C C A T C A C C T C C A T C T
G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G G C T G T C T G G C G G A A
G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A C C G T C T G C C A C G A T
C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T C C T G G A A G A C G C C G
C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G A A A A G A A G C C T G G
C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A G C A G C G A C G A A T G C
A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A A T A C A A T A C C A G C A
A C C C C G A C（配列番号186）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82
%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少な
くとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一
、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によって
コードされる。

30

40

【0674】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF β -受容体は、

50

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D G G G G S G G G G S G G G G S I P P H V Q K S V
N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S
I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I
L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E E
Y N T S N P D (配列番号188)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%
同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくと
も90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、
少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む。

10

【0675】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF- β 受容体
は、

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G A
T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C T
C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A T
C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C T
G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A A
A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A C
C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T G
C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G G
A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G T
A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C A
A C C C T G A T G G A G G T G G C G G A T C C G G A G G T G G A G G T T C T G G
T G G A G G T G G G A G T A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T G
A A T A A T G A C A T G A T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G A
A A T T T C C C C A G C T G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T C
C A C C T G C G A C A A C C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C C
A T C A C C T C C A T C T G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G G
C T G T C T G G C G G A A G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A C
C G T C T G C C A C G A T C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T C
C T G G A A G A C G C C G C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G A
A A A A G A A G C C T G G C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A G
C A G C G A C G A A T G C A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A A
T A C A A T A C C A G C A A C C C C G A C (配列番号187)と少なくとも80%同
一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または1
00%同一)の配列によってコードされる。

20

30

40

【0676】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

D C D I E G K D G K Q Y E S V L M V S I D Q L L D S M K E I G S N C L N N E F N
F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L R Q F L K M N S T G D F D L H L L
K V S E G T T I L L N C T G Q V K G R K P A A L G E A Q P T K S L E E N K S L K
E Q K K L N D L C F L K R L L Q E I K T C W N K I L M G T K E H S G T T N T V A
A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S T K S G D W K S K
C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S
A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E
D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K S S S S G K K T A

50

KTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNVRKSTDSPVE
CMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES
DVHPSCCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHD TVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQM
FINTS（配列番号207）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、
少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、
少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0677】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCT
GAAGATGAACTCCACC GGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGC
TGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAAACCAACACAGTCGCT
GCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCACCAACTTCAAAACCA
TCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACAC
CGTGCGAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA
TGTTTCTATACCAACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATG
AGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGT
GTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCC
GCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCC
CTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAG
CTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAG
GACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCA
GCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACT
GTATTACTGGAAGTCTCTCTCTCCGGCAAAGAAGACAGCT
AAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAG
GCGAAAACTACTGTTTTCAGCGTGCAGCTGTGATCCCCCTC
CCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAG
TGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGG
TGAACGTCAATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAAT
TCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCC
GACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTT
TTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGA
CGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAAATTTAATCATTTTA
GCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAGAACAT
CAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCAATTTGTCCAGATG
TTCATCAATACCTCC（配列番号208）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、
少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な

10

20

30

40

50

) の配列によってコードされる。

【0678】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSDDCDIEGKDGKQYESVLMVSIIDQ
LLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK
LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTLNLNCTGQVKGRKPA
ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLQLQEIKTCW
NKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV
NQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQT
YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQ
PTIQSFQVGTGVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKD
LIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQ
AVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKK
IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSPCKVTAMKCFLLLELQVIS
LES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL
EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (配列番号209) と少なくとも80
%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一
、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも9
4%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、また
は100%同一) の配列を含み得る。

【0679】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGAGGGGCAAGGACGG
CAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAG
CTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCA
ACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGC
CAACAAGGAGGGGCA TGTTCTGTTTCAAGGGCCGCCAGGAAA
CTGCGGCAGTTCTCTGAAGATGAACCTCCACCGGCGACTTCTG
ACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGGCACCACCATCCT
GCTGAACCTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCT
GCTCTGGGAGAGGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGA
ACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTG
CTTCTCTGAAGAGGCTGCTGCAAGGAGATCAAGACCTGCTGG
AACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAA
CCAACACAGTCTGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCAC
CAACTTCAAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCACCAAGTCCGGCG
ACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTG
CGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACC
TACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCGGCAATGTGG
AGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAG
CCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAG
CCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGA
ATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGGCGGAA
CAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGGCAAAGAT
TTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTCTCTCCG
GCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAAAT
CGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTTTTCAGCGTGCAA
GCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCG

ATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTT
CCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAAG
ATCGAAGATTTAATTCAAGTCCATGCATATCGACGCCACTT
TATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGAC
CGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCT
TTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGGTGGAGA
ATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGG
CAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTG
GAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGC
ACATTTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号210）と少
なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99
%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0680】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFI
LEDAASPKCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGF
KRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR（配列番号193
）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少
なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%
同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく
とも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0681】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAAGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTTG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAGAGA

AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCTCCCA
TGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAG
CCTCTACAGCCGGGAGAGGTTATATCTGTAAACAGCGGCTTTC
AAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGC
TGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTC
TTTAAAGTGCAATCCGG (配列番号257) と少なくとも80%同一 (例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
) の配列によってコードされる。

【0682】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSISPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNT
SNPDGGGGSGGGSGGGSGSISPPHVQKSVNNDMIVTD
NNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICE
KPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED
AAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEY
NTSNPDITCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGF
KRKAGTSSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR (配
列番号195) と少なくとも80%同一 (例えば、少
なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少
なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少
なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少
なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少
なくとも98%同一、少なくとも99%同一、ま
たは100%同一) の配列を含み得る。

【0683】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTGGAGA
CCGTGTGTACAGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGT
AAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACAGAAAGTCTCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAAT
ATCACCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTG

CATCATGAAAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTAC
ATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGG
GTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTTATATCT
GTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCAC
TGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGCATCCGG (配列番号259)と
少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも9
9%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

10

【0684】

例示的な多鎖キメラポリペプチドータイプL

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、TGF- β 、IL-21受容体、またはCD137L受容体に特異的に結合する。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、IL-21 (例えば、可溶性IL-21、例えば、可溶性ヒトIL-21) 受容体またはCD137L (例えば、可溶性CD137L、例えば、可溶性ヒトCD137L) 受容体に特異的に結合する。

20

【0685】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0686】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

30

【0687】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

40

【0688】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0689】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一対の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメイ

50

ンと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0690】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0691】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0692】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上は、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および追加の標的結合ドメインは各々、アゴニスト抗原結合ドメインである。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F vまたは単一ドメイン抗体を含む。

【0693】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはTGF- β に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはIL-21受容体またはCD137L受容体に特異的に結合する。

【0694】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性TGF- β 受容体（例えば、可溶性TGF β RII受容体、例えば、可溶性ヒトTGF β RII受容体）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF β RII配列および第2の可溶性ヒトTGF β RII配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF β RII配列と第2の可溶性ヒトTGF β RII配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカーは、配列GGGSGGGGSGGGGS（配列番号102）を含む。

【0695】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF β RII受容体配列は、
I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D（配列番号183）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0696】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RII受容体配列は、
I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N

10

20

30

40

50

QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCCHD
PKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPD（配列番号184）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列を含む。

【0697】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF
RβRII受容体配列は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAAGAAGAAGCCCCG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCCTGAT（配列番号185）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82
%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少な
くとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一
、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によって
コードされる。

【0698】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF
RβRII受容体配列は、

ATTCCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTGAAATAATGACATGA
TCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA AATTTCCCCAGCT
GTGCA AATTTCTGCGATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAAC
CAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCT
GTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAA
GAATGACGAGAAATATCACCCCTGGA AACCCTCTGCCACGAT
CCCAAGCTGCCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCG
CCAGCCCTAAGTGCATCATGA AAGAGAAAAGAGAGCCTGG
CGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGC
AACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCA
ACCCCGAC（配列番号186）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82
%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少な
くとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一
、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によって
コードされる。

【0699】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF-β受容体
は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCCHD
PKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV

10

20

30

40

50

NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFI
LEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPD（配列番号188）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%
同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくと
も90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、
少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0700】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF-β受容体
は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCTGCAATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGAACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATAACAGCAACCCCGAC（配列番号187）と少なくとも80%同
一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または1
00%同一）の配列によってコードされる。

【0701】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメイン
または追加の標的結合ドメインは、IL-21受容体に特異的に結合する。これらの多鎖
キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインまたは追加の標
的結合ドメインは、可溶性IL-21（例えば、可溶性ヒトIL-21）を含む。

【0702】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、
QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLS SRTHGSEDS（配列番号83）と少なくとも80%同一（例えば、少なく
とも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一
、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも9
6%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列

10

20

30

40

50

を含む。

【0703】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトIL-21は、
CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTCCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC (配列番号182) と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

10

【0704】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインまたは追加の標的結合ドメインは、CD137L受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインおよび／または追加の標的結合ドメインは、可溶性CD137L（例えば、可溶性ヒトCD137L）を含む。

20

【0705】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性CD137Lは、
REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY
SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR
RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASS
EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ
GATVVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE (配列番号260) と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

30

【0706】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性CD137Lは、
CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCC
TCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGC
CCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTAC
AGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCTTGACGGGGGGCC
TGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAA
GGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGG
CGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTG
CGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGC
CGCCCTGGCTTTGACCGTGGAACCTGCCACCCGCCCTCCTCC
GAGGCTCGGAACCTCGGCCTTCGGTTTTCAGGGCCGCTTGC
TGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCA
CACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCCTGGCAGCTTACCCAG
GGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAA
TCCCAGCCGGACTCCCTTCAACCGAGGTCGGAA (配列番号261)

40

50

）と少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８２％同一、少なくとも８４％同一、少なくとも８６％同一、少なくとも８８％同一、少なくとも９０％同一、少なくとも９２％同一、少なくとも９４％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９８％同一、少なくとも９９％同一、または１００％同一）の配列によってコードされる。

【０７０７】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトＣＤ１３７Ｌは、

DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI（配列番号２６２）と少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８２％同一、少なくとも８４％同一、少なくとも８６％同一、少なくとも８８％同一、少なくとも９０％同一、少なくとも９２％同一、少なくとも９４％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９８％同一、少なくとも９９％同一、または１００％同一）の配列を含む。

【０７０８】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトＣＤ１３７Ｌは、

GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCTTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTTGACCGTGACCTGCCACCCGCCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCCTTCGGTTTTCCAGGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAATC（配列番号２６３）と少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８２％同一、少なくとも８４％同一、少なくとも８６％同一、少なくとも８８％同一、少なくとも９０％同一、少なくとも９２％同一、少なくとも９４％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９８％同一、少なくとも９９％同一、または１００％同一）の配列によってコードされる。

【０７０９】

いくつかの実施形態では、第１のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPDSTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFQSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENNWVNVISDLKKIED

LIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEK
NIKEFLQS FVHIVQMFINTS（配列番号236）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列を含み得る。

【0710】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCTCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAAACATCACCCCTGGAGACC GTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAAGAAGAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCCAGAAAGTCTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG CATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAG
TCGCTGCCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCACCAACTTCAA
AACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAAACCAAGTT
TACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGT
CCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCAC
CGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCC
CGGGTGTTT TAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTG
GTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTTAGGACAGCCCAACCATC
CAAAGCTTTGAGCAAGTTGGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTT
TCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTAC
ACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTCTCCTCCGGCAAAGAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGA
TAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATC
CCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCG
TTGAGTGCATGGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAA
CTGGGTGAACGT CATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGAT
TTAATT CAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAG
AATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAA

10

20

30

40

50

ATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGC
GGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCA
TTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGAC
AGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAG
AACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCC
AGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号237）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列によってコードされる。

【0711】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNT
SNPDGGGGSGGGSGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDN
NGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEK
PKQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED
AA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEY
NTSNPD SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV
NQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDETCDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYL
ETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRNNTFL
SLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFL
IDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQ
EKEGFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD
VHPSCKV TAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVEN
LIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL E EKNIKEFLQ
SFVHIVQMFINTS（配列番号238）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少な
くとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0712】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTGGAGA
CCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCATG
CATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTA

TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATAACAGCAACCCCGACAGCGG
CACAAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAG
AGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAAC
CCGTTAAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTC
CGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTTCTATACCACCGACACC
GAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAAC
AGACCTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAA
TGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAG
AACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAG
GACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGGCACAAA
GGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGC GG
CGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTC
CTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTT
TTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCG
TGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAG
CACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGGCCAAGAAAAGGGC
GAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTATCAGCGATTTAA
AGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGC
CACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAG
GTGACCGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTA
TCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGT
GGAGAATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGC GAAG
AGCTGGAGGAGAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号2
39）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、
少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも9
2%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少な
くとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0713】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLSSSRTHGSEDSITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERY
ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIRGG
GSGSGSGSGSGSGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA
QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAK
AGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA
ALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLHL SAGQRLGVHLH
TEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE（配列
番号268）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84
%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な

10

20

30

40

50

とも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含み得る。

【0714】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCGAGCTCA
TCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCGAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCA
TTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACAT
CTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTAT
ATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGCA
GCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGC
TCACTGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTC
GCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCT
CTTGGAACCTGCGGCGAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCC
CAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTACA
GTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTTCCCTGACGGGGGGCCT
GAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAG
GCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGC
GCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTTCACTTGC
GCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGGCCGCC
GCCCTGGCTTTTGACCGTGGAACCTGCCACCCGCCCTCCTCCG
AGGCTCGGAACCTCGGCCCTTCGGTTTTCAGGGCCGCTTGCT
GCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTAC
ACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGG
GCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCGAAAT
CCCAGCCGGACTCCCTTCAACCGAGGTCGGAA (配列番号269)

と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0715】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKN
YVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGN
NERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKK
PPKEFLERFKSL LQKMIHQHLS SRTHGSEDSITCPPPMSV
EHADIWVKSSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNK
ATNVAHWTTPSLKCI RGGGSGGGGSGGGGSGREGPELSPD
DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS
LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELR RVVAGEGSG
SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGF
QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFR

V T P E I P A G L P S P R S E（配列番号 270）と少なくとも 80% 同一（例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一）の配列を含み得る。

【0716】

いくつかの実施形態では、第 2 のキメラポリペプチドは、

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C T
C C A G C G C C T A C T C C C A G G G C C A G G A C A G G C A C A T G A T C C G
G A T G A G G C A G C T C A T C G A C A T C G T C G A C C A G C T G A A G A A C
T A C G T G A A C G A C C T G G T G C C C G A G T T T C T G C C T G C C C C C G
A G G A C G T G G A G A C C A A C T G C G A G T G G T C C G C C T T C T C C T G
C T T T C A G A A G G C C C A G C T G A A G T C C G C C A A C A C C G G C A A C
A A C G A G C G G A T C A T C A A C G T G A G C A T C A A G A A G C T G A A G C
G G A A G C C T C C C T C C A C A A A C G C C G G C A G G A G G C A G A A G C A
C A G G C T G A C C T G C C C C A G C T G T G A C T C C T A C G A G A A G A A G
C C C C C C A A G G A G T T C C T G G A G A G G T T C A A G T C C C T G C T G C
A G A A G A T G A T C C A T C A G C A C C T G T C C T C C A G G A C C C A C G G
C T C C G A G G A C T C C A T T A C A T G C C C C C C T C C C A T G A G C G T G
G A G C A C G C C G A C A T C T G G G T G A A G A G C T A T A G C C T C T A C A
G C C G G G A G A G G T A T A T C T G T A A C A G C G G C T T C A A G A G G A A
G G C C G G C A C C A G C A G C C T C A C C G A G T G C G T G C T G A A T A A G
G C T A C C A A C G T G G C T C A C T G G A C A A C A C C C T C T T T A A A G T
G C A T C C G G G G C G G T G G A G G A T C C G G A G G A G G T G G C T C C G G
C G G C G G A G G A T C T C G C G A G G G T C C C G A G C T T T C G C C C G A C
G A T C C C G C C G G C C T C T T G G A C C T G C G G C A G G G C A T G T T T G
C G C A G C T G G T G G C C C A A A A T G T T C T G C T G A T C G A T G G G C C
C C T G A G C T G G T A C A G T G A C C C A G G C C T G G C A G G C G T G T C C
C T G A C G G G G G G C C T G A G C T A C A A A G A G G A C A C G A A G G A G C
T G G T G G T G G C C A A G G C T G G A G T C T A C T A T G T C T T C T T T C A
A C T A G A G C T G C G G C G C G T G G T G G C C G G C G A G G G C T C A G G C
T C C G T T T C A C T T G C G C T G C A C C T G C A G C C A C T G C G C T C T G
C T G C T G G G G C C G C C G C C C T G G C T T T G A C C G T G G A C C T G C C
A C C C G C C T C C T C C G A G G C T C G G A A C T C G G C C T T C G G T T T C
C A G G G C C G C T T G C T G C A C C T G A G T G C C G G C C A G C G C C T G G
G C G T C C A T C T T C A C A C T G A G G C C A G G G C A C G C C A T G C C T G
G C A G C T T A C C C A G G G C G C C A C A G T C T T G G G A C T C T T C C G G
G T G A C C C C C G A A A T C C C A G C C G G A C T C C C T T C A C C G A G G T
C G G A A（配列番号 271）と少なくとも 80% 同一（例えば、少なくとも 82% 同一、

少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一）の配列によってコードされる。

【0717】

いくつかの実施形態では、第 2 のキメラポリペプチドは、

Q G Q D R H M I R M R Q L I D I V D Q L K N Y V N D L V P E F L P A P E D V E T
N C E W S A F S C F Q K A Q L K S A N T G N N E R I I N V S I K K L K R K P P S
T N A G R R Q K H R L T C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H
Q H L S S R T H G S E D S I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y
I C N S G F K R K A G T S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R G G

GGSGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP
LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ
LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP
PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW
QLTQGATVLLGLFRVTPEI（配列番号272）と少なくとも80%同一（例
えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なく
とも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、
少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%
同一）の配列を含み得る。

【0718】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTG CCTGCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCTCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCA
TTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACAT
CTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTAT
ATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGCA
GCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGC
TCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTG
ATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCGAGGGCATGTTTGC
GCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCC
CTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCCTGGCAGGCGTGTC
TGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCT
GGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTTCTTTCAA
CTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCT
CCGTTTTCACTTGCGCTGCACCTGCGAGCCACTGCGCTCTGC
TGCTGGGGGCCCGCCGCCCTGGCTTTTGACCGTGAGCCTGCCA
CCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCTTCGGTTTTCC
AGGGCCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGG
CGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCCTGG
CAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGG
TGACCCCCGAAATC（配列番号273）と少なくとも80%同一（例えば、少
なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%
同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なく
とも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の
配列によってコードされる。

【0719】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSQGGQDRHMRQLIDIVDQLKN
YVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGN
NERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRQRKHRLTCPSCDSYEKK
PPKEFLERFKSLQKMIHQHLSRTHGSEDSITCPPPM SV

10

20

30

40

50

EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSSLTECVLNK
ATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSDPAGLLDLR
QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE
DTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQ
PLRSAAGAAALALTVDLPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA
GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEI（配列番
号274）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%
同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくと
も92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、
少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

10

【0720】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCG
GATGAGGCAGCTCATCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAAC
TACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCG
AGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG
CTTTCAGAAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAAC
AACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGC
GGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAGCA
CAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAG
CCCCCCAAGGAGTTCTTGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGC
AGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGG
CTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTG
GAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACA
GCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAA
GGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGT
GCATCCGGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGG
CGGCGGAGGATCTGATCCCGCGCGGCTCTTGGAACCTGCGG
CAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGC
TGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCT
GGCAGGCGTGTCCTGACGGGGGGGCTGAGCTACAAAGAG
GACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAAGGCTGGAGTCTACT
ATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGG
CGAGGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAG
CCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGA
CCGTGGACCTGCCACCCGCCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTC
GGCCTTCGGTTTCCAGGGCGCGCTTGCTGCACCTGAGTGCC
GGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGGCCAGGG
CACGCCATGCCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTT
GGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC（配列番号275）と少な
くとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくと
も86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少
なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%
同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

20

30

40

【0721】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプM

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、TGF-βま

50

たはIL-21受容体に特異的に結合する。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、IL-21（例えば、可溶性IL-21、例えば、可溶性ヒトIL-21）受容体またはTGF- β 受容体（例えば、可溶性TGF- β 受容体、例えば、可溶性TGF- β RII受容体）に特異的に結合する。

【0722】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

10

【0723】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0724】

20

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0725】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0726】

30

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一对の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0727】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

40

【0728】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一对の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一对の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0729】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメイン

50

は T G F - β に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインは T G F - β または I L - 2 1 受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインは、可溶性 T G F - β 受容体（例えば、可溶性 T G F β R I I 受容体、例えば、可溶性ヒト T G F β R I I 受容体）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト T G F R β R I I は、第 1 の可溶性ヒト T G F R β R I I 配列および第 2 の可溶性ヒト T G F R β R I I 配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒト T G F R β R I I は、第 1 の可溶性ヒト T G F R β R I I 配列と第 2 の可溶性ヒト T G F R β R I I 配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカーは、配列 G G G S G G G S G G G S （配列番号 1 0 2 ）を含む。

10

【 0 7 3 0 】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の可溶性ヒト T G F R β R I I 受容体配列は、
I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D （配列番号 1 8 3 ）と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 2 % 同一、少なくとも 8 4 % 同一、少なくとも 8 6 % 同一、少なくとも 8 8 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 2 % 同一、少なくとも 9 4 % 同一、少なくとも 9 6 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、または 1 0 0 % 同一）の配列を含む。

20

【 0 7 3 1 】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 の可溶性ヒト T G F R β R I I 受容体配列は、
I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D （配列番号 1 8 4 ）と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 2 % 同一、少なくとも 8 4 % 同一、少なくとも 8 6 % 同一、少なくとも 8 8 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 2 % 同一、少なくとも 9 4 % 同一、少なくとも 9 6 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、または 1 0 0 % 同一）の配列を含む。

30

【 0 7 3 2 】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の可溶性ヒト T G F R β R I I 受容体配列は、
A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G A
T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C T
C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A T
C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C T
G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A A
A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A C
C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T G
C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G G
A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G T
A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C A
A C C C T G A T （配列番号 1 8 5 ）と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 2 % 同一、少なくとも 8 4 % 同一、少なくとも 8 6 % 同一、少なくとも 8 8 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 2 % 同一、少なくとも 9 4 % 同一、少なくとも 9 6 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、または 1 0 0 % 同一）の配列によってコードされる。

40

50

【0733】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF β RRII受容体配列は、

ATTCCCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTGAAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTTCTGCGATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAAC CAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAA GAATGACGAGAAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGAT C CCAAGCTGCCCTACCAACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCG 10 C CAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGG CGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGC AACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCA ACCCCGAC (配列番号186)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82 %同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なく とも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、 少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によって コードされる。

【0734】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF β 受容体 は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN QKSCMSNCSITSI CEKPKQEV CVAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS ITSI CEKPKQEV CVAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFI L EDAASP KCIMKEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIIFSEE YNTSNPD (配列番号188)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82% 同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なく とも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、 少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含む。 30

【0735】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性TGF β 受容体 は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAAGTTTTCCCCAGCT CTGCAAGTTTCTGCGATGTCAAGTTTCAGCACCTGCGATAAT CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCGAGCATCACCTCCATCT GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA 40 AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGAC C CCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCTG CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG AGAGACCTTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT AACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGG TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA AATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTTTC CACCTGCGACAACCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCC 50

ATCACCTCCATCTGTGAGAAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGAC（配列番号187）と少なくとも80%同
一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少
なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%
同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または1
00%同一）の配列によってコードされる。

10

【0736】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメイン
は、IL-21受容体に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつか
の実施形態では、第2の標的結合ドメインは、可溶性IL-21（例えば、ヒト可溶性IL
-21）を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性
IL-21は、

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLSSRTHGSEDS（配列番号83）と少なくとも80%同一（例えば、少なく
とも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一
、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも9
6%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列
を含む。

20

【0737】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性IL-21は、
CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC（
配列番号182）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも
84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少
なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%
同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

30

40

【0738】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSIKEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HDPKLPYHDFI
LED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEE

50

YNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQV
YTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLA
RVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTI
QSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY
TLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVI
PSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIED
LIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLLLELQVISLES
GDASIHD TVENLIILANN SLSSNGNVTESGCKECEELEEK
NIKEFLQS FVHIVQMFIN TS（配列番号236）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列を含み得る。

【0739】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGT CAGGTT CAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCTG CATGTCCA ACTG CAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCA TTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGAACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAATCTCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAG
TCGCTGCCCTATAACCTCACTTGGAAAGAGCACCAACTTCAA
AACCATCCTCGAATGGGAACCCCAAACCCGTTAACCAGTT
TACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGT
CCAAATGTTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCAC
CGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCC
CGGGTGTTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTG
GTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATC
CAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTT
TCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCTGGCAAGATTTAATCTAC
ACACTGTATTACTGGAAGTCTCTCTCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGA

10

20

30

40

50

TAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATC
CCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAAGCACCGATAGCCCCG
TTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAA
CTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGAT
TTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAG
AATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAA
ATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGC
GGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCA
TTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGGCAACGTGAC
AGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAG
AACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCC
AGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号237）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列によってコードされる。

【0740】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV CV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKE
KKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSG
GGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV CVAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFF
MCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD SGTTNTVAAYNLTWK
STNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYE
NSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVR
RNNTFLSLRDVFGKDLIYTL YWKSSSSGKKTAKTNTNEF
LIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECMGQEK G
EFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCK
VTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHD TVENLIILANNSLSS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS（配
列番号238）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0741】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCA ACTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGA
CCGTGTGTCAACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCA T
TCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA

GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTTCTGC
GATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGG
CACAACCAACACAGTCGCTGCCCTATAACCTCACTTGGAAG
AGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAAC
CCGTTAACCAGTTTACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTC
CGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTTCTATACCACCGACACC
GAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAAC
AGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAA
TGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAG
AACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAG
GACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAA
GGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGC GG
CGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTC
CTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTT
TTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTAGCG
TGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAG
CACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGC
GAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTATCAGCGATTTAA
AGAAGATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGC
CACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAG
GTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTA
TCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGT
GGAGAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAG
AGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号2
39）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一
、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも9
2%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少な
くとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0742】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCSSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPDGGGGSGGGGS GGGS IPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFI

10

20

30

40

50

LED A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E E
Y N T S N P D I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F
K R K A G T S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R Q G Q D R H M I
R M R Q L I D I V D Q L K N Y V N D L V P E F L P A P E D V E T N C E W S A F S
C F Q K A Q L K S A N T G N N E R I I N V S I K K L K R K P P S T N A G R R Q K
H R L T C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H Q H L S S R T H
G S E D S (配列番号 300) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、
少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、
少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なく
とも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含み得る。

10

【0743】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G A
T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C T
C T G C A A G T T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A T
C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C T
G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A A
A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A C
C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T G
C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G G
A G A G A C C T T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G T
A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C A
A C C C T G A T G G A G G T G G C G G A T C C G G A G G T G G A G G T T C T G G
T G G A G G T G G G A G T A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T G
A A T A A T G A C A T G A T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G A
A A T T T C C C C A G C T G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T C
C A C C T G C G A C A A C C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C C
A T C A C C T C C A T C T G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G G
C T G T C T G G C G G A A G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A C
C G T C T G C C A C G A T C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T C
C T G G A A G A C G C C G C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G A
A A A A G A A G C C T G G C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A G
C A G C G A C G A A T G C A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A A
T A C A A T A C C A G C A A C C C C G A C A T T A C A T G C C C C C C T C C C A
T G A G C G T G G A G C A C G C C G A C A T C T G G G T G A A G A G C T A T A G
C C T C T A C A G C C G G G A G A G G T A T A T C T G T A A C A G C G G C T T C
A A G A G G A A G G C C G G C A C C A G C A G C C T C A C C G A G T G C G T G C
T G A A T A A G G C T A C C A A C G T G G C T C A C T G G A C A A C A C C C T C
T T T A A A G T G C A T C C G G C A G G G C C A G G A C A G G C A C A T G A T C
C G G A T G A G G C A G C T C A T C G A C A T C G T C G A C C A G C T G A A G A
A C T A C G T G A A C G A C C T G G T G C C C G A G T T T C T G C C T G C C C C
C G A G G A C G T G G A G A C C A A C T G C G A G T G G T C C G C C T T C T C C
T G C T T T C A G A A G G C C C A G C T G A A G T C C G C C A A C A C C G G C A
A C A A C G A G C G G A T C A T C A A C G T G A G C A T C A A G A A G C T G A A
G C G G A A G C C T C C C T C C A C A A A C G C C G G C A G G A G G C A G A A G
C A C A G G C T G A C C T G C C C C A G C T G T G A C T C C T A C G A G A A G A
A G C C C C C C A A G G A G T T C C T G G A G A G G T T C A A G T C C C T G C T
G C A G A A G A T G A T C C A T C A G C A C C T G T C C T C C A G G A C C C A C
G G C T C C G A G G A C T C C (配列番号 301) と少なくとも 80% 同一 (例えば、
少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88

20

30

40

50

%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列によってコードされる。

【0744】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSISIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNT
SNPDGGGGSGGGSGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDN
NGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEK
PQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNT
SNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGF
KRKAGTSSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI
RQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVP
EFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNN
ERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRQKHRLTCPSCDSY
EKKPPKEFLERFKSL LQKMIHQHLSSRTHGSEDS
(配列番号302)と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含み得る。

【0745】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCGATGTCCAACCTGCGAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTCGCTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAAACATCACCTGAGAA
CCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCCGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAAGCAACCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGAAATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCCTGC
GATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAAGTCTCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCTTGGAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAGAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTC
ATGTGCTCCTGCGAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATAACCAAGCAACCCCGACATTAC
ATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGG
GTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCT
GTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAAGCAGCCT

C A C C G A G T G C G T G C T G A A T A A G G C T A C C A A C G T G G C T C A C
T G G A C A A C A C C C T C T T T A A A G T G C A T C C G G C A G G G C C A G G
A C A G G C A C A T G A T C C G G A T G A G G C A G C T C A T C G A C A T C G T
C G A C C A G C T G A A G A A C T A C G T G A A C G A C C T G G T G C C C G A G
T T T C T G C C T G C C C C G A G G A C G T G G A G A C C A A C T G C G A G T
G G T C C G C C T T C T C C T G C T T T C A G A A G G C C C A G C T G A A G T C
C G C C A A C A C C G G C A A C A A C G A G C G G A T C A T C A A C G T G A G C
A T C A A G A A G C T G A A G C G G A A G C C T C C C T C C A C A A A C G C C G
G C A G G A G G C A G A A G C A C A G G C T G A C C T G C C C C A G C T G T G A
C T C C T A C G A G A A G A A G C C C C C A A G G A G T T C C T G G A G A G G
T T C A A G T C C C T G C T G C A G A A G A T G A T C C A T C A G C A C C T G T
C C T C C A G G A C C C A C G G C T C C G A G G A C T C C (配列番号 303) と少
なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なく
とも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、
少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99
% 同一、または 100% 同一) の配列によってコードされる。

【0746】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプ N

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインは各々独立して、TGF- β または CD16 に特異的に結合する。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、CD16 (例えば、抗 CD16 scFv) または TGF- β (例えば、可溶性 TGF- β 受容体、例えば、可溶性 TGF β RII 受容体) に特異的に結合する。

【0747】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第 1 のキメラポリペプチドは、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0748】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインは、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 のキメラポリペプチドは、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0749】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインは、第 2 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 のキメラポリペプチドは、第 2 のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0750】

いくつかの実施形態では、第 2 のキメラポリペプチドは、第 2 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0751】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一対の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0752】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

10

【0753】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

【0754】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはTGF- β に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはTGF- β またはCD16に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインは、可溶性TGF- β 受容体（例えば、可溶性TGF- β RII受容体、例えば、可溶性ヒトTGF- β RII受容体）である。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF- β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF- β RII配列および第2の可溶性ヒトTGF- β RII配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF- β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF- β RII配列と第2の可溶性ヒトTGF- β RII配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカーは、配列GGGGSGGGSGGGGS（配列番号102）を含む。

20

30

【0755】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF- β RII受容体配列は、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEELYNTSNPD（配列番号183）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

40

【0756】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の可溶性ヒトTGF- β RII受容体配列は、
IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEELYNTSNPD（配列番号184）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な

50

くとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含む。

【0757】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の可溶性ヒト TGF β RII 受容体配列は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTGAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCCTGCGATGTCCAACCTGCGAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAAGAAGAAGCCCCGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCCTGAT (配列番号 185) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列によってコードされる。

【0758】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 の可溶性ヒト TGF β RII 受容体配列は、

ATTCTCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTGAAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCACCTGCGACAAC
CAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAA
GAATGACGAGAAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGAT
CCCAAGCTGCCCCCTACCAACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCG
CCAGCCCTAAGTGCATCATGAAGAAGAGAAAAAGAAAGCCTGG
CGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGC
AACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCA
ACCCCGAC (配列番号 186) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列によってコードされる。

【0759】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 TGF β 受容体は、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKPKQEVAVWRKNDENITLETVCCHD
PKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDEC
NDNIIFSEELYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSIKPKQEVAVWRKNDENITLETVCCHD
PKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEELYNTSNPD (配列番号 188) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも

も 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含む。

【0760】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 TGF- β 受容体は、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGAT
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAAGAAGAAGCCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGAACCGATAACAATGGCGCCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGAC (配列番号 187) と少なくとも 80% 同
一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少
なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94%
同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 1
00% 同一) の配列によってコードされる。

【0761】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 の標的結合ドメインは、CD16 に特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 の標的結合ドメインは、抗 CD16 scFv を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16 に特異的に結合する scFv は、

SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ
APVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSRDS SGNHVVFGGGTKLTVGH (配列番号 215) と少な
くとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも
86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少
なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99%
同一、または 100% 同一) の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0762】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16 に特異的に結合する scFv は、

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGG
GCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAG
GTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAG
GCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCT

CCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAA
CACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGAC
GAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGA CTCTCCGGCA
ACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGG
CCAT（配列番号216）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、
少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90
%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少な
くとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の軽鎖可変ドメイン配列
によってコードされる。

【0763】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合
するscFvは、

EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTTFDDYGMSSWVRQA
PGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARGRSL LFDYWGQGTLVTVSR（配列
番号217）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84
%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一
、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0764】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、CD16に特異的に結合
するscFvは、

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAAGGC
CTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTT
CACCTTCGACGACTACGGCATGTCTCTGGGTGAGGCAGGCT
CCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGA
ACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAG
GTTCAACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTAC
CTGCAGATGAACCTCCCTGAGGGGCCGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTTCGACTACTG
GGGACAGGGCACCCCTGGTGAACCGTGTCCAGG（配列番号218）
と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な
くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少な
くとも99%同一、または100%同一）の重鎖可変ドメイン配列によってコードされる。

【0765】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHD
PKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSI PHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHD PKLPYHDFI
LED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDSGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQV
YTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLA
RVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTI
QSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY
TLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVI
PSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE NWVNVISDLKKIED

10

20

30

40

50

LIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEK
NIKEFLQS FVHIVQMFINTS（配列番号236）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列を含み得る。

【0766】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACC GTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCCTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAG
TCGCTGCCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAA
AACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAAACCAAGTT
TACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGT
CCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCAC
CGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCCTACCTCGCC
CGGGTGTTTGTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTG
GTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATC
CAAAGCTTTGAGCAAGTTGGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTT
TCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTAC
ACACTGTATTACTGGAAGTCCCTCTTCTCCGGCAAAGAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGA
TAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATC
CCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCG
TTGAGTGCATGGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAA
CTGGGTGAACGTATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGAT
TTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAG
AATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAA

10

20

30

40

50

ATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGC
GGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCA
TTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGAC
AGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAG
AACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCC
AGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号237）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列によってコードされる。

【0767】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSG
GGGSGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFF
MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD SGTTNTVAAYNLTWK
STNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYE
NSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVR
RNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEF
LIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNRKSTDSPVECMGQEK G
EFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC K
VTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLS S
NGNVTESGCKECEEL E EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS（配
列番号238）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも8
4%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少な
くとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同
一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0768】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCTGCGATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTGGAGA
CCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCATGC
GATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCTCTGTA

TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATAACAGCAACCCCGACAGCGG
CACAAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAG
AGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAAC
CCGTTAAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTC
CGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTTCTATACCACCGACACC
GAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAAC
AGACCTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAA
TGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAG
AACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAG
GACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGGCACAAA
GGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGC GG
CGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTC
CTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTT
TTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCG
TGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAG
CACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGGCCAAGAAAAGGGC
GAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTATCAGCGATTTAA
AGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGC
CACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAG
GTGACCGCCATGAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTA
TCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGT
GGAGAATTTAATCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGC GAAG
AGCTGGAGGAGAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号2
39）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、
少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも9
2%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少な
くとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0769】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSE EYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HD PKLPYHDFI
ILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDITC PPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGF
KRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIRSELTQDPA
VSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYG
KNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNS
RDS SGNHVVF GGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGGSEVQLV

10

20

30

40

50

ESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTTFDDYGMSWVRQAPGKGL
EWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARGRSLFLDYWGQGTLVTVSR（配列番号308）
と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0770】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCCTGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAAGAAGAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTGACATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCCTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCCCTCCCA
TGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAG
CCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTC
AAGAGGAAGGCCGGCACCGAGCAGCCTCACCGAGGTGCGTGC
TGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTC
TTTAAAGTGCATCCGGTCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCT
GTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCCTGAGGATCACCTGCC
AGGGCGACTCCCTGAGGTCTCTACTACGCCCTCCTGGTACCA
GCAGAAGCCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGC
AAGAACAACAGGCCCTCCGGGCATCCCTGACAGGTTCCTCCG
GATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGG
CGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCC
AGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCCGGCGGCGGCA
CCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGGCGGCGGCTCCGGAGG
CGGCGGCGAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTG
GAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCCTGGAGGCTCCCTGA
GGCTGAGCTGTGCTGCCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTA
CGGCATGTCTCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTG
GAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCG
GCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCAACCATCAGCAG

10

20

30

40

50

GGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCC
CTGAGGGGCCGAGGACACCGCCGCTGTACTACTGCGCCAGGG
GCAGGTCCCTGCTGTTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCCT
GGTGACCGTGTCCAGG（配列番号309）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも8
8%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少な
くとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一
）の配列によってコードされる。

【0771】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSISPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNT
SNPDGGGGSGGGSGGGGSISPPHVQKSVNNDMIVTDN
NGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEK
PKQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED
AA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEY
NTSNPDITCPPPMMSVEHADIVKSYSLSRERYICNSG
FKRKAGTSSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI
RSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRSYY
ASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGN
TASLTITGAQAED EADYYCNSRDSSGNHVVFGGGT
KLT VGHGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGV
VRP GGS LRLSCAASGFTFDDYGM
SWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGR
FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGR
SL LFDYW GQGT LVT VSR（配列番号310）と
少なくとも80%同一（例えば、少なくとも
82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも
86%同一、少なくとも88%同一、少な
くとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%
同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%
同一、または100%同一）の配列を含
み得る。

【0772】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCGATGTCCA
ACTGCGAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTCTGGAGA
CCGTGTGTACAGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCA
TCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAAGAAGTCTCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT

ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAAGAGAAAAAGAAAGCCTGGCGAGACCTTTTTC
ATGTGCTCCTGCGAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTTAGCGAGGAATACAATAACAGCAACCCCGACATTAC
ATGCCCCCTCCTCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGG
GTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCT
GTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCAC
TGGACAACACCCCTCTTTAAAGTGCATCCGGTCCGAGCTGA
CCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGT
GAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCTCTACTAC
GCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCCAGGCTCCTGTGC
TGGTGATCTACGGCAAGAAACAACAGGCCCTCCGGGCATCCC
TGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCC
CTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACT
ACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGT
GTTCCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGC
GGCGGCTCCGGAGGCGGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCG
AGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCC
TGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTTC
ACCTTTCGACGACTACGGCATGTCTGGGTGAGGCAGGCTC
CTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGGCATCAACTGGAA
CGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCTGTGAAGGGCAGG
TTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACC
TGCAGATGAACTCCCTGAGGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA
CTACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCTGTTTCGACTACTGG
GGACAGGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGG (配列番号311)と
少なくとも80%同一 (例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも9
9%同一、または100%同一) の配列によってコードされる。

10

20

30

【0773】

例示的な多鎖キメラポリペプチドタイプO

本明細書に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインは各々独立して、TGF- β またはCD137L受容体に特異的に結合する。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、追加の標的結合ドメインをさらに含む。本明細書に記載のこれらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインは、TGF- β 受容体 (例えば、可溶性TGF- β 受容体、例えば、可溶性TGF- β RII受容体) またはCD137L受容体に特異的に結合する。

40

【0774】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列 (例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか) をさらに含む。

【0775】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメイン

50

と一対の親和性ドメインの第1のドメインは、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0776】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

10

【0777】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む。

【0778】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと一対の親和性ドメインの第2のドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

20

【0779】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、追加の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインは、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインと追加の標的結合ドメインとの間にリンカー配列（例えば、本明細書に記載の例示的なリンカーのうちのいずれか）をさらに含む。

【0780】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性組織因子ドメインは、本明細書に記載の例示的な可溶性組織因子ドメインのうちのいずれかであり得る。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、一対の親和性ドメインは、本明細書に記載の例示的な一対の親和性ドメインのうちのいずれかであり得る。

30

【0781】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインはTGF- β に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインはCD137Lに特異的に結合する。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の標的結合ドメインまたは追加の標的結合ドメインは、可溶性TGF- β 受容体（例えば、可溶性TGF- β RII受容体、例えば、可溶性ヒトTGF- β RII受容体）である。

40

【0782】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF- β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF- β RII配列および第2の可溶性ヒトTGF- β RII配列を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトTGF- β RIIは、第1の可溶性ヒトTGF- β RII配列と第2の可溶性ヒトTGF- β RII配列との間に配置されたリンカーを含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの例では、リンカーは、配列GGGSGGGSGGGG（配列番号102）を含む。

【0783】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第1の可溶性ヒトTGF

50

R β R I I 受容体配列は、

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D (配列番号 183) と少なくとも 80% 同一 (例えば、
少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、
少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、
少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含む。

【0784】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 の可溶性ヒト TGF
R β R I I 受容体配列は、

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D (配列番号 184) と少なくとも 80% 同一 (例えば、
少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、
少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、
少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含む。

【0785】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 1 の可溶性ヒト TGF
R β R I I 受容体配列は、

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G A
T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C T
C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A T
C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C T
G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A A
A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A C
C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T G
C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G G
A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G T
A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C A
A C C C T G A T (配列番号 185) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82% 同一、
少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、
少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、
少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列によってコードされる。

【0786】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第 2 の可溶性ヒト TGF
R β R I I 受容体配列は、

A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T G A A T A A T G A C A T G A
T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G A A A T T T C C C C A G C T
G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T C C A C C T G C G A C A A C
C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C C A T C A C C T C C A T C T
G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G G C T G T C T G G C G G A A
G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A C C G T C T G C C A C G A T
C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T C C T G G A A G A C G C C G
C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G A A A A G A A G C C T G G
C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A G C A G C G A C G A A T G C

A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A A T A C A A T A C C A G C A
A C C C C G A C (配列番号 186) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82
% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なく
とも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一
、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列によって
コードされる。

【0787】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 TGF- β 受容体
は、

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N
Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D
P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C
N D N I I F S E E Y N T S N P D G G G G S G G G G S G G G G S I P P H V Q K S V
N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S
I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I
L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E E
Y N T S N P D (配列番号 188) と少なくとも 80% 同一 (例えば、少なくとも 82%
同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少なくとも 88% 同一、少なく
とも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94% 同一、少なくとも 96% 同一、
少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一) の配列を含む。

【0788】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性 TGF- β 受容体
は、

A T C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G A
T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C T
C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A T
C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C T
G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A A
A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A C
C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T G
C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G G
A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G T
A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C A
A C C C T G A T G G A G G T G G C G G A T C C G G A G G T G G A G G T T C T G G
T G G A G G T G G G A G T A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T G
A A T A A T G A C A T G A T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G A
A A T T T C C C C A G C T G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T C
C A C C T G C G A C A A C C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C C
A T C A C C T C C A T C T G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G G
C T G T C T G G C G G A A G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A C
C G T C T G C C A C G A T C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T C
C T G G A A G A C G C C G C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G A
A A A A G A A G C C T G G C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A G
C A G C G A C G A A T G C A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A A
T A C A A T A C C A G C A A C C C C G A C (配列番号 187) と少なくとも 80% 同
一 (例えば、少なくとも 82% 同一、少なくとも 84% 同一、少なくとも 86% 同一、少
なくとも 88% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 92% 同一、少なくとも 94%
同一、少なくとも 96% 同一、少なくとも 98% 同一、少なくとも 99% 同一、または 1
00% 同一) の配列によってコードされる。

【0789】

10

20

30

40

50

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、第2の標的結合ドメインは、可溶性CD137Lタンパク質（例えば、可溶性ヒトCD137Lタンパク質）を含む。これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137Lは、

REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLILLIDGPLSWY
SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR
RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS
EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ
GATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE（配列番号260）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0790】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137Lは、

CGCGAGGGTCCCCGAGCTTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCC
TCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTTCGCGCAGCTGGTGGC
CCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTTGAGCTGGTAC
AGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCTGACGGGGGGCC
TGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAA
GGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGG
CGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTG
CGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGC
CGCCCTGGCTTTGACCGTGACCTGCCACCCGCCTCCTCC
GAGGCTCGGAACTCGGCCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGC
TGCACTTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCA
CACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAG
GGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAA
TCCCAGCCGGACTCCCTTCAACCGAGGTCGGAA（配列番号261）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0791】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137Lは、

DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLILLIDGPLSWYSDPGLAGVSL
LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG
SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF
QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR
VTPEI（配列番号262）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含む。

【0792】

これらの多鎖キメラポリペプチドのいくつかの実施形態では、可溶性ヒトCD137Lは、

GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTG
CGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCC

10

20

30

40

50

CCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCT
CTGACGGGGGGGCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGC
TGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCA
ACTAGAGCTGCGGCGCGTGTTGGCCGGCGAGGGCTCAGGC
TCCGTTTCACTTGCCTGACCTGACAGCCACTGCGCTCTG
CTGCTGGGGCCGCGCCCTGGCTTTTGACCGTGGACCTGCC
ACCCGCTCTCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCTTCGGTTTC
CAGGGCCGCTTGTGACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGG
GCGTCCATCTTCACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCCTG
GCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGG
GTGACCCCCGAAATC（配列番号263）と少なくとも80%同一（例えば、
少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88
%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なく
とも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）
の配列によってコードされる。

【0793】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSIKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCCHD
PKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCS CSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSIKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCCHD PKLPYHDFI
ILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCS CSSDECNDNIIFSE
YNTSNPD SGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQV
YTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLA
RVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTI
QSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY
TLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVI
PSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIED
LIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK
NIKEFLQS FVHVQMFINTS（配列番号236）と少なくとも80%同一
（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少な
くとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同
一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または10
0%同一）の配列を含み得る。

【0794】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGT CAGGTT CAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCA ACTG CAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCAGACTTCA TTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTT CAGCGAAGAGTACAACACCAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGG

TGGAGGTGGGAGTATTCTCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG
AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAATTTCTGCGATGTGAGGTTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTTAGCGAGGAA
TACAATAACAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAG
TCGCTGCCTATAACCTCACTTTGGAAGAGCACCAACTTCAA
AACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTT
TACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGT
CCAAATGTTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCAC
CGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCC
CGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTG
GTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATC
CAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTT
TCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTAC
ACACTGTATTACTGGAAGTCTCTCTCCCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTTAATCGACGTGGA
TAAAGGCGAAAACTACTGTTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATC
CCCTCCCGGACCGTGAAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCG
TTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAA
CTGGGGTGAACGTCAATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGAT
TTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAG
AATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAA
ATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGC
GGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCA
TTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGAC
AGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAAG
AACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCC
AGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号237）と少なくとも80%同一

（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0795】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVVCV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKE
KKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEELYNTSNPDGGGSG
GGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVVCVAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFF
MCSSSDECNDNIIFSEELYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWK

STNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYE
NSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQVGTKVNVTVEDERTLVR
RNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSSGKKTAKTNTNEF
LIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEK
EFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCK
VTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSS
NGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS (配
列番号238)と少なくとも80%同一(例えば、少なく
とも82%同一、少なくとも84%同一、少なく
とも86%同一、少なくとも88%同一、少なく
とも90%同一、少なくとも92%同一、少なく
とも94%同一、少なくとも96%同一、少なく
とも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一)の配列を含み得る。

10

【0796】

いくつかの実施形態では、第1のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGA
CCGTGTGTCAACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGAAATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCCTGC
GATGTGAGGTTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAGAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGG
CACAAACCAACACAGTCGCTGCCCTATAACCTCACTTGGAAG
AGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAAC
CCGTTAAACCAAGTTTACACCGGTGCAGATCAGCACCAAGTC
CGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTTCTATACCACCGACACC
GAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAAC
AGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTATAGCTACCCCGCCGGCAA
TGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAG
AACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAG
GACAGCCCAACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACA
GGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGC
CGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTTC
CTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTT

20

30

40

50

TTAATCGACGTGGATAAAGGGCGAAAAC TACTGTTTTCAGCG
TGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAG
CACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGC
GAGTTCCGGGAGAACTGGGGTGAACGTCATCAGCGATT TAA
AGAAGATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGC
CACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAG
GTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTA
TCTCTTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGT
GGAGAATTTAATCATTTT TAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAG
AGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC（配列番号2
39）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、
少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、
少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく
とも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0797】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSI CEK PQEVCVAVWRKNDENITLETVC HD
PKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSI CEK PQEVCVAVWRKNDENITLETVC HD PKLPYHDFI
LED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEE
YNTSNPDITC PPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGF
KRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGG
GSGGGGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI
DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV
FFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT V
DLPPASSEARN S AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR
HAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE（配列番号316）
と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少な
くとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同
一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なく
とも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0798】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGA
TCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCT
CTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAAT
CAGAAGTCCCTGCATGTCCAAC TGCAGCATCACCTCCATCT
GCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA
AAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGAC
CCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCA TTCTGGAGGACGCTG
CCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGG
AGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGT
AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAAGCA
ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGG
TGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTG

AATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGA
AATTTCCCCAGCTGTGCAAATTTCTGCGATGTGAGGTTTTC
CACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGG
CTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAAC
CGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATC
CTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAGA
AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAG
CAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA
TACAATACCAGCAACCCCGACATTTACATGCCCCCTCCCA
TGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAG
CCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTC
AAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGC GTGC
TGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTC
TTTAAAGTGCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGT
GGCTCCGGCGGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTT
CGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGACCTGCGGCGAGGG
CATGTTTGCAGCTGGTGGCCCAAATGTTCTGCTGATC
GATGGGGCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAG
GCGTGTCCTTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACAC
GAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTC
TTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGG
GCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACT
GCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCCGCCCTGGCTTTTGACCGTG
GACCTGCCACCCGCCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCCT
TCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCA
GCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGC
CATGCCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGAC
TCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAAGCCGGACTCCCTTC
ACCGAGGTTCGGAA（配列番号317）と少なくとも80%同一（例えば、少な
くとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同
一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも
96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配
列によってコードされる。

【0799】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAV
KFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV CV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSG
GGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEV CVAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFF
MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPM SVEHADIW
VKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV AH
WTTPSLKCIRGGGSGGGGSGGGGSGREGPELSPDDPAGLL
DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS
YKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL
HLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLH
LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIP

10

20

30

40

50

AGLPSPRSE（配列番号318）と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列を含み得る。

【0800】

いくつかの実施形態では、第2のキメラポリペプチドは、

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGT
GAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTG
AAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCA
GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTG
GCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGA
CCGTGTGTCAACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCAT
TCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAG
AAGAAGAAGCCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTA
GCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGA
GTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGA
GGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACG
TGCAGAAGAGCGTGAAATAATGACATGATCGTGACCGATAA
CAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAAGTCCCTGTA
TGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCA
GGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAAT
ATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCT
ACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTG
CATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTC
ATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCA
TCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTAC
ATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGG
GTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCT
GTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCAC
TGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGGCGGTGGAG
GATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGGCGGAGGATCTCGCGA
GGGTCCCGAGCTTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTG
GACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCAGCTGGTGGCCCCAAA
ATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGGTACAGTGA
CCCAGGCCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGC
TACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTG
GAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGGCGCGT
GGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTG
CACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCGGCC
TGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCCTCCTCCGAGGC
TCGGAACTCGGCCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCAC
CTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGGCGTCCATCTTCACACTG
AGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGC
CACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCA
GCCGGACTCCCTTCAACCGAGGTGGGA（配列番号319）と少なく

10

20

30

40

50

とも80%同一（例えば、少なくとも82%同一、少なくとも84%同一、少なくとも86%同一、少なくとも88%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一）の配列によってコードされる。

【0801】

加齢関連疾患または状態を治療する方法

加齢関連疾患または状態（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なタイプの加齢関連疾患または状態のうちのいずれか）の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なタイプの加齢関連疾患または状態のうちのいずれか）を有すると特定された対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質のうちのいずれか）を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。

10

【0802】

加齢関連疾患または状態（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なタイプの加齢関連疾患または状態のうちのいずれか）の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なタイプの加齢関連疾患または状態のうちのいずれか）を有すると特定された対象に、治療有効量の活性化されたNK細胞（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の活性化されたNK細胞のうちのいずれか）を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。

20

【0803】

これらの方法のいくつかの実施形態は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることをさらに含む。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られたハプロタイプ一致のNK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。これらの方法のいずれかのいくつかの例では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。

30

【0804】

これらの方法のいくつかの例では、液体培養培地は、無血清液体培養培地である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、液体培養培地は、化学的に定義された液体培養培地である。これらの方法のいくつかの例は、活性化されたNK細胞を単離すること（および任意選択で、活性化されたNK細胞の治療有効量を、対象、例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれかにさらに投与すること）をさらに含む。これらの方法のいくつかの実施形態では、接触ステップは、約2時間～約20日（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか）の期間にわたって実施される。

40

【0805】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、心臓血管疾患、皮膚疾患、老年症疾患、および脆弱性疾患の群から選択される。

【0806】

がんの非限定的な例には、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白

50

血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃食道癌、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肝臓癌、および肝細胞癌が挙げられる。

【0807】

自己免疫疾患の非限定的な例は、1型糖尿病である。

【0808】

代謝性疾患の非限定的な例には、肥満、脂肪異常栄養症、および2型真性糖尿病が含まれる。

【0809】

神経変性疾患の非限定的な例には、アルツハイマー病、パーキンソン病、および認知症が含まれる。

【0810】

心血管疾患の非限定的な例には、冠状動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、および肺動脈性肺高血圧症が含まれる。

【0811】

皮膚疾患の非限定的な例には、創傷治癒、脱毛症、しわ、老人性黒子、皮膚の菲薄化、色素性乾皮症、および先天性角化異常症が含まれる。

【0812】

早老症疾患の非限定的な例には、早老症およびハッチンソン・ギルフォード早老症症候群が含まれる。

【0813】

脆弱性疾患の非限定的な例には、脆弱、ワクチン接種に対する応答、骨粗鬆症、およびサルコペニアが含まれる。

【0814】

本明細書に記載の加齢関連疾患または状態のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、加齢関連黄斑変性、骨関節炎、脂肪萎縮、特発性肺線維症、腎移植不全、肝線維症、骨量喪失、サルコペニア、加齢関連肺組織弾性喪失、骨粗しょう症、加齢関連腎機能障害、および化学的に誘導された腎機能障害の群から選択される。

【0815】

本明細書に記載の加齢関連疾患または状態のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、2型糖尿病またはアテローム性動脈硬化症である。

【0816】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、対象は、加齢関連疾患または状態（例えば、本明細書に記載の例示的な加齢関連疾患または状態のうちのいずれか）を有すると特定または診断されている。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態は、加齢関連疾患または状態（例えば、本明細書に記載の例示的な加齢関連疾患または状態のうちのいずれか）を有すると特定または診断されている対象を選択するステップを含み得る。

【0817】

これらの方法のいくつかの実施形態では、投与することは、対象における標的組織中の老化細胞の数における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%減少、または約10%減少～約99%減少、約10%減少～約95%減少、約10%減少～約90%減少、約10%減少～約85%減少、約10%減少～約80%減少、約10%減少～約75%減少、約10%減少～約70%減少、約10%減少～約65%減少

10

20

30

40

50

50

減少、約70%減少～約95%減少、約70%減少～約90%減少、約70%減少～約85%減少、約70%減少～約80%減少、約70%減少～約75%減少、約75%減少～約99%減少、約75%減少～約95%減少、約75%減少～約90%減少、約75%減少～約85%減少、約75%減少～約80%減少、約80%減少～約99%減少、約80%減少～約95%減少、約80%減少～約90%減少、約80%減少～約85%減少、約85%減少～約99%減少、約85%減少～約95%減少、約85%減少～約90%減少、約90%減少～約99%減少、約90%減少～約95%減少、または約95%減少～約99%減少)をもたらす(例えば、治療前の対象における標的組織中の老化細胞の数と比較して)。

【0818】

これらの方法のいくつかの実施形態では、投与することは、対象におけるIFN- γ 、細胞傷害性顆粒グランザイム、および／またはパーフォリンのレベルにおける増加(例えば、少なくとも5%の増加、少なくとも10%の増加、少なくとも15%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも25%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも35%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも45%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも55%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも65%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも75%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも85%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも95%の増加、または少なくとも99%の増加、または約10%増加～約500%増加(または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか)をもたらす(治療前の対象または治療を受けていない同様の対照対象のレベルと比較して)。

【0819】

いくつかの実施形態では、これらの方法は、対象におけるがんの1つ以上の症状の数、重症度、または頻度の減少をもたらす(例えば、治療前の対象におけるがんの1つ以上の症状の数、重症度、または頻度と比較して)。いくつかの実施形態では、これらの方法は、対象における1つ以上の固形腫瘍の体積における減少(例えば、約1%減少～約99%減少、約1%減少～約95%減少、約1%減少～約90%減少、約1%減少～約85%減少、約1%減少～約80%減少、約1%減少～約75%減少、約1%減少～約70%減少、約1%減少～約65%減少、約1%減少～約60%減少、約1%減少～約55%減少、約1%減少～約50%減少、約1%減少～約45%減少、約1%減少～約40%減少、約1%減少～約35%減少、約1%減少～約30%減少、約1%減少～約25%減少、約1%減少～約20%減少、約1%減少～約15%減少、約1%減少～約10%減少、約1%減少～約5%減少、約5%減少～約99%減少、約5%減少～約95%減少、約5%減少～約90%減少、約5%減少～約85%減少、約5%減少～約80%減少、約5%減少～約75%減少、約5%減少～約70%減少、約5%減少～約65%減少、約5%減少～約60%減少、約5%減少～約55%減少、約5%減少～約50%減少、約5%減少～約45%減少、約5%減少～約40%減少、約5%減少～約35%減少、約5%減少～約30%減少、約5%減少～約25%減少、約5%減少～約20%減少、約5%減少～約15%減少、約5%減少～約10%減少、約10%減少～約99%減少、約10%減少～約95%減少、約10%減少～約90%減少、約10%減少～約85%減少、約10%減少～約80%減少、約10%減少～約75%減少、約10%減少～約70%減少、約10%減少～約65%減少、約10%減少～約60%減少、約10%減少～約55%減少、約10%減少～約50%減少、約10%減少～約45%減少、約10%減少～約40%減少、約10%減少～約35%減少、約10%減少～約30%減少、約10%減少～約25%減少、約10%減少～約20%減少、約10%減少～約15%減少、約15%減少～約99%減少、約15%減少～約95%減少、約15%減少～約90%減少、約15%減少～約85%減少、約15%減少～約80%減少、約15%減少～約75%減少、約15%減少～約70%減少、約15%減少～約65%減少、約15%減少～約60%減少、約15%減少～約55%減少、約15%減少～約50%減少、約15%減少～約45%減少、約15%減少～約40%減少、約15%減少～約35%減少、約15%減少～約30%減少、

10

20

30

40

50

約15%減少～約25%減少、約15%減少～約20%減少、約20%減少～約99%減少、約20%減少～約95%減少、約20%減少～約90%減少、約20%減少～約85%減少、約20%減少～約80%減少、約20%減少～約75%減少、約20%減少～約70%減少、約20%減少～約65%減少、約20%減少～約60%減少、約20%減少～約55%減少、約20%減少～約50%減少、約20%減少～約45%減少、約20%減少～約40%減少、約20%減少～約35%減少、約20%減少～約30%減少、約20%減少～約25%減少、約25%減少～約99%減少、約25%減少～約95%減少、約25%減少～約90%減少、約25%減少～約85%減少、約25%減少～約80%減少、約25%減少～約75%減少、約25%減少～約70%減少、約25%減少～約65%減少、約25%減少～約60%減少、約25%減少～約55%減少、約25%減少～約50%減少、約25%減少～約45%減少、約25%減少～約40%減少、約25%減少～約35%減少、約25%減少～約30%減少、約30%減少～約99%減少、約30%減少～約95%減少、約30%減少～約90%減少、約30%減少～約85%減少、約30%減少～約80%減少、約30%減少～約75%減少、約30%減少～約70%減少、約30%減少～約65%減少、約30%減少～約60%減少、約30%減少～約55%減少、約30%減少～約50%減少、約30%減少～約45%減少、約30%減少～約40%減少、約30%減少～約35%減少、約35%減少～約99%減少、約35%減少～約95%減少、約35%減少～約90%減少、約35%減少～約85%減少、約35%減少～約80%減少、約35%減少～約75%減少、約35%減少～約70%減少、約35%減少～約65%減少、約35%減少～約60%減少、約35%減少～約55%減少、約35%減少～約50%減少、約35%減少～約45%減少、約35%減少～約40%減少、約40%減少～約99%減少、約40%減少～約95%減少、約40%減少～約90%減少、約40%減少～約85%減少、約40%減少～約80%減少、約40%減少～約75%減少、約40%減少～約70%減少、約40%減少～約65%減少、約40%減少～約60%減少、約40%減少～約55%減少、約40%減少～約50%減少、約40%減少～約45%減少、約45%減少～約99%減少、約45%減少～約95%減少、約45%減少～約90%減少、約45%減少～約85%減少、約45%減少～約80%減少、約45%減少～約75%減少、約45%減少～約70%減少、約45%減少～約65%減少、約45%減少～約60%減少、約45%減少～約55%減少、約45%減少～約50%減少、約50%減少～約99%減少、約50%減少～約95%減少、約50%減少～約90%減少、約50%減少～約85%減少、約50%減少～約80%減少、約50%減少～約75%減少、約50%減少～約70%減少、約50%減少～約65%減少、約50%減少～約60%減少、約50%減少～約55%減少、約55%減少～約99%減少、約55%減少～約95%減少、約55%減少～約90%減少、約55%減少～約85%減少、約55%減少～約80%減少、約55%減少～約75%減少、約55%減少～約70%減少、約55%減少～約65%減少、約55%減少～約60%減少、約60%減少～約99%減少、約60%減少～約95%減少、約60%減少～約90%減少、約60%減少～約85%減少、約60%減少～約80%減少、約60%減少～約75%減少、約60%減少～約70%減少、約60%減少～約65%減少、約65%減少～約99%減少、約65%減少～約95%減少、約65%減少～約90%減少、約65%減少～約85%減少、約65%減少～約80%減少、約65%減少～約75%減少、約65%減少～約70%減少、約70%減少～約99%減少、約70%減少～約95%減少、約70%減少～約90%減少、約70%減少～約85%減少、約70%減少～約80%減少、約70%減少～約75%減少、約75%減少～約99%減少、約75%減少～約95%減少、約75%減少～約90%減少、約75%減少～約85%減少、約75%減少～約80%減少、約80%減少～約99%減少、約80%減少～約95%減少、約80%減少～約90%減少、約80%減少～約85%減少、約85%減少～約99%減少、約85%減少～約95%減少、約85%減少～約90%減少、約90%減少～約99%減少、または約95%～約99%減少)をもたらし得る(例えば、治療前または治療開始時の1つ以上の固形腫瘍の体積と比較して)。いくつかの実施形態では、これらの方法は、対象における

10

20

30

40

50

転移を発症するリスクまたは1つ以上の追加の転移を発症するリスクを減少させることができる（例えば、約1%減少～約99%減少、または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか）（例えば、治療前の対象または異なる治療が施された同様の対象もしくは対象集団における転移を発症するリスクまたは1つ以上の追加の転移を発症するリスクと比較して）。

【0820】

いくつかの実施形態では、これらの方法は、対象における代謝性疾患の治療をもたらし得る。いくつかの実施形態では、代謝性疾患の治療は、例えば、1つ以上（例えば、2、3、4、5、または6つ）の改善されたグルコース耐性、改善されたグルコース利用、糖尿病性骨関節症の重症度または進行の低下、皮膚病変の重症度または進行の低下、ケトosisの重症度または進行の減少、膵島細胞に対する自己抗体の生成の減少、インスリン感受性の増加、質量の減少、および肥満度指数の減少をもたらし得る。対象の治療に対する反応は、標準的な技術に従って空腹時グルコースまたはグルコース耐性を決定することによって監視することができる。典型的には、この方法によれば、血糖値は、100mg/dL未満の空腹時血糖値または140mg/dL未満の2時間の75gの経口グルコース耐性試験値によって特徴付けられる血糖値を達成するように低下される。いくつかの実施形態では、治療に対する反応は、血圧、肥満度指数、PPAR γ 機能、脂質代謝、糖化ヘモグロビン（H1c）、および腎機能を含む、前糖尿病、新たに発症する糖尿病、または活動性糖尿病に関連する他の因子を決定することを含み得る。

【0821】

いくつかの実施形態では、これらの方法は、疾患の生化学的、組織学的、および／または行動上の症状、その合併症、および疾患の発症中に現れる中間の病理学的表現型を含む、神経変性疾患の発症のリスクを排除または減少し、重症度を軽減し、または遅らせることができる。

【0822】

いくつかの実施形態では、皮膚疾患の効果的な治療は、治療前の皮膚の状態と比較して、皮膚の色、水分、温度、質感、可動性および弾力、ならびに皮膚病変を含む皮膚状態を検査することを含む、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法によって評価することができる。

【0823】

いくつかの実施形態では、自己免疫疾患の効果的な治療は、新たに単離されたPBMCの全血球数分析、総Igレベル、および血清自己抗体力価の分析を含む、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法によって評価することができる。

【0824】

いくつかの実施形態では、脆弱性疾患の効果的な治療は、骨ミネラル密度、骨構築および形状、骨代謝回転の生物医学的マーカー、ビタミンD測定、カルノフスキー・パフォーマンス・ステータス、およびECOGスコア、およびワクチン接種への反応性を監視することを含む、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法によって評価することができる。

【0825】

対象における老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法

老化細胞（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なタイプの老化細胞のうちのいずれか）の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、当該対象に、治療有効量の1つ以上のNK細胞活性化物質（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のNK細胞活性化物質（複数可）のうちのいずれか）を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0826】

老化細胞（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の例示的なタイプの老化細胞のうちのいずれか）の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老

10

20

30

40

50

化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、当該対象に、治療有効量の1つ以上のNK細胞（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のNK細胞（複数可）のうちのいずれか）を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0827】

これらの方法のいくつかの実施形態は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることをさらに含む。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られたハプロタイプ一致のNK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。これらの方法のいずれかのいくつかの例では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。

10

【0828】

これらの方法のいくつかの例では、液体培養培地は、無血清液体培養培地である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、液体培養培地は、化学的に定義された液体培養培地である。これらの方法のいくつかの例は、活性化されたNK細胞を単離すること（および、活性化されたNK細胞の治療有効量を、対象、例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれかにさらに投与すること）をさらに含む。これらの方法のいくつかの実施形態では、接触ステップは、約2時間～約20日（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか）の期間にわたって実施される。

20

【0829】

これらの方法のいくつかの実施形態では、老化細胞は、老化がん細胞、老化単球、老化リンパ球、老化星状細胞、老化ミクログリア、老化ニューロン、老化組織線維芽細胞、老化皮膚線維芽細胞、老化ケラチノサイト、または他の分化組織特異的な分裂機能細胞である。これらの方法のいくつかの実施形態では、老化がん細胞は、化学療法によって誘導された老化細胞または放射線によって誘導された老化細胞である。

【0830】

これらの方法のいくつかの実施形態では、対象は、加齢関連疾患または状態（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の加齢関連の疾患または状態のうちのいずれか）を有すると特定または診断されている。本明細書に記載の加齢関連疾患または状態のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、心臓血管疾患、皮膚疾患、早老症疾患、および脆弱性疾患の群から選択される。

30

【0831】

がんの非限定的な例には、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃食道癌、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肝臓癌、および肝細胞癌が挙げられる。

40

【0832】

自己免疫疾患の非限定的な例は、1型糖尿病である。

【0833】

代謝性疾患の非限定的な例には、肥満、脂肪異常栄養症、および2型真性糖尿病が含まれる。

【0834】

50

神経変性疾患の非限定的な例には、アルツハイマー病、パーキンソン病、および認知症が含まれる。

【0835】

心血管疾患の非限定的な例には、冠状動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、および肺動脈性肺高血圧症が含まれる。

【0836】

皮膚疾患の非限定的な例には、創傷治癒、脱毛症、しわ、老人性黒子、皮膚の菲薄化、色素性乾皮症、および先天性角化異常症が含まれる。

【0837】

早老症疾患の非限定的な例には、早老症およびハッチンソン・ギルフォード早老症症候群が含まれる。

【0838】

脆弱性疾患の非限定的な例には、脆弱、ワクチン接種に対する応答、骨粗鬆症、およびサルコペニアが含まれる。

【0839】

本明細書に記載の加齢関連疾患または状態のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、加齢関連黄斑変性、骨関節炎、脂肪萎縮、特発性肺線維症、腎移植不全、肝線維症、骨量喪失、サルコペニア、加齢関連肺組織弾性喪失、骨粗しょう症、加齢関連腎機能障害、および化学的に誘導された腎機能障害の群から選択される。

【0840】

本明細書に記載の加齢関連疾患または状態のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、加齢関連疾患または状態は、2型糖尿病またはアテローム性動脈硬化症である。

【0841】

これらの方法のいくつかの実施形態では、投与することは、対象における標的組織中の老化細胞の数における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約10%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象における標的組織中の老化細胞の数と比較して）。これらの方法のいくつかの実施形態では、対象における標的組織は、脂肪組織、膵臓組織、肝臓組織、肺組織、血管系、骨組織、中枢神経系（CNS）組織、眼組織、皮膚組織、筋肉組織、および二次リンパ器官組織のうちの1つ以上であり得る。

【0842】

これらの方法のいくつかの実施形態では、投与することは、対象におけるIFN- γ 、細胞傷害性顆粒グランザイム、および／またはパーフォリンのレベルにおける増加（例えば、少なくとも5%の増加、少なくとも10%の増加、少なくとも15%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも25%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも35%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも45%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも55%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも65%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも75%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも85%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも95%の増加、または少なくとも99%の増加、または約10%増加～約500%増加（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（治療前の対象または治療を受けていない同様の対照対象のレベルと比較して）。

【0843】

これらの方法のいくつかの実施形態では、標的組織（例えば、本明細書に記載の標的組

10

20

30

40

50

織のうちのいずれか)における老化細胞の数は、生検試料に対して免疫染色を行うことによって決定することができる。これらの方法のいくつかの実施形態では、標的組織(例えば、本明細書に記載の標的組織のうちのいずれか)における老化細胞の数は、対象における加齢関連疾患または状態(例えば、本明細書に記載の加齢関連疾患または状態の症状のうちのいずれか)の1つ以上の症状の改善を通じて間接的に観察することができる。

【0844】

老化細胞

老化細胞は、形態、クロマチン構成、遺伝子発現、および代謝の変化を含む重要な特有の特性を示す。細胞老化に関連するいくつかの生化学的および機能的特性、例えば、(i)サイクリン依存性キナーゼの阻害剤であるp16およびp21の発現の増加、(ii)リソソーム活性のマーカーである老化関連β-ガラクトシダーゼの存在、(iii)老化関連ヘテロクロマチン病巣の出現およびラミンB1レベルのダウンレギュレーション、(iv)抗アポトーシスBCLファミリータンパク質の発現の増加によって引き起こされるアポトーシスに対する耐性、および(v)CD26(DPP4)、CD36(スカベンジャー受容体)、フォークヘッドボックス4(FOXO4)、および分泌キャリア膜タンパク質4(SCAMP4)のアップレギュレーションが存在する。老化細胞は、炎症特性、いわゆる老化関連分泌表現型(SASP)も発現する。SASPを介して、老化細胞は、細胞自律的様式で作動して老化を強化し(オートクリン効果)、微小環境と通信して修飾する(パラクリン効果)、広範囲の炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8)、成長因子(TGF-β)、ケモカイン(CCL-2)、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP-3、MMP-9)を産生する。SASP因子は、老化細胞の免疫介在性クリアランスである老化監視をトリガすることによって腫瘍抑制に寄与することができる。しかしながら、慢性炎症も腫瘍形成の既知の要因であり、累積証拠は、慢性SASPががん転移および加齢関連疾患を後押しする可能性もあることを示す。

【0845】

老化細胞の分泌プロファイルは、状況依存的である。例えば、ヒト線維芽細胞における様々なミトコンドリア機能障害によって誘導されるミトコンドリア機能障害関連老化(MIDAS)は、IL-1依存性炎症性因子が不足したSASPの出現をもたらした。NAD+/NADH比の減少は、p53の活性化によりMIDASを誘導したAMPKシグナル伝達を活性化した。結果として、p53は炎症促進性SASPの重要な誘導因子であるNF-κBシグナル伝達を阻害した。対照的に、ヒト細胞における持続的なDNA損傷によって引き起こされた細胞老化は、炎症性SASPを誘導し、これは、運動失調-毛細血管拡張症変異(ATM)キナーゼの活性化に依存したが、p53の活性化には依存しなかった。具体的には、IL-6およびIL-8の発現レベルおよび分泌レベルが増加した。異所性発現p16INK4aおよびp21CIP1によって引き起こされる細胞老化が、炎症性SASPなしでヒト線維芽細胞における老化表現型を誘導することも実証されており、成長停止自体はSASPを刺激しなかったことを示している。

【0846】

老化の最も明確な特徴の1つは、安定した成長停止である。これは、2つの重要な経路であるp16/Rbおよびp53/p21によって達成され、これらはいずれも腫瘍抑制の中心である。DNA損傷は、(1)クロマチンにおけるγH2Ax(ヒストンコーディング遺伝子)および53BP1(DNA損傷応答に関与)の高沈着(これは最終的にp53活性化をもたらすキナーゼカスケードの活性化につながる)、および(2)p16INK4aおよびARF(いずれもCDKN2Aによってコードされる)ならびにp15INK4b(CDKN2Bによってコードされる)の活性化(p53はサイクリン依存性キナーゼ阻害剤(p21)の転写を誘導し、p16INK4aおよびp15INK4bの両方とともに、細胞周期進行のために遺伝子を遮断する(CDK4およびCDK6))をもたらす。これは、最終的に網膜芽細胞腫タンパク質(Rb)の低リン酸化およびG1期での細胞周期停止につながる。

【0847】

10

20

30

40

50

老化細胞を選択的に死滅させることにより、正常な加齢との関連でマウスの健康スパンが大幅に改善され、加齢関連疾患またはがん療法の結果が改善されることが示されている（Ovadya, J Clin Invest. 128 (4) : 1247-1254, 2018）。自然界では、老化細胞は、通常、自然免疫細胞によって除去される。老化の誘導は、損傷／変化した細胞の潜在的な増殖および形質転換を阻止するのみならず、主にナチュラルキラー（NK）細胞（IL-15およびCCL2等）およびマクロファージ（CSF-1およびCCL2等）の化学誘引物質として機能するSASP因子の産生により組織修復も支持する。これらの自然免疫細胞は、ストレスを受けた細胞を排除するための免疫監視メカニズムを媒介する。老化細胞は、通常、ストレス誘導性リガンドのファミリーに属するNK細胞活性化受容体NKG2DおよびDNAM1リガンドをアップレギュレートし、これは、感染性疾患および悪性腫瘍に対する最前線の免疫防御の重要な要素である。受容体が活性化されると、NK細胞は、それらの細胞溶解機構を介して老化細胞の死を特異的に誘導することができる。老化細胞の免疫監視におけるNK細胞の役割は、肝線維症（Sagiv, Oncogene 32 (15) : 1971-1977, 2013）、肝細胞癌（Iannello, J Exp Med 210 (10) : 2057-2069, 2013）、多発性骨髄腫（Soriani, Blood 113 (15) : 3503-3511, 2009）、およびメバロン酸経路の機能傷害によってストレスを受けた神経膠腫細胞（Ciaglia, Int J Cancer 142 (1) : 176-190, 2018）において指摘されている。子宮内膜細胞は、急性細胞老化を受け、脱落膜細胞に分化しない。分化した脱落膜細胞は、IL-15を分泌し、それにより、子宮NK細胞を動員して、未分化老化細胞を標的として排除し、子宮内膜の再構築および若返りを助ける（Brighton, Elife 6 : e31274, 2017）。同様のメカニズムを用いて、肝線維症の間に、p53を発現する老化肝衛星細胞は、老化細胞除去活性を呈する常在性Kupferマクロファージおよび新たに浸潤したマクロファージの極性を炎症促進性M1表現型に向かって歪めた。F4/80+マクロファージが、分娩後の子宮機能を維持するためにマウス子宮老化細胞のクリアランスに重要な役割を果たすことが示されている。

【0848】

老化細胞は、主に、NKG2D（NK細胞で発現）、ケモカイン、および他のSASP因子に対するリガンドをアップレギュレートすることによってNK細胞を動員する。肝線維症のインビボモデルは、活性化されたNK細胞による老化細胞の効果的なクリアランスを示している（Krizhanovsky, Cell 134 (4) : 657-667, 2008）。研究では、肝線維症（Krizhanovsky, Cell 134 (4) : 657-667, 2008）、変形性関節症（Xu, J Gerontol A Biol Sci Med Sci 72 (6) : 780-785, 2017）、およびパーキンソン病（Chinta, Cell Rep 22 (4) : 930-940, 2018）を含む老化を研究するための様々なモデルが説明されている。老化細胞を研究するための動物モデルは、Krizhanovsky, Cell 134 (4) : 657-667, 2008、Baker, Nature 479 (7372) : 232-236, 2011、Farr, Nat Med 23 (9) : 1072-1079, 2017、Bourgeois, FEBS Lett 592 (12) : 2083-2097, 2018、Xu, Nat Med 24 (8) : 1246-1256, 2018）で説明されている。

【0849】

皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法

ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とする対象において皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、当該対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のNK細胞活性化物質（複数可）のうちのいずれか）を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0850】

ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とする対象において皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、当該対象に、治療有効量の活性化されたNK細胞（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の活性化されたNK細胞のうちのいずれか）を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0851】

これらの方法のいくつかの実施形態は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることとをさらに含む。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られたハプロタイプ一致のNK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。これらの方法のいずれかのいくつかの例では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。

10

【0852】

これらの方法のいくつかの例では、液体培養培地は、無血清液体培養培地である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、液体培養培地は、化学的に定義された液体培養培地である。これらの方法のいくつかの例は、活性化されたNK細胞を単離すること（および、活性化されたNK細胞の治療有効量を、対象、例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれかにさらに投与すること）をさらに含む。これらの方法のいくつかの実施形態では、接触ステップは、約2時間～約20日（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか）の期間にわたって実施される。

20

【0853】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の皮膚の質感および／または外観の改善を提供する。

【0854】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の皮膚におけるしわの形成速度における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象におけるしわの形成速度または治療を受けていない同様の対象におけるしわの形成速度と比較して）。

30

40

【0855】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の皮膚の着色の改善をもたらす。

【0856】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の皮膚の質感の改善をもたらす。

【0857】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の毛髪の質感および／または外観の改善を提

50

供する。

【0858】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の白髪の形成速度における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（治療前の対象における白髪の形成速度または治療を受けていない同様の対象における白髪の形成速度と比較して）。

10

【0859】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の白髪の数における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象における白髪の数または治療を受けていない同様の対象における白髪の形成速度と比較して）。

20

【0860】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象における毛髪脱落速度における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象における毛髪脱落速度または治療を受けていない同様の対象における毛髪脱落速度と比較して）。

30

【0861】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の毛髪の質感の改善をもたらす。

40

【0862】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象における老化皮膚線維芽細胞の数における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））

50

)) をもたす (例えば、治療前の対象における老化皮膚細胞の数または治療を受けていない同様の対象における老化皮膚細胞の数と比較して)。

【0863】

これらの方法のいくつかの実施形態では、ある期間 (例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか) にわたる対象の皮膚の質感および／または外観の改善は、皮膚病変の存在、サイズ、および形状、皮膚の色および皮膚色素沈着、皮膚の水分、温度、弾力、および血管分布を検査することを含む、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法によって評価することができる。

【0864】

これらの方法のいくつかの実施形態では、ある期間 (例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか) にわたる対象の毛髪の質感および／または外観の改善は、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法によって評価することができる。

【0865】

これらの方法のいくつかの実施形態では、ある期間は、例えば、1 カ月～10 年、1 カ月～9 年、1 カ月～8 年、1 カ月～7 年、1 カ月～6 年、1 カ月～5 年、1 カ月～4 年、1 カ月～3 年、1 カ月～2 年、1 カ月～18 カ月、1 カ月～12 カ月、1 カ月～10 カ月、1 カ月～8 カ月、1 カ月～6 カ月、1 カ月～4 カ月、1 カ月～2 カ月、1 カ月～6 週間、6 週間～10 年、6 週間～9 年、6 週間～8 年、6 週間～7 年、6 週間～6 年、6 週間～5 年、6 週間～4 年、6 週間～3 年、6 週間～2 年、6 週間～18 カ月、6 週間～12 カ月、6 週間～10 カ月、6 週間～8 カ月、6 週間～6 カ月、6 週間～4 カ月、6 週間～2 カ月、2 カ月～10 年、2 カ月～9 年、2 カ月～8 年、2 カ月～7 年、2 カ月～6 年、2 カ月～5 年、2 カ月～4 年、2 カ月～3 年、2 カ月～2 年、2 カ月～18 カ月、2 カ月～12 カ月、2 カ月～10 カ月、2 カ月～8 カ月、2 カ月～6 カ月、2 カ月～4 カ月、4 カ月～10 年、4 カ月～9 年、4 カ月～8 年、4 カ月～7 年、4 カ月～6 年、4 カ月～5 年、4 カ月～4 年、4 カ月～3 年、4 カ月～2 年、4 カ月～18 カ月、4 カ月～12 カ月、4 カ月～10 カ月、4 カ月～8 カ月、4 カ月～6 カ月、6 カ月～10 年、6 カ月～9 年、6 カ月～8 年、6 カ月～7 年、6 カ月～6 年、6 カ月～5 年、6 カ月～4 年、6 カ月～3 年、6 カ月～2 年、6 カ月～18 カ月、6 カ月～12 カ月、6 カ月～10 カ月、6 カ月～8 カ月、8 カ月～10 年、8 カ月～9 年、8 カ月～8 年、8 カ月～7 年、8 カ月～6 年、8 カ月～5 年、8 カ月～4 年、8 カ月～3 年、8 カ月～2 年、数カ月～18 カ月、8 カ月～12 カ月、8 カ月～10 カ月、10 カ月～10 年、10 カ月～9 年、10 カ月～8 年、10 カ月～7 年、10 カ月～6 年、10 カ月～5 年、10 カ月～4 年、10 カ月～3 年、10 カ月～2 年、10 カ月～18 カ月、10 カ月～12 カ月、12 カ月～10 年、12 カ月～9 年、12 カ月～8 年、12 カ月～7 年、12 カ月～6 年、12 カ月～5 年、12 カ月～4 年、12 カ月～3 年、12 カ月～2 年、12 カ月～18 カ月、18 カ月～10 年、18 カ月～9 年、18 カ月～8 年、18 カ月～7 年、18 カ月～6 年、18 カ月～5 年、18 カ月～4 年、18 カ月～3 年、18 カ月～2 年、2 年～10 年、2 年～9 年、2 年～8 年、2 年～7 年、2 年～6 年、2 年～5 年、2 年～4 年、2 年～3 年、3 年～10 年、3 年～9 年、3 年～8 年、3 年～7 年、3 年～6 年、3 年～5 年、3 年～4 年、4 年～10 年、4 年～9 年、4 年～8 年、4 年～7 年、4 年～6 年、4 年～5 年、5 年～10 年、5 年～9 年、5 年～8 年、5 年～7 年、5 年～6 年、6 年～10 年、6 年～9 年、6 年～8 年、6 年～7 年、7 年～10 年、7 年～9 年、7 年～8 年、8 年～10 年、8 年～9 年、または 9 年～10 年である。

【0866】

これらの方法のいくつかの実施形態では、対象の年齢は、約 30～約 35、約 35～約 40、約 40～約 45、約 45～約 50、約 50～約 55、約 55～約 60、約 60～約 65、約 65～約 70、約 70～約 75、約 75～約 80、約 80～約 85、約 85～約 90、約 90～約 95、約 95～約 100、約 100～約 105、約 105～約 110、約 110～約 115、または約 115～約 120 である。

【0867】

対象において肥満の治療を支援する方法

ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる肥満の治療の支援を必要とする対象において肥満の治療を支援する方法であって、当該対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のNK細胞活性化物質（複数可）のうちのいずれか）を投与することを含む、方法が、本明細書に提供される。

【0868】

ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる肥満の治療の支援を必要とする対象において肥満の治療を支援する方法であって、当該対象に、治療有効量の活性化されたNK細胞（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の活性化されたNK細胞のうちのいずれか）を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。

【0869】

これらの方法のいくつかの実施形態は、休止NK細胞を得ることと、1つ以上の休止NK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化されたNK細胞の生成をもたらす、接触させることをさらに含む。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られた自己NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、対象から得られたハプロタイプ一致のNK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、同種異系の休止NK細胞である。これらの方法のいくつかの例では、休止NK細胞は、人工NK細胞である。これらの方法のいずれかのいくつかの例では、休止NK細胞は、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である。

【0870】

これらの方法のいくつかの例では、液体培養培地は、無血清液体培養培地である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、液体培養培地は、化学的に定義された液体培養培地である。これらの方法のいくつかの例は、活性化されたNK細胞を単離すること（および、活性化されたNK細胞の治療有効量を、対象、例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれかにさらに投与すること）をさらに含む。これらの方法のいくつかの実施形態では、接触ステップは、約2時間～約20日（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか）の期間にわたって実施される。

【0871】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の質量における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象の質量と比較して）。

【0872】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間のうちのいずれか）にわたる対象の肥満度指数（BMI）における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%

%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか）をもたらす（例えば、治療前の対象のBMIと比較して）。

【0873】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、対象における前糖尿病から2型糖尿病への進行速度における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、前糖尿病から2型糖尿病への進行速度、または治療を受けていない同様の対象における前糖尿病から2型糖尿病への進行速度と比較して）。

10

【0874】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、対象における空腹時血清グルコース値における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象における空腹時血清グルコース値と比較して）。

20

【0875】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、対象におけるインスリン感受性における増加（例えば、少なくとも5%の増加、少なくとも10%の増加、少なくとも15%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも25%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも35%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも45%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも55%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも65%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも75%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも85%の増加、少なくとも90%の増加、少なくとも95%の増加、または少なくとも99%の増加、または約10%増加～約500%増加（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象におけるインスリン感受性と比較して）。

30

【0876】

これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法は、対象におけるアテローム性動脈硬化症の重症度における減少（例えば、少なくとも5%の減少、少なくとも10%の減少、少なくとも15%の減少、少なくとも20%の減少、少なくとも25%の減少、少なくとも30%の減少、少なくとも35%の減少、少なくとも40%の減少、少なくとも45%の減少、少なくとも50%の減少、少なくとも55%の減少、少なくとも60%の減少、少なくとも65%の減少、少なくとも70%の減少、少なくとも75%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも85%の減少、少なくとも90%の減少、または少なくとも95%の減少、または約5%減少～約99%減少（または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか））をもたらす（例えば、治療前の対象におけるアテローム性動脈硬化症の重症度と比較して）。

40

【0877】

これらの方法のいくつかの実施形態では、ある期間（例えば、本明細書に記載の期間の

50

うちのいずれか) にわたる対象の肥満の治療は、例えば、体重および／または体の寸法、総体脂肪、全身性または局所肥満症、および肥満度指数 (BMI) の測定を含む、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法によって評価することができる。

【0878】

これらの方法のいくつかの実施形態では、対象の治療に対する反応は、標準的な技術に従って空腹時血糖値またはグルコース耐性を決定することによって監視することができる。これらの方法のいくつかの実施形態では、インスリン感受性は、高インスリン正常血糖クランプおよび静脈グルコース耐性試験、ホメオスタシスモデル評価 (HOMA)、および定量的インスリン感受性チェックインデックス (QUICKI) を含む、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法を使用して測定することができる。

10

【0879】

これらの方法のいくつかの実施形態では、対象におけるアテローム性動脈硬化症の重症度は、心臓カテーテル検査、ドップラー超音波検査、血圧比較、MUGA／放射性核種血管造影、タリウム／心筋灌流スキャン、およびコンピュータ断層撮影を含む、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知の任意の方法を使用して測定することができる。

【0880】

これらの方法のいくつかの実施形態では、ある期間は、1 カ月～10 年 (または本明細書に記載のこの範囲の部分範囲のうちのいずれか) である。

【0881】

これらの方法のいくつかの実施形態では、対象の年齢範囲は、約1～約5、約5～約10、約10～約15、約15～約20、約20～約25、約25～約30、約30～約35、約35～約40、約40～約45、約45～約50、約50～約55、約55～約60、約60～約65、約65～約70、約70～約75、約75～約80、約80～約85、約85～約90、約90～約95、約95～約100、約100～約105、約105～約110、約110～約115、または約115～約120である。

20

【0882】

追加の治療薬

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態は、1つ以上の追加の治療薬の治療有効量を対象 (例えば、本明細書に記載の対象のうちのいずれか) に投与することをさらに含み得る。1つ以上の追加の治療薬は、NK細胞活性化物質 (複数可) または活性化されたNK細胞と実質的に同時に対象に投与され得る (例えば、単一製剤としてまたは2つ以上の製剤として対象に投与され得る)。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の治療薬は、NK細胞活性化物質 (複数可) または活性化されたNK細胞を投与する前に、対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の治療薬は、NK細胞活性化物質 (複数可) または活性化されたNK細胞を対象に投与した後に、対象に投与され得る。

30

【0883】

追加の治療薬の非限定的な例には、抗がん剤、活性化受容体アゴニスト、免疫チェックポイント阻害剤、HLA特異的阻害受容体を遮断するための薬剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ (GSK) 3 阻害剤、および抗体が挙げられる。

40

【0884】

抗がん剤の非限定的な例には、代謝拮抗薬 (例えば、5-フルオロウラシル (5-FU)、6-メルカプトプリン (6-MP)、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシカルバミド、メトトレキサート、6-チオグアニン、クラドリビン、ネララビン、ペントスタチン、またはペメトレキセド)、植物アルカロイド (例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、カンプトセシン、9-メトキシカンプトセシン、コロナリジン、タキソール、ナウクレアオラル (nucleal oral)、ジプレニル化インドールアルカロイド、モンタミン、シシュキニイン、プロトベルベリン、ベルベリン、サンギナリン、ケレリトリン、ケリドニン、リリオデニン、クリボリン、β-カルボリン、アントフィン、チロホリン、クリプトレピン、ネオ

50

クリプトレピン、コリノリン、サンパンギン、カルバゾール、クリナミン、モンタニン、エリプチシン、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド、テニポシド、イリノテカン、トポテカン、またはアクリドンアルカロイド)、プロテアソーム阻害剤(例えば、ラクタシスチン、ジスルフィラム、エピガロカテキン-3-ガラート、マリゾミブ(サリノスポラミドA)、オプロゾミブ(ONX-0912)、デランゾミブ(CEP-18770)、エポキシミシン、MG132、ベーターヒドロキシベーターメチルブチラート、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、またはイキサゾミブ)、抗腫瘍抗生物質(例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、イダルビシン、アクチノマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、またはブレオマイシン)、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤(例えば、ボリノスタット、パノビノスタット、ギビノスタット、アベキシノスタット、デブシペプチド、エンチノスタット、フェニルブチラート、バルプロ酸、トリコスタチンA、ダシノスタット、モセチノスタット、プラシノスタット、ニコチンアミド、カンビノール、テノビン1、テノビン6、シルチノール、リコリノスタット、テフィノスタット、ケベトリン、キシノスタット、レスミノスタット、タセジナリン、チダミド、またはセリシスタット)、チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、アキシチニブ、ダサチニブ、エンコラフィニブ、エルロチニブ、イマチニブ、ニロチニブ、パゾパニブ、およびスニチニブ)、および化学療法剤(例えば、オールトランスレチノイン酸、アザシチジン、アザチオプリン、ドキシフルリジン、エポチロン、ヒドロキシウレア、イマチニブ、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ベムラフェニブ、およびレナリドミド)が挙げられる。化学療法剤の追加の例には、アルキル化剤、例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、メルファラン、イホスファミド、チオテパ、ヘキサメチルメラミン、ブスルファン、アルトレタミン、プロカルバジン、ダカルバジン、テモゾロミド、カルムスチン、ルムスチン、ストレプトゾシン、カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチンが挙げられる。

【0885】

活性化受容体アゴニストの非限定的な例には、抗CD16抗体(例えば、抗CD16/CD30二重特異性モノクローナル抗体(BiMAb))およびFcベースの融合タンパク質を含む、NK細胞の細胞傷害性を活性化および増強する活性化受容体のための任意のアゴニストが挙げられる。チェックポイント阻害剤の非限定的な例には、抗PD-1抗体(例えば、MED10680)、抗PD-L1抗体(例えば、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、抗PD-L1/CTLA-4二重特異性抗体KN046、抗PD-L1/TGFβRII融合タンパク質M7824、抗PD-L1/TIM-3二重特異性抗体LY3415244、アテゾリズマブ、またはアベルマブ)、抗TIM3抗体(例えば、TSR-022、Sym023、またはMBG453)、および抗CTLA-4抗体(例えば、AGEN1884、MK-1308、または抗CTLA-4/OX40二重特異性抗体ATOR-1015)が挙げられる。HLA特異的阻害受容体を遮断するための薬剤の非限定的な例には、モナリズマブ(例えば、抗HLA-E NKG2A阻害受容体モノクローナル抗体)が挙げられる。GSK3阻害剤の非限定的な例には、チデグルシブまたはCHIR99021が挙げられる。追加の治療薬として使用され得る抗体の非限定的な例には、抗CD26抗体(例えば、YS110)、抗CD36抗体、およびNK細胞上のFc受容体(例えば、CD16)に結合して活性化することができる任意の他の抗体または抗体構築物が挙げられる。いくつかの実施形態では、追加の治療薬は、インスリンまたはメトホルミンであり得る。

【実施例】

【0886】

本発明は、以下の実施例にさらに記載されており、これらは、特許請求の範囲に記載の本発明の範囲を限定しない。

【0887】

実施例1：多鎖ポリペプチドを使用したC57BL/6マウスにおける免疫刺激

材料および方法

第1のポリペプチドが、2つのTGFβRIIドメイン、ヒト組織因子219断片、およびヒトIL-15の可溶性融合物であり、第2のポリペプチドが、2つのTGFβRIIドメインおよびヒトIL-15Rα鎖のsushiドメインの可溶性融合物である、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む例示的な多鎖ポリペプチド（本明細書に記載のタイプA多鎖ポリペプチド）が、生成された。

【0888】

結果

C57BL/6マウスにおける免疫刺激

野生型C57BL/6マウスを、それぞれ、対照PBS溶液または0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、もしくは10mg/kgの投薬量の多鎖ポリペプチドのいずれかで皮下処理した。処理の4日後、脾臓の重量および脾臓に存在する様々な免疫細胞型のパーセンテージを評価した。具体的には、単一の脾細胞懸濁液を生成し、抗CD4、抗CD8、抗NK1.1、および抗CD19を含む蛍光色素結合抗体で染色した。対照処理マウスおよび多鎖ポリペプチドのいずれかで処理されたマウスの脾臓に存在するCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびCD19⁺ B細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーを使用して評価した。図1Aに示されるように、多鎖ポリペプチドで処理されたマウスにおける脾臓の重量は、多鎖ポリペプチドの投薬量の増加とともに増加した。さらに、1mg/kg、3mg/kg、および10mg/kgの多鎖ポリペプチドで処理したマウスにおける脾臓の重量は、それぞれ、対照溶液で処理したマウスと比較して著しく高かった。図1Bに示されるように、多鎖ポリペプチドで処理したマウスの脾臓では、CD8⁺ T細胞およびNK細胞の両方のパーセンテージが、多鎖ポリペプチドの投薬量の増加とともに増加した。具体的には、CD8⁺ T細胞のパーセンテージは、対照処理マウスと比較して、0.3mg/kg、3mg/kg、および10mg/kgの多鎖ポリペプチドで処理したマウスで高く、NK細胞のパーセンテージは、対照処理マウスと比較して、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、および10mg/kgの多鎖ポリペプチドで処理したマウスで高かった。これらの結果は、例示的な多鎖ポリペプチドが、脾臓中の免疫細胞、特にCD8⁺ T細胞およびNK細胞を刺激することができることを示す。

【0889】

薬物動態

例示的な多鎖ポリペプチドの薬物動態を、野生型C57BL/6マウスで評価した。マウスを、3mg/kgの投薬量の多鎖ポリペプチドで皮下処理した。血液を様々な時点で尾静脈から採血し、血清を調製した。血清中の多鎖ポリペプチドの濃度は、ELISAで決定した。簡潔には、多鎖ポリペプチドを、抗ヒト組織因子抗体を使用して捕捉し、ビオチン化抗ヒトTGFβ受容体、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン、およびABTS基質を使用して検出した。結果は、例示的な多鎖ポリペプチドの半減期が12.66時間であることを示した。

【0890】

C57BL/6マウスにおける経時的な免疫刺激

多鎖ポリペプチドによる免疫刺激の効果を経時的に評価するために、マウスを、3mg/kgの多鎖ポリペプチドの単回投与で処理し、脾臓の重量および脾臓に存在する免疫細胞型のパーセンテージを、上記の技術を使用して、処理直後に、および処理後16、24、48、72、および92時間時点で評価した。図2Aに示されるように、多鎖ポリペプチドで処理したマウスの脾臓重量は、処理後48時間時点で増加し、44時間にわたって増加し続けた。さらに、図2Bに示されるように、多鎖ポリペプチドで処理したマウスの脾臓重量では、CD8⁺ T細胞とNK細胞のパーセンテージは両方とも、処理後48時間時点で増加し、さらに44時間にわたって増加し続けた。これらの結果は、例示的な多鎖ポリペプチドが、脾臓の免疫細胞、特にCD8⁺ T細胞およびNK細胞を経時的に刺激することができることをさらに示す。

【0891】

CD8⁺ T細胞およびNK細胞による増殖およびグランザイムB発現の増加

多鎖ポリペプチドによって誘導される免疫細胞の増殖および細胞傷害性の可能性を評価するために、マウスを、3mg/kgの多鎖ポリペプチドの単回投与で処理し、これらのマウスの脾臓を、処理直後に、および処理後16、24、48、72、および92時間時点で評価した。簡潔には、単一の脾細胞懸濁液を生成し、抗CD4、抗CD8、抗NK1.1、および抗CD19を含む様々な細胞型の蛍光色素標識抗体、ならびに抗Ki67抗体（すなわち、細胞増殖マーカー）および抗グランザイムB抗体（すなわち、細胞傷害性マーカー）で染色した。各免疫細胞型のKi67およびグランザイムBの平均蛍光強度（MFI）を、フローサイトメトリーによって分析した。図3Aおよび3Bに示されるように、NK細胞によるKi67およびグランザイムBの発現は、処理直後（0時間）と比較して、24時間およびその後に評価された各時点で増加を示した。さらに、CD8⁺ T細胞によるKi67およびグランザイムBの発現は、処理直後（0時間）と比較して、48時間およびその後に評価された各時点で増加を示した。このように、多鎖ポリペプチドの単回投与は、処理後少なくとも4日間、CD8⁺ T細胞およびNK細胞の増殖をもたらしした。

10

【0892】

これらの結果は、多鎖ポリペプチドがCD8⁺ T細胞およびNK細胞の数を増加させるのみならず、これらの細胞の細胞傷害性も増強することを示す。

【0893】

腫瘍細胞に対する細胞傷害性

次に、腫瘍細胞に対する多鎖ポリペプチドによって活性化された脾細胞の細胞傷害性を、C57BL/6マウスにおいて評価した。マウスモロニー白血病細胞（Yac-1）を、CellTrace Violetで標識し、腫瘍標的細胞として使用した。C57BL/6マウスを、3mg/kgの多鎖ポリペプチドの単回投与で処理し、脾細胞をその後様々な時点で調製し、エフェクター細胞として使用した。標的腫瘍細胞をエフェクター細胞とエフェクター：標的（E：T）比10：1で混合し、37℃で20時間インキュベートした。フローサイトメトリーを使用したヨウ化プロピジウム（PI）陽性のバイオレット標識Yac-1細胞の分析により、標的細胞の生存率を評価した。Yac-1腫瘍阻害のパーセンテージを、次の式を使用して計算した。

20

Yac-1腫瘍阻害のパーセンテージ = (1 - 実験試料中の生存Yac-1細胞数 / 脾細胞を含まない試料中の生存Yac-1細胞数) × 100

30

【0894】

図4に示されるように、多鎖ポリペプチドで24時間以上処理した後のマウスの脾細胞は、未処理のマウスの脾細胞と比較して、Yac-1細胞に対する細胞傷害性の増加を示した。

【0895】

実施例2：高脂肪食ベースの2型糖尿病マウスモデルを使用したC57BL/6マウスにおける免疫刺激

材料および方法

TGFRt15-TGFRは、可溶性ヒトTGFβRII二量体（aa24-159）である2つのTGFβ結合ドメインを含む多鎖キメラポリペプチド（本明細書に記載のタイプA多鎖キメラポリペプチド）である。21t15-TGFRは、IL-21およびTGFβ結合ドメインを含む多鎖キメラポリペプチド（本明細書に記載のタイプA多鎖キメラポリペプチド）である。3t28は、2つのIL-2ポリペプチドを含むキメラポリペプチド（本明細書に記載のタイプBキメラポリペプチド）である。

40

【0896】

結果

2型糖尿病の処置におけるTGFRt15-TGFRs、2t2、および21t15-TGFRsの効果を評価するために、高脂肪食ベースの2型糖尿病マウスモデル（The

50

Jackson LaboratoryからのB6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J)を使用した。マウスに、対照食または高脂肪食のいずれかを11週間与えた。高脂肪食を与えたマウスのサブセットも、TGFRt15-TGFRs、2t2、または21t15-TGFRsで処理した。対照食、高脂肪食を与えたマウス、および高脂肪食を与え、かつTGFRt15-TGFRs、2t2、または21t15-TGFRsで処理したマウスを、処理の4日後に評価した。簡潔には、単一の脾細胞懸濁液を生成し、抗CD4、抗CD8、抗NK1.1、および抗CD19を含む蛍光色素結合抗体で染色した。各群におけるマウスの脾臓に存在するCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびCD19⁺ B細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーを使用して評価した。

10

【0897】

図5Aに示されるように、高脂肪食を与えたマウスでは、未処理マウスと比較して、TGFRt15-TGFRsまたは2t2で処理した後、PBMCのNK細胞のパーセンテージが著しく増加したが、21t15-TGFRsで処理した後には増加しなかった。さらに、PBMCのCD8⁺ T細胞のパーセンテージは、未処理マウスと比較して、TGFRt15-TGFRs、2t2、または21t15-TGFRsで処理した後に著しく増加した。さらに、PBMCのCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびCD19⁺ B細胞の増殖も抗Ki67抗体を使用して評価した。図5Bに示されるように、増殖性NK細胞、CD4⁺ T細胞、およびCD8⁺ T細胞の数は、TGFRt15-TGFRsでの処理後に著しく増加したが、2t2または21t15-TGFRsでの処理した後には増加しなかった。

20

【0898】

動物の皮膚および毛髪の外観および質感に対するTGFRt15-TGFRs、2t2、および21t15-TGFRsの効果を調べるために、マウスに、対照または高脂肪食を7週間与え、高脂肪食を与えたマウスのサブセットにもTGFRt15-TGFRs、2t2、または21t15-TGFRsで処理した。処理の1週間後、マウスの外観を評価した。高脂肪食を与え、未処理のマウス、または高脂肪食を与え、21t15-TGFRsで処理したマウスは、毛繕いがなされず、毛が乱れているように見え、対照食を与えたマウスと比較して、白髪/毛髪脱落が増加した(図6A、6B、および6E)。驚いたことに、TGFRt15-TGFRsまたは2t2の処理を受けた高脂肪食を与えたマウスは、TGFRt15-TGFRsまたは2t2の処理を受けなかった高脂肪食を与えたマウス(図6B)と比較して、毛繕いが行われて健康的(白髪/毛髪脱落が少ない)に見えた(図6Cおよび6D)。具体的には、TGFRt15-TGFRsまたは2t2処理マウスは、対照マウスと比較して、優れた皮膚および毛髪の外観および質感を示した。これらの結果は、TGFRt15-TGFRsまたは2t2による処理が、哺乳動物の皮膚および毛髪の外観および質感を改善することを示す。

30

【0899】

次に、マウスに、対照または高脂肪食を9週間与え、高脂肪食を与えたマウスのサブセットを、TGFRt15-TGFRs、2t2、または21t15-TGFRsで処理した。処理の4日後、各群のマウスの空腹時体重を測定した。高脂肪食を与え、未処理のマウス、ならびに高脂肪食を与え、かつ21t15-TGFRsで処理したマウスの空腹時体重は、対照食を与えたマウスと比較して、著しく増加した。しかしながら、高脂肪食を与え、かつTGFRt15-TGFRsまたは2t2で処理したマウスの空腹時体重は、上記の他の2つの高脂肪食群と比較して減少した。研究終了(9週間)時のマウスの空腹時体重を、図7に示す。

40

【0900】

各群のマウスの空腹時グルコース値を評価するために、マウスに、対照食または高脂肪食のいずれかを与え、未処理または44、59、および73日目にTGFRt15-TGFRs、2t2、もしくは21t15-TGFRsで処理した。各群のマウスの空腹時血糖値を、処理の4日後に測定した。図8に示されるように、2回目および3回目の投与後

50

(それぞれ、59日目および73日目)の空腹時血糖値は、高脂肪食を与えたが、未処理のマウス(黄色の線)と比較して、高脂肪食を与え、かつ2t2で処理したマウス(赤色の線)では、著しく低下した。空腹時血糖値は、高脂肪食を与え、かつTGFRt15-TGFRsで処理したマウス(緑色の線)では一定のままであったが、空腹時血糖値は、高脂肪食を与え、かつ21t15-TGFRsで処理したマウス(青色の線)では、上昇した。

【0901】

実施例3：化学療法によって誘導された老化B16F10黒色腫細胞はNKリガンドを発現する

材料および方法

B16F10黒色腫細胞の細胞老化を、細胞をドセタキセル(7.5μM、Sigma)で3日間処理した後、完全培地で4日間回復することによって誘導した。細胞老化は、細胞を老化関連β-ガラクトシダーゼ(SAβ-gal)で染色することによってアクセスされた。簡潔には、B16F10対照および老化細胞(B16F10-SNC)を、PBSで1回洗浄し、0.5%グルタルアルデヒド(PBS(pH7.2))で30分間固定した。細胞を、X-gal溶液(PBS中1mg/mlのX-gal、0.12mMのK₃Fe[CN]₆、0.12mMのK₄Fe[CN]₆、および1mMのMgCl₂(pH6.0))中で、37℃で一晩染色し、Nikon光学顕微鏡を使用して画像化した。

【0902】

結果

B16F10黒色腫細胞の細胞老化は、上記のように化学療法を使用して誘導した。図9Aに示されるように、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞(B16F10-SNC)はSAβ-gal染色に陽性であったが、対照B16F10細胞は、染色されなかった。次に、老化遺伝子の発現を、0日目、またはそれぞれ、4、8、12、16日目の老化誘導後に単離されたRNAを用いたRT-qPCRを使用して分析した。発現レベルは、対照B16F10細胞に対して正規化された。図9B~9Dに示されるように、p21、IL6、およびDPP4の発現は、実験期間中に老化細胞から単離されたRNAでアップレギュレートされた。さらに、図9Eおよび9Fに示されるように、RAT1EおよびULBP1(NK活性化受容体NKG2Dリガンド)の発現も老化細胞で誘導され、最高の発現レベルは16日目であった。これらの結果は、化学療法によって誘導された老化B16F10細胞が、対照B16F10細胞よりも活性化されたNK細胞のより強い細胞傷害性にさらされていることを示す。

【0903】

化学療法によって誘導された老化B16F10黒色腫細胞における幹細胞特性の獲得

化学療法によって誘導された老化B16F10黒色腫細胞が幹細胞の特性を獲得したかどうかを調べるために、コロニー形成アッセイを行った。簡潔には、1000細胞/ウェルを6つのウェルプレートに播種し、培地を3日ごとに交換した。図10A(倍率100倍で撮影した画像)に示されるように、培養5週間後、老化細胞は、コロニーを形成することができた。コロニーによる幹細胞マーカーの発現を評価するために、RNAをコロニーから単離し、Oct4およびNotch4 mRNAの発現をRT-qPCRによって決定した。対照B16F10細胞と比較して、化学療法によって誘導された老化B16F10黒色腫細胞は、がん幹細胞マーカーであるOct4およびNotch4のアップレギュレーションを示した(図10Bおよび10C)。さらに、幹細胞マーカーCD44、CD24、およびCD133の細胞表面発現は、CD44、CD24、およびCD133に対する抗体で染色した後、フローサイトメトリーで評価した。図10D~10Fに示されるように、化学療法によって誘導された老化幹細胞(B16F10-SNC-CSC)では、対照B16F10と比較して、二重陽性集団(CD44⁺CD24⁺、CD44⁺CD133⁺、およびCD24⁺CD133⁺)を増加した。

【0904】

幹細胞特性を有する化学療法によって誘導された老化（CIS）黒色腫細胞は、対照B16F10細胞よりもさらに「移動性」および「浸潤性」である。

幹細胞特性を有する化学療法によって誘導された老化（CIS）黒色腫細胞（B16F10-SNC-CSC）の移動性は、移動アッセイを使用して分析された。簡潔には、対照B16F10細胞およびB16F10-SNC-CSC細胞を、6つのウェルプレートに播種し、p20ピペットチップで傷つけた。細胞の動きを、0、12、および24時間後に画像化した。図11Aに示されるように、幹細胞特性を有する化学療法によって誘導された老化（CIS）黒色腫細胞（B16F10-SNC-CSC）は、対照B16F10細胞と比較して、インビトロ移動アッセイにおいてより移動した。

【0905】

次に、幹細胞特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞（B16F10-SNC-CSC）の浸潤特性を、浸潤アッセイを使用して分析した。浸潤アッセイは、マトリゲルでコーティングされた24ウェルトランスウェル挿入物で実施した。簡潔には、 0.5×10^6 の対照B16F10細胞およびB16F10-SNC-CSC細胞を無血清培地で上部チャンバーに播種し、下部チャンバーに10%FBSを添加した培地を充填した。16時間のインキュベーション後、フィルターの上面の細胞を取り除き、フィルターの下の細胞を固定し、0.02%クリスタルバイオレット溶液で染色した。細胞数を100倍の倍率で3つの視野でカウントした。図11Bおよび11Cに示されるように、幹細胞特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞は、対照B16F10細胞と比較して、マトリゲルコーティングした膜への侵入においてより積極的であった。これらの結果は、化学療法によって誘導された老化B16F10腫瘍細胞がそれらの増殖能力を取り戻し、幹細胞の特性を習得し、転移に対する移動能力および侵襲性を高めたことを示す。

【0906】

幹細胞特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞に対するマウスNK細胞の細胞傷害性活性

インビボでNK細胞を増殖させるために、C57BL/6マウスに、TGFRt15-TGFRs（10mg/kg）を4日間皮下注射した。これらのマウスから脾臓を採取し、MACS Miltenyiカラムを使用してNK細胞を精製した。次に、精製したNK細胞を2t2でインビトロで増殖させた（図12A）。

【0907】

増殖したNK細胞の細胞傷害性を評価するために、化学療法によって誘導された老化幹細胞（B16F10-SNC-CSC）または対照B16F10細胞を、CellTrace violetで標識し、インビトロで活性化した2t2マウスNK細胞（10mg/kgのTGFRt15-TGFRsを4日間注射したC57BL/6の脾臓から分離）と様々なE:T比で16時間インキュベートした。B16F10-SNC-CSCおよび対照B16F10細胞をトリプシン処理し、洗浄し、ヨウ化プロピジウム（PI）溶液を含む完全培地に再懸濁し、フローサイトメトリーで細胞傷害性によってアクセスした。図12Bに示されるように、NK細胞は、対照B16F10細胞と比較して、幹細胞特性を有する化学療法によって誘導された老化細胞（B16F10-SNC-CSC）を死滅させるのにより効果的であった。

【0908】

黒色腫マウスモデルにおける併用療法

黒色腫の処理におけるTGFRt15-TGFRsの効果、マウス黒色腫モデルで評価した。簡潔には、 5×10^5 B16F10細胞を、C57BL/6マウスに皮下注射した。腫瘍体積が約100mm³に達したとき、マウスをドセタキセル（化学療法）（5mg/kg）またはTA99（200μg）の単剤または3日ごとの組み合わせ、およびTGFRt15-TGFR（3mg/kg）は週に1回施した（図13A）。生理食塩水、ドセタキセル（化学療法）/TA99のみ、またはTGFRt15-TGFRsのみを施したマウスを対照として使用した。各実験群および対照群で5匹のマウスを試験した。腫瘍体積は、3日ごとに測定した。図13Bおよび13Cに示されるように、TGFRt

10

20

30

40

50

15-TGFRsと化学療法またはTA99の組み合わせは、同系黒色腫マウスモデルにおいて、生理食塩水で処理したマウスまたは化学療法またはTA99のみで処理したマウスと比較して腫瘍の進行を遅らせた。

【0909】

実施例4：ヒト膵臓細胞株SW1990における老化の化学療法的誘導

材料および方法

β-ガラクトシダーゼ染色：化学療法によって誘導された老化の確認は、市販のキット（Cell Signaling Technology）を製造業者の指示に従って使用し、pH6.0で標準的なβ-ガラクトシダーゼ染色を行った。翌日、染色液を除去し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、70%グリセロールをウェルに添加した。β-ガラクトシダーゼ陽性細胞は、青色に染色されるが、対照未処理細胞は染色されない。

10

【0910】

フローサイトメトリー：100万個の対照細胞および老化細胞を得て、製造業者の指示に従って、抗CD44抗体および抗CD24抗体（Biolegend）などの幹細胞の表面マーカーに対する市販の抗体を使用して染色した。その後、細胞を洗浄し、BD Celestaフローサイトメーターを使用して分析した。幹細胞様特性を示す細胞は、CD44とCD24の両方に対して二重に陽性になる。

【0911】

遺伝子発現アッセイ：100万個の対照細胞および老化細胞を得て、Trizol（ThermoFisher）を使用して溶解した後、RNA分離キット（Qiagen）を使用してRNAを精製した。Qiagen cDNA Quantitectキットを使用してRNAを定量し、cDNAに変換した。その後、cDNAを標準的なTaqman遺伝子発現アッセイ（ThermoFisher）のテンプレートとして使用して、老化した幹細胞マーカーおよびNKリガンドの相対的な存在量を定量化した。

20

【0912】

NK細胞細胞傷害性アッセイ：NK細胞は、市販のNK分離キット（幹細胞）を使用して健康なヒトドナー（n=2）から単離し、サイトカイン融合分子18t15-12s（100nM）を使用して一晩活性化させた。翌日、NK細胞を洗浄してサイトカイン分子を除去し、CellTrace Violet標識対照未処理腫瘍細胞または化学療法によって誘導された老化腫瘍細胞のいずれかとE:T比4:1で20時間混合した。翌日、細胞をトリプシン処理し、フローサイトメトリーを使用して各ウェルの完全な内容物を分析し、細胞の阻害率を分析した。

30

【0913】

結果

化学療法薬アブラキサン（Celgene）およびゲムシタビン（Sigma Aldrich）で2.5μMおよび6.25μMで3日間処理することにより、それぞれ、ヒト膵臓腫瘍細胞株SW1990の老化を誘導した。未処理のSW1990細胞を、対照として使用した。3日後に培地を交換し、細胞を培養培地に4日間静置した。図14に示されるように、化学療法薬で処理された老化細胞は、β-ガラクトシダーゼ染色（青色）に陽性であったが、対照細胞は染色されなかった。老化細胞および対照細胞は、治療後4日、11日、および22日で老化および幹細胞マーカーの発現について評価された。図14に示されるように、老化細胞は、対照細胞と比較して、CD44およびCD24の二重陽性染色の増加を経時的に示した。さらに、化学療法によって誘導された老化SW1990細胞は、DPP4、IL6、およびp21を含む老化マーカー、Oct3/4、CD24、およびCD44を含む幹細胞マーカー、ならびに上記の遺伝子発現アッセイを使用した処理後0日目、ならびに2、4、および24日目にネクチンおよびMICAを含むNKリガンドの発現についても分析された。図15に示されるように、言及された全てのマーカーの発現は、増加を経時的に示した。

40

【0914】

インビトロで活性化されたヒトNK細胞の細胞傷害性

50

インビトロで活性化されたヒトNK細胞（18t15-12sで処理）の細胞傷害性を評価するために、化学療法薬アブラキサン（Celgene）およびゲムシタビン（Sigma Aldrich）で2.5 μMおよび6.25 μMで3日間処理することにより、それぞれ、ヒト膀胱腫瘍細胞株SW1990の老化を誘導した。未処理のSW1990細胞を、対照として使用した。3日後に培地を交換し、細胞を培養培地に30日間静置した。培養培地は、4日ごとに交換した。活性化されたNK細胞が得られ、化学療法によって誘導された老化腫瘍細胞および未処理の対照腫瘍細胞に対するそれらの細胞傷害性が、上記のNK細胞細胞傷害性アッセイを使用して評価された。図16に示されるように、活性化されたNK細胞は、対照SW1990細胞（SW1990）および老化SW1990細胞（SW1990s）の両方に対して細胞傷害性の増加を示した。

10

【0915】

実施例5：IL-12／IL-15RαSu DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-12／IL-15RαSu DNA構築物を作製した（図17）。ヒトIL-12サブユニット配列、ヒトIL-15RαSu配列、ヒトIL-15配列、ヒト組織因子219配列、およびヒトIL-18配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。GS（3）リンカーを用いてIL-12サブユニットベータ（p40）をIL-12サブユニットアルファ（p35）に結合してIL-12の一本鎖バージョンを生成し、その後、IL-12配列をIL-15RαSu配列に直接結合することによってDNA構築物を作製した。最終IL-12／IL-15RαSu DNA構築物配列をGenewizによって合成した。

20

【0916】

IL12／IL-15RαSu構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号181）。

（シグナルペプチド）

ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTTCCTCTTT
AGCAGCGCCTACTCC

（ヒトIL-12サブユニットベータ（p40））

ATTTGGGAACCTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCTGAACCTG
GACTGGTATCCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGTCTCA
CTTGTTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCTT
CGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCTTC
ACAATCCAAGTTAAGGAGTTCTGGAGACGCTGGCCAATACA
CATGCCACAAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCTCTTATT
ATTATTACACAAGAAGGAAGACGGGAATCTGGTCCACCGAC
ATTTTAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTT
TAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCTGTTTCACTTG
TTGGTGGCTGACCAACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCC
GTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCTCAAGGTGTGA
CATGTGGAGCCGCTACCTCTCAGCGCTGAGAGGGTTCTGTGG
CGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGTCCAAGAA
GATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTG
AGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAACTCAAGTACGAGAA
CTACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCC
GATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATA
GCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTG
GAGCACACCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTG
CAAGTTCAAGGTAAAGCAAGCGGGAGAAAGAACCGGG
TGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCACTGTCTGGAA
GAACGCCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTAC

30

40

50

TCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCCTTGTTCC

(リンカー)

GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGA
GGATCT

(ヒトIL-12サブユニットアルファ (p35))

CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTTC
CCTTGTTTACACACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGA
GCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAATTTTA
CCCTTGCAACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCC
AAGGACAAGACATCCACCGGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGG
AGCTGACAAAGAACGAGTCTTGCTCTCAACTCTCGTGAAAC
CAGCTTCAATCAAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAG
ACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACG
AGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAA
CGCCAAGCTGCTCATGGACCCCTAAACGGCAGATCTTTTTTA
GACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAG
CTTTAAACTTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTC
CCTCGAGGAGCCCGATTTTTTACAAGACAAAGATCAAACCTG
TGCATTTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGGCCGTGACCA
TTGACCGGGTCAATGAGCTATTTAAACGCCAGC

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG

【0917】

実施例6：IL-18／TF／IL-15 DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-18配列を組織因子219のN末端コーディング領域に結合し、IL-18／TF構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによってIL-18／TF／IL-15構築物を作製した(図18)。Genewizによって合成したIL-18／TF／IL-15構築物の核酸配列(リーダー配列を含む)は、以下の通りである(配列番号177)。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTCAATTTATCTCTTTACTGTTTCCTCTTC
TCCAGCGCCTACAGC

(ヒトIL-18)

TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGG
AATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACC
GGCCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGA
CAATGCCCCCCCGGACCATCTTCAATTATCTCCATGTACAAG
GACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGA
AGTGTTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAAGAT
CATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAG
GACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGC
CCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTTGAATCCTCCTCCTA
CGAGGGGCTACTTTTTTAGCTTGTTGAAAAGGAGAGGGATTTA
TTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGGCGATC
GTTCCATCATGTTTCAACCGTCCAAAACGAGGAT

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAA AACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGC GATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTAAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAAC TACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTG CATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAA
TCATTTT TAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC _

【0918】

実施例7：IL-12／IL-15 R α S μ 融合タンパク質およびIL-18／TF／IL-15 融合タンパク質の分泌

IL-12／IL-15 R α S μ DNA構築物およびIL-18／TF／IL-15 DNA構築物をpMSGV-1修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし（参照により本明細書に組み込まれる、Hughes, Hum Gene Ther 16:457-72, 2005に記載のもの）、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-18／TF／IL-15：IL-12／IL-15 R α S μ タンパク質複合体（18t15-12sと称する、図19および図20）の形成および分泌が可能になった。18t15-12sタンパク質を、抗TF抗体親和性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを使用してCHO-K1細胞培養上清から精製し、IL-12／IL-15 R α S μ 融合タンパク質およびIL-18／TF／IL-15融合タンパク質からなる可溶性（非凝集）タンパク質複合体を得た。

【0919】

IL12／IL-15 R α S μ 融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号180）。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFS SAYS

(ヒトIL-12サブユニットベータ (p40))

IWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTP EEDG I TWT
LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSL
LL LHKKE DGIWSTD I LKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFT

CWWLT TISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
R GDNKEYEYSVECEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT
WSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR
KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

(リンカー)

GGGGS GGGGS GGGGS

(ヒトIL-12サブユニットアルファ (p35))

RNLPVATPDPGMFPC LHH SQNLLRAVSNMLQKARQTL
EF YPCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE
TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM
NAKLLMDPKRQIFLDQNM L AVIDELMQALNFNSETVPQKS
SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R

【0920】

IL-18／TF／IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は、以下の通りである(配列番号176)。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ヒトIL-18)

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCR
DNAPRTIFIISMYSKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENK
IISFKEMNPPDNIKDTKSDIIF FQRSVPGH DNKMQFESS
YEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYT T DTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

【0921】

ある場合には、リーダー(シグナル配列)ペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【0922】

実施例8：免疫親和性クロマトグラフィーによる18t15-12sの精製

抗TF抗体親和性カラムをGE Healthcare(商標)AKTA Avantタンパク質精製システムに接続した。流速は、2mL／分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL／分であった。

【0923】

18t15-12sの細胞培養収集物を1Mトリス塩基でpH7.4に調整し、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。280nmでの吸光度を収集し、その後、1Mトリス塩基の添加に

10

20

30

40

50

より、試料をpH7.5～8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon（登録商標）遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図21は、18t15-12s複合体が抗TF抗体親和性カラムに結合することを示しており、ここで、TFは、18t15-12s結合パートナーである。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2～8℃で保管する。

【0924】

各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン（pH2.5）を使用してストリッピングした。その後、カラムを、10カラム体積のPBS、0.05%アジ化ナトリウムを使用して中和し、2～8℃で保管した。

【0925】

実施例9：18t15-12sのサイズ排除クロマトグラフィー

GE Healthcare Superdex（登録商標）200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラムを、GE Healthcare AKTA（商標）Avantタンパク質精製システムに接続した。カラムを2カラム体積のPBSで平衡化した。流速は0.8mL/分であった。キャピラリーループを使用して、1mg/mLの18t15-12s複合体200μLをカラムに注入した。注入を1.25カラム体積のPBSで追跡した。SECクロマトグラフを図22に示す。恐らく18t15-12s二量体または凝集体のグリコシル化程度が異なるため、マイナーな高分子量ピークとともに主要な18t15-12sタンパク質ピークが存在する。

【0926】

実施例10：18t15-12sのSDS-PAGE

純度およびタンパク質分子量を決定するために、精製した18t15-12sタンパク質試料を、4～12%NuPageビスートリスタンパク質ゲルSDS-PAGEを使用して分析した。ゲルをInstantBlue（商標）で約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。図23は、抗TF抗体親和性精製18t15-12sのSDSゲルの例を示しており、予想された分子量（66kDaおよび56kDa）にバンドがある。

【0927】

実施例11：CHO-K1細胞における18t15-12sのグリコシル化

CHO-K1細胞における18t15-12sのグリコシル化を、Protein Deglycosylation Mix IIキット（New England Biolabs）を製造業者の指示に従って使用して確認した。図24は、脱グリコシル化および非脱グリコシル化18t15-12sのSDS-PAGEの例を示す。図24のレーン4に見られるように、脱グリコシル化により18t15-12sの分子量が減少する。

【0928】

実施例12：18t15-12s複合体の組換えタンパク質定量

18t15-12s複合体を、標準のサンドイッチELISA法を使用して検出および定量化した（図25～28）。抗ヒト組織因子抗体が捕捉抗体として機能し、ビオチン化抗ヒトIL-12、IL-15、またはIL-18抗体（BAF 219、BAM 247、D045-6、全てR&D Systems）が検出抗体として機能した。精製した18t15-12sタンパク質複合体の組織因子も、抗ヒト組織因子捕捉抗体（I43）および抗ヒト組織因子抗体検出を使用して検出した。I43/抗TF抗体ELISAを、同様の濃度の精製組織因子と比較した。

【0929】

実施例13：18t15-12s複合体の免疫刺激能力

18t15-12s複合体のIL-15免疫刺激活性を評価するために、増加濃度の18t15-12sを200μLのIMDM：10%FBS培地中の32Dβ細胞（104細胞/ウェル）に添加した。32Dβ細胞を37℃で3日間インキュベートした。4日目に、WST-1増殖試薬（10μL/ウェル）を添加し、4時間後、吸光度を450nmで測定して、WST-1の可溶性ホルマゼン色素への切断に基づいて細胞増殖を測定した

10

20

30

40

50

。ヒト組換えIL-15の生物活性を陽性対照として評価した。図29に示されるように、18t15-12sは、32Dβ細胞のIL-15依存性細胞増殖を示した。18t15-12s複合体は、恐らくIL-18および組織因子のIL-15ドメインへの結合のため、ヒト組換えIL-15と比較して低下した活性を示した。

【0930】

18t15-12s複合体におけるIL-12およびIL-18の個々の活性を評価するために、18t15-12sを、200μLのIMDM:10%熱不活性化FBS培地中のHEK-Blue IL-12およびHEK-Blue IL-18レポーター細胞に添加した(5×10⁴細胞/ウェル、hkb-il12およびhkb-hmil18、InvivoGen)。細胞を37℃で一晩インキュベートした。20μLの誘導されたHEK-Blue IL-12およびHEK-Blue IL-18レポーター細胞上清を180μLのQUANTI-Blue (InvivoGen)に添加し、37℃で1~3時間インキュベートした。IL-12またはIL-18活性を、吸光度を620nmで測定することによって評価した。ヒト組換えIL-12またはIL-18を陽性または陰性対照として評価した。図30および図31に示されるように、18t15-12s複合体のサイトカインドメインは各々、特定の生物学的活性を保持する。18t15-12sの活性は、恐らくIL-15および組織因子のIL-18ドメインへの結合、およびIL-12のIL-15Rαsushiドメインへの結合のため、ヒト組換えIL-18またはIL-12の活性と比較して低下した。

【0931】

実施例14: 18t15-12s複合体によるサイトカイン誘導性メモリー様NK細胞の誘導

サイトカイン誘導性メモリー様NK細胞を、精製NK細胞を飽和量のIL-12(10ng/mL)、IL-15(50ng/mL)、およびIL-18(50ng/mL)で一晩刺激した後にエクスピボで誘導することができる。これらのメモリー様特性は、IL-2受容体α(IL-2Rα、CD25)、CD69(および他の活性化マーカー)の発現、およびIFN-γ産生の増加により測定されている。サイトカイン誘導性メモリー様NK細胞の生成を促進する18t15-12s複合体の能力を評価するために、精製ヒトNK細胞(95%超のCD56+)を、0.01nM~10000nMの18t15-12s複合体または個々のサイトカインの組み合わせ(組換えIL-12(10ng/mL)、IL-18(50ng/mL)、およびIL-15(50ng/mL))で14~18時間刺激した。細胞表面CD25およびCD69発現および細胞内IFN-γレベルを、抗体染色およびフローサイトメトリーによって評価した。

【0932】

新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56+ NK細胞を、RosetteSep/ヒトNK細胞試薬(StemCell Technologies)を使用して単離した。NK細胞の純度は70%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特異的抗体(BioLegend)で染色することにより確認した。細胞をカウントし、0.2mLの完全培地(RPMI 1640(Gibco)、2mMのL-グルタミン(Thermo Life Technologies)、ペニシリン(Thermo Life Technologies)、および10%FBS(Hyclone)を補充)中の96ウェル平底プレートに0.2×10⁶/mLで再懸濁した。細胞を、サイトカインhIL-12(10ng/mL)(BioLegend)、hIL-18(50ng/mL)(R&D Systems)、およびhIL-15(50ng/mL)(NCI)の混合物、または0.01nM~10000nMの18t15-12sのいずれかで、37℃、5%CO₂で14~18時間刺激した。その後、細胞を収集し、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特異的抗体(BioLegend)で30分間表面染色した。染色後、細胞を、FACS緩衝液(1X PBS(Hyclone)、0.5%BS

A (EMD Millipore) および 0.001% アジ化ナトリウム (Sigma) を含む) 中で洗浄した (1500 RPM、室温で 5 分間)。2 回洗浄した後、細胞を、BD FACSCelesta (商標) フローサイトメーターを使用して分析した (プロットされたデーター平均蛍光強度、図 32A および図 32B)。

【0933】

新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56+ NK 細胞を、RosetteSep/ヒト NK 細胞試薬 (StemCell Technologies) を使用して単離した。NK 細胞の純度は 70% 超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750 特異的抗体 (BioLegend) で染色することにより確認した。細胞をカウントし、0.2 mL の完全培地 (RPMI 1640 (Gibco)、2 mM の L-グルタミン (Thermo Life Technologies)、ペニシリン (Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン (Thermo Life Technologies)、および 10% FBS (Hyclone) を補充) 中の 96 ウェル平底プレートに 0.2×10^6 /mL で再懸濁した。細胞を、hIL-12 (10 ng/mL) (BioLegend)、hIL-18 (50 ng/mL) (R&D)、および hIL-15 (50 ng/mL) (NCI) のサイトカイン混合物、または 0.01 nM ~ 10000 nM の 18t15-12s 複合体のいずれかで、37°C、5% CO₂ で 14 ~ 18 時間刺激した。その後、細胞を、10 µg/mL のブレフェルジン A (Sigma) および 1X モネンシン (eBioscience) で 4 時間処理し、収集した後、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750 特異的抗体で 30 分間染色した。染色後、細胞を、FACS 緩衝液 (1X PBS (Hyclone)、0.5% BSA (EMD Millipore) および 0.001% アジ化ナトリウム (Sigma) を含む) 中で洗浄し (1500 RPM、室温で 5 分間)、室温で 10 分間固定した。固定後、細胞を 1x 透過処理緩衝液 (eBioscience) 中で洗浄し (1500 RPM、室温で 5 分間)、IFN-γ-PE (BioLegend) で、室温で 30 分間染色した。細胞を 1x 透過処理緩衝液で再度洗浄し、その後、FACS 緩衝液で洗浄した。細胞ペレットを 300 µL の FACS 緩衝液中に再懸濁し、BD FACSCelesta (商標) フローサイトメーターを使用して分析した (IFN-γ 陽性細胞のプロット%、図 33)。

【0934】

実施例 15: ヒト腫瘍細胞に対する NK 細胞のインビトロ細胞傷害性

ヒト骨髄性白血病細胞 K562 (CellTrace violet で標識) を、増加濃度の 18t15-12s 複合体または対照としてのサイトカイン混合物の存在下で、精製ヒト NK 細胞とインキュベートした。20 時間後、培養物を収集し、ヨウ化プロピジウム (PI) で染色し、フローサイトメトリーで評価した。図 34 に示されるように、18t15-12s 複合体は、サイトカイン混合物と同様のまたはそれよりも高いレベルで、K562 に対するヒト NK 細胞傷害性を誘導し、18t15-12s 複合体およびサイトカイン混合物の両方が培地対照よりも高い細胞傷害性を誘導した。

【0935】

実施例 16: IL-12/IL-15 Rα Su/α CD16 scFv DNA 構築物および IL-18/TF/IL-15 DNA 構築物の作製

非限定的な例では、IL-12/IL-15 Rα Su/α CD16 scFv DNA 構築物および IL-18/TF/IL-15 DNA 構築物を作製した (図 35 および図 36)。ヒト IL-12 サブユニット配列、ヒト IL-15 Rα Su 配列、ヒト IL-15 配列、ヒト組織因子 219 配列、およびヒト IL-18 配列を Genewiz によって合成した。GS (3) リンカーを用いて IL-12 サブユニットベータ (p40) を IL-12 サブユニットアルファ (p35) に結合して IL-12 の一本鎖バージョンを生成し、IL-12 配列を IL-15 Rα Su 配列に、かつ IL-12/IL-15 Rα Su 構築物を α CD16 scFv の N 末端コーディング領域に直接結合することによって DNA

構築物を作製した。

【0936】

IL-12/IL-15R α Su/ α CD16scFv構築物の核酸配列は、以下の通りである（配列番号226）。

（シグナルペプチド）

ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTTCCTCTTT
AGCAGCGCCTACTCC

（ヒトIL-12サブユニットベータ（p40））

ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCTGAACTG
GACTGGTATCCCCGATGCTCCCCGGCGAAATGGTGGTGTCTCA
CTTGTTGACACCCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCCT
CGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCCCTC
ACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACA
CATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCTCTTATT
ATTATTACACAAGAAGGAAGACGGGAATCTGGTCCACCGAC
ATTTTAAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTT
TAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCTTTTCACTTG
TTGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCC
GTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCCTCAAGGTGTGA
CATGTGGAGCCGCTACCCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCTGTGG
CGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAA
GATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTG
AGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAACTCAAGTACGAGAA
CTACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCC
GATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATA
GCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTTGGGAATATCCCGACACTTG
GAGCACACCCACAGCTACTTCTCTTTAACCCTTTTGTGTG
CAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGG
TGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCACTGTCTGGAA
GAACGCGCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTAC
TCCAGCAGCTGGTCCGAGTGCGGCCAGCGTGCCCTTGTTC

（リンカー）

GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGA
GGATCT

（ヒトIL-12サブユニットアルファ（p35））

CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTT
CCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGA
GCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTA
CCCTTGCAACAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCAC
AAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGG
AGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAAC
CAGCTTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAG
ACCTCCTTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACG
AGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAA
CGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTAA
GACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAG
CTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAAGTCTC
CCTCGAGGAGCCCGATTTTAAAGACAAAGATCAAACTG
TGCATTTTACTCCACGCTTTAGGATCCGGGGCCGTGACCA
TTGACCGGGTCAATGAGCTATTTAAACGCCAGC

10

20

30

40

50

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

(抗ヒトCD16軽鎖可変ドメイン)

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTG
GGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGA
GGTCCTACTACGCCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCA
GGCTCCTGTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCC
TCCGGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCA
ACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGA
CGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGC
AACCATGTGGTGTTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGG
GCCAT

(リンカー)

GGCGGCGGGCGGCTCCGGAGGCGGGCGGCAGCGGCGGAGGA
GGATCC

(抗ヒトCD16重鎖可変ドメイン)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGG
CCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCT
TCACCTTTCGACGACTACGGCATGTCTCTGGGTGAGGCGAGGC
TCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGG
AACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCA
GGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA
CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTG
TACTACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCTGTTTCGACTACT
GGGGACAGGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGG

【0937】

IL-18配列を組織因子219のN末端コーディング領域に結合し、IL-18／TF構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによっても構築物を作製した(図36)。IL-18／TF／IL-15構築物の核酸配列(リーダー配列を含む)は、以下の通りである(配列番号177)。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTACATTTATCTCTTTACTGTTTCCTCTTC
TCCAGCGCCTACAGC

(ヒトIL-18)

TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGG
AATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACC
GGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGA
CAATGCCCCCCGGACCATCTTCAATTATCTCCATGTACAAG
GACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGTA
AGTGTTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAAGAT
CATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAG
GACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGC
CCGGTCAAGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTA
CGAGGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGGATTTA
TTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATC
GTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGAT

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAAACCAACACAGTCGCTGCCTATAAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACCAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCAACC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGGAATAG
GAAAAGCACCCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGCGCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

10

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

20

【0938】

実施例17：IL-12／IL-15R α Su／ α CD16scFv融合タンパク質およびIL-18／TF／IL-15融合タンパク質の分泌

30

IL-12／IL-15R α Su／ α CD16scFv構築物およびIL-18／TF／IL-15構築物をpMSGV-1修飾レトロウイルス発現ベクター（参照により本明細書に組み込まれる、Hughes, Hum Gene Ther 16:457-72, 2005）にクローニングし、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-18／TF／IL-15：IL-12／IL-15R α Su／ α CD16scFvタンパク質複合体（18t15-12s／ α CD16と称する、図37および図38）の分泌がもたらされた。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-18／TF／IL-15：IL-12／IL-15R α Su／ α CD16scFvタンパク質複合体（18t15-12s／ α CD16と称する、図37および図38）の分泌がもたらされ、これを抗TF抗体親和性および他のクロマトグラフィー法により精製することができる。ある場合には、シグナルペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、成熟形態を生成する。

40

【0939】

IL-12／IL-15R α Su／ α CD16scFv融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号225）。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-12サブユニットベータ (p40))

50

IWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT
LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTKHKGGEVLSHSL
LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFT
CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
GDNKEYEYSVECEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT
WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR
KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

(リンカー)

GGGGSGGGGS

(ヒトIL-12サブユニットアルファ (p35))

RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLF
YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE
TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM
NAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS
SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIR

(抗ヒトCD16軽鎖可変ドメイン)

SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPG
QAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
DEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGT KLT VGH

(リンカー)

GGGGSGGGGS

(抗ヒトCD16重鎖可変ドメイン)

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQA
PGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARGRSL LFDYWGQGT LVT VSR

[0940]

IL-18/TF/IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列(リーダー配列を含む)
は、以下の通りである(配列番号221)。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-18)

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCR
DNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENK
IISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVP GH DNKMQFESS
YEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

10

20

30

40

50

【0941】

実施例18：IL-18／IL-15R α Su DNA構築物およびIL-12／TF／IL-15 DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-18／IL-15R α Su DNA構築物およびIL-12／TF／IL-15 DNA構築物を作製した。ヒトIL-18サブユニット配列、ヒトIL-15R α Su配列、ヒトIL-12配列、ヒト組織因子219配列、およびヒトIL-15配列をGenewizによって合成した。IL-18をIL-15R α Suに直接結合することによってDNA構築物を作製した。IL-12配列をヒト組織因子219形態のN末端コーディング領域に結合し、さらにIL-12／TF構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによって追加の構築物も作製した。上述のように、IL-12の一本鎖バージョン（p40-リンカー-p35）を使用した。

10

【0942】

IL-18／IL-15R α Su構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号320）。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTTCCTCTTC
TCCAGCGCCTACAGC

（ヒトIL-18）

TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGG
AATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACC
GGCCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGA
CAATGCCCCCCCGGACCATCTTCAATTATCTCCATGTACAAG
GACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGA
AGTGTTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAAGAT
CATCTCCTTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAG
GACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGC
CCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTTGAATCCTCCTCCTA
CGAGGGGCTACTTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGGATTTA
TTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATC
GTTCCATCATGTTTCAACCGTCCAAAACGAGGAT

20

30

（ヒトIL-15R α sushiドメイン）

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACACG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGATCCGG

【0943】

IL-12／TF／IL-15構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである（配列番号321）。

（シグナルペプチド）

ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTTCCTCTTT
AGCAGCGCCTACTCC

（ヒトIL-12サブユニットベータ（p40））

ATTTGGGAACCTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCTGAACTG
GACTGGTATCCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGTCTCA
CTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCCT
CGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCCCTC
ACAATCCAAGTTAAGGAGTTTCGGAGACGCTGGCCAATACA
CATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCTTTATT
ATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAAATCTGGTCCACCGAC

40

50

ATTTTAAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTT
TAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCTTTCACTTG
TTGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCC
GTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGA
CATGTGGAGCCGCTACCCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCTGTGG
CGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAA
GATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTG
AGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAA
CTACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCC
GATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATA
GCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTTGGGAATATCCCGACACTTG
GAGCACACCCCAAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTG
CAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGG
TGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCCTCATCTGTCTGGAA
GAACGCGCTCCATCAGCGTGAAGGGCTCAAGATCGTTATTAC
TCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTTC

(リンカー)

GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGA
GGATCT

(ヒトIL-12サブユニットアルファ (p35))

CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTTC
CCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGA
GCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAATTTTA
CCCTTGCAACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCC
AAGGACAAGACATCCACCCTGGAGGCTTGTTTACCTCTGG
AGCTGACAAAGAACGAGTCTTGCTCAACTCTCGTGAAAC
CAGCTTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAG
ACCTCCTTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACG
AGGATTTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAA
CGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTTA
GACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAG
CTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTC
CCTCGAGGAGCCCGATTTTTTACAAGACAAAGATCAAACCTG
TGCAATTTTACTCCACGCTTTTAGGATCCGGGGCCGTGACCA
TTGACCGGGTTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTT

10

20

30

40

50

TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGGAATAG
GAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGGTGGAGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【0944】

実施例19：IL-18／IL-15R α Su融合タンパク質およびIL-12／TF／IL-15融合タンパク質の分泌

IL-18／IL-15R α Su構築物およびIL-12／TF／IL-15構築物をpMSGV-1修飾レトロウイルス発現ベクター（参照により本明細書に組み込まれる、Hughes, Hum Gene Ther 16:457-72, 2005）にクローニングし、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-12／TF／IL-15：IL-18／IL-15R α Suタンパク質複合体（12t15／s18と称する）の分泌がもたらされ、これを抗TF抗体親和性および他のクロマトグラフィー法により精製することができる。

【0945】

IL-18／IL-15R α Su融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号322）。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-18)

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCR
DNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENK
IISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESS
YEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI

【0946】

IL-12／TF／IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである（配列番号323）。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-12サブユニットベータ (p40))

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT
LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYCHKGGEVLSHSL
LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFT
CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
GDNKEYEYSVECEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT
WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR

10

20

30

40

50

K N A S I S V R A Q D R Y Y S S S W S E W A S V P C S

(リンカー)

G G G G S G G G G S G G G G S

(ヒトIL-12サブユニットアルファ (p35))

R N L P V A T P D P G M F P C L H H S Q N L L R A V S N M L Q K A R Q T L E F
Y P C T S E E I D H E D I T K D K T S T V E A C L P L E L T K N E S C L N S R E
T S F I T N G S C L A S R K T S F M M A L C L S S I Y E D L K M Y Q V E F K T M
N A K L L M D P K R Q I F L D Q N M L A V I D E L M Q A L N F N S E T V P Q K S
S L E E P D F Y K T K I K L C I L L H A F R I R A V T I D R V M S Y L N A S

(ヒト組織因子219)

S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S
T K S G D W K S K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P
A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V
G T K V N V T V E D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K
S S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S V Q A V I P S R T V N
R K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E

(ヒトIL-15)

N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A
M K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N
V T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S

【0947】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【0948】

実施例20：18t15-12s16複合体の組換えタンパク質定量

18t15-12s16複合体(IL-12/IL-15R α Su/ α CD16s c Fv; IL-18/TF/IL-15を含む)を、標準のサンドイッチELISA法を使用して検出および定量化した(図39)。抗ヒト組織因子抗体/IL-2または抗TF抗体/IL-18が捕捉抗体として機能し、ビオチン化抗ヒトIL-12またはIL-18抗体(BAF 219、D045-6、いずれもR&D Systems)が検出抗体として機能した。組織因子を、抗ヒト組織因子抗体(I43)および抗ヒト組織因子抗体検出を使用して検出した。

【0949】

実施例21：TGFBRII/IL-15R α Su DNA構築物およびIL-21/TF/IL-15 DNA構築物の作製

非限定的な例では、TGFBRII/IL-15R α Su DNA構築物を作製した(図40)。ヒトTGFBRII二量体配列およびヒトIL-21配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。リンカーを用いてTGFBRIIを別のTGFBRIIに結合してTGFBRIIの一本鎖バージョンを生成し、その後、TGFBRII一本鎖二量体配列をIL-15R α SuのN末端コーディング領域に直接結合することによってDNA構築物を作製した。

【0950】

TGFBRII/IL-15R α Su構築物の核酸配列(シグナル配列を含む)は、以下の通りである(配列番号196)。

(シグナルペプチド)

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C
T C C A G C G C C T A C T C C

(ヒトTGFBRII-第1の断片)

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G
A T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C

10

20

30

40

50

TCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAA
TCAGAAGTCTCTGCATGTCCAACCTGCACGATCACCTCCATC
TGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGA
AAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGA
CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCCTGAT

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGT
GGGAGT

(ヒトTGFβRII-第2の断片)

ATTCCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTGAATAATGACATG
ATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGC
TGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAA
CCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCACAATCACCTCCATC
TGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGA
AGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGA
TCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCC
GCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAGAAGAGAAAAAGAAGCCTG
GCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATG
CAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGC
AACCCCGAC

(ヒトIL-15Rαsushiドメイン)

ATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGAC
ATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGT
ACATTTGTAACTCTGGTTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTC
CAGCCTGACGGAGTGCGTGTGTAACAAGGCCACGAATGTC
GCCCACCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGTATTAGA

【0951】

加えて、IL-21配列を組織因子219のN末端コーディング領域に結合し、さらにIL-21／TF構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによってIL-21／TF／IL-15構築物を作製した(図41)。IL-21／TF／IL-15構築物の核酸配列(リーダー配列を含む)は、以下の通りである(配列番号192)。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL-21)

CAGGGCCAGGACAGGACACATGATCCGGATGAGGGCAGCTC
ATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACC
TGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGAC
CAACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAAGGCC
CAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCA
TCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTC
CACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGC
CCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGT
TCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAAGATGATCCA
TCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

(ヒト組織因子219)

TCCGGGCACCAACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACAT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAAC
CCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGAGATCTCCAC
CAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACA
GACACCGAGTGTTGATTTAAACCGACGAAATCGTCAAGGACG
TCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTACCCCGC
TGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTC
TACGAGAATTCCCCCGAATTCAACCCCTTATTTAGAGACCA
ATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGG
CACCAAGGTGAACGTCACCGTCTGAGGATGAAAGGACTTTA
GTGCGGCGGAATAACACATTTTTTATCCCTCCGGGGATGTGT
TCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCT
CAGCTCCTCCGGCAAAGAGACCGCTAAGACCAACACCAAC
GAGTTTTTAAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCT
TCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCG
GAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAA
TCATTTTTCAGCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【0952】

実施例22：TGFβRII/IL-15RαSu融合タンパク質およびIL-21/TF/IL-15融合タンパク質の分泌

TGFβRII/IL-15RαSu DNA構築物およびIL-21/TF/IL-15 DNA構築物をpMSGV-1修飾レトロウイルス発現ベクター（参照により本明細書に組み込まれる、Hughes et al., Hum Gene Ther 16: 457-72, 2005に記載のもの）にクローニングし、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-21/TF/IL-15：TGFβRII/IL-15RαSuタンパク質複合体（21t15-TGFRsと称する、図42および図43）の分泌がもたらされた。21t15-TGFRs複合体を、抗TF抗体親和性クロマトグラフィーおよび他のクロマトグラフィー法を使用して、CHO-K1細胞培養上清から精製した。

【0953】

TGFβRII/IL-15RαSu構築物のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号195）。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

（ヒトTGFβRII-第1の断片）

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPEVCVAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETF FMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD

（リンカー）

GGGGSGGGGS GGGGS

(ヒトTGFBRII-第2の断片)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSI CEKPEVCVAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETF FMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

【0954】

成熟IL-21/TF/IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は、以下の通りである(配列番号191)。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFS SAYS

(ヒトIL-21)

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPP
STNAGR RQKHRLTCPS CDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI
HQHLS SRTHGSEDS

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYT TDECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLS SNGN
VTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

【0955】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【0956】

実施例23:免疫親和性クロマトグラフィーによる21t15-TGFRsの精製

抗TF抗体親和性カラムをGE Healthcare AKTA(商標)Avant タンパク質精製システムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

【0957】

21t15-TGFRsの細胞培養収集物を1Mトリス塩基でpH7.4に調整し、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。280nmでの吸光度を収集し、その後、1Mトリス塩基の添加により、試料をpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon(登録商標)遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図44は、21t15-TGFRs複合体が抗TF抗体親和性カラムに結合することを示しており、ここで、TFは、21t15-TGFRs結合パートナーである。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管する。

【0958】

10

20

30

40

50

各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、10カラム体積のPBS、0.05%アジ化ナトリウムを使用して中和し、2~8℃で保管した。

【0959】

実施例24: 21t15-TGFRsのサイズ排除クロマトグラフィー

GE Healthcare Superdex (登録商標) 200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラムを、GE Healthcare AKTA (商標) Avantタンパク質精製システムに接続した。カラムを2カラム体積のPBSで平衡化した。流速は0.8mL/分であった。キャピラリーループを使用して、1mg/mLの21t15-TGFRs複合体200μLをカラムに注入した。その後、注入を1.25カラム体積のPBSで追跡した。SECクロマトグラフを図45に示した。21t15-TGFRsの単量体形態と二量体形態を表す可能性が高い2つのタンパク質ピークが存在した。

10

【0960】

実施例25: 21t15-TGFRsのSDS-PAGE

純度およびタンパク質分子量を決定するために、精製した21t15-TGFRs複合タンパク質試料を、還元条件下で4~12%NuPageビスートリスタンパク質ゲルSDS-PAGEを使用して分析した。ゲルをInstantBlue (商標)で約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。図46は、抗TF抗体アフィニティー精製21t15-TGFRsのSDSゲルの例を示しており、39.08kDaおよび53kDaにバンドがあり、CHO細胞における21t15-TGFRsのグリコシル化は、Protein Deglycosylation Mix IIキット(New England Biolabs)および製造業者の指示を使用して確認した。図46のレーン4に見られるように、脱グリコシル化により21t15-TGFRsの分子量が減少する。

20

【0961】

実施例26: 21t15-TGFRs複合体の組換えタンパク質量

21t15-TGFRs複合体を、標準のサンドイッチELISA法を使用して検出および定量化した(図47~50)。抗ヒト組織因子抗体が捕捉抗体として機能し、ビオチン化抗ヒトIL-21、IL-15、またはTGFβRIIが検出抗体として機能した。組織因子も、抗ヒト組織因子捕捉抗体(I43)および抗ヒト組織因子抗体検出を使用して検出した。I43/抗TF抗体ELISAを、同様の濃度の精製組織因子と比較した。

30

【0962】

実施例27: 21t15-TGFRs複合体の免疫刺激能力

21t15-TGFRs複合体のIL-15免疫刺激活性を評価するために、増加濃度の21t15-TGFRsを200μLのIMDM:10%FBS培地中の32Dβ細胞(10⁴細胞/ウェル)に添加し、細胞を37℃で3日間インキュベートした。4日目に、WST-1増殖試薬(10μL/ウェル)を添加し、4時間後、吸光度を450nmで測定して、WST-1の可溶性ホルマザン色素への切断に基づいて細胞増殖を測定した。ヒト組換えIL-15の生物活性を陽性対照として評価した。図51に示されるように、21t15-TGFRsは、IL-15依存性32Dβ細胞増殖を示した。21t15-TGFRs複合体は、恐らくIL-21および組織因子のIL-15ドメインへの結合のため、ヒト組換えIL-15と比較して低下した。

40

【0963】

加えて、HEK-Blue TGFβレポーター細胞(hkb-tgfb、InvivoGen)を使用して、TGFβ1活性を遮断する21t15-TGFRsの能力を測定した(図52)。増加濃度の21t15-TGFRsを0.1nMのTGFβ1と混合し、200μLのIMDM:10%熱不活性化FBS培地中のHEK-Blue TGFβレポーター細胞(2.5×10⁴細胞/ウェル)に添加した。細胞を37℃で一晩インキュベートした。翌日、20μLの誘導されたHEK-Blue TGFβレポーター細胞上清を180μLのQUANTI-Blue(InvivoGen)に添加し、37℃で

50

1～3時間インキュベートした。21t15-TGFRs活性を、吸光度を620nmで測定することによって評価した。ヒト組換えTGFBRII/Fc活性を陽性対照として評価した。

【0964】

これらの結果は、21t15-TGFRs複合体のTGFBRIIDメインがTGFB1を捕捉する能力を保持することを示す。TGFB1活性を遮断する21t15-TGFRsの能力は、恐らくTGFBRIIのIL-15R α sushiドメインへの結合のため、ヒト組換えTGFBRII/Fcの能力と比較して低下した。

【0965】

実施例28：21t15-TGFRs複合体によるサイトカイン誘導性メモリー様NK細胞の誘導

サイトカイン誘導性メモリー様NK細胞を、精製NK細胞を飽和量のサイトカインで一晩刺激した後にエクスピボで誘導することができる。これらのメモリー様特性を、IL-2受容体 α (IL-2R α 、CD25)、CD69 (および他の活性化マーカー) の発現、およびIFN- γ 産生の増加により測定することができる。サイトカイン誘導性メモリー様NK細胞の生成を促進する21t15-TGFRs複合体の能力を評価するために、精製ヒトNK細胞 (95%超のCD56+) を1nM～100nMの21t15-TGFRs複合体で14～18時間刺激した。細胞表面CD25およびCD69発現および細胞内IFN- γ レベルを、抗体染色およびフローサイトメトリーによって評価した。

【0966】

新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56+ NK細胞を、RosetteSep/ヒトNK細胞試薬 (StemCell Technologies) を使用して単離した。NK細胞の純度は70%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特異的抗体 (BioLegend) で染色することにより確認した。細胞をカウントし、0.2mLの完全培地 (RPMI 1640 (Gibco)、2mMのL-グルタミン (Thermo Life Technologies)、ペニシリン (Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン (Thermo Life Technologies)、および10% FBS (Hyclone) を補充) 中の96ウェル平底プレートに0.2 $\times$ 10⁶/mLで再懸濁した。細胞を、hIL-21 (50ng/mL) (BioLegend) およびhIL-15 (50ng/mL) (NCI) の混合サイトカイン、または1nM、10nM、もしくは100nMの21t15-TGFRs複合体のいずれかで、37℃で一晩、5%CO₂で14～18時間刺激した。その後、細胞を収集し、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特異的抗体で30分間表面染色した。染色後、細胞を、FACS緩衝液 (1X PBS (Hyclone)、0.5% BSA (EMD Millipore) および0.001% アジ化ナトリウム (Sigma) を含む) 中で洗浄した (1500RPM、室温で5分間)。2回洗浄した後、細胞を、BD FACSCelesta (商標) フローサイトメーターを使用して分析した。 (プロットされたデーター平均蛍光強度、図53および図54)。

【0967】

新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56+ NK細胞を、RosetteSep/ヒトNK細胞試薬 (StemCell Technologies) を使用して単離した。NK細胞の純度は70%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特異的抗体 (BioLegend) で染色することにより確認した。細胞をカウントし、0.2mLの完全培地 (RPMI 1640 (Gibco)、2mMのL-グルタミン (Thermo Life Technologies)、ペニシリン (Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン (Thermo Life Technologies)、および10% FBS (Hyclone) を補充) 中の96ウェル平底プレートに0.2 $\times$ 10⁶/mLで再懸濁した。細胞を、hIL-21 (50ng/mL) (BioLegend) およ

10

20

30

40

50

びhIL-15 (50 ng/mL) (NCI)の混合サイトカイン、または1 nM、10 nM、もしくは100 nMの21t15-TGFRs複合体のいずれかで、37℃で一晩、5%CO₂で14~18時間刺激した。その後、細胞を、10 µg/mLのブレフェルジンA (Sigma) および1Xモネンシン (eBioscience) で4時間処理した。細胞を収集し、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特異的抗体で30分間表面染色した。染色後、細胞を、FACS緩衝液 (1X PBS (Hyclone)、0.5%BSA (EMD Millipore) および0.001%アジ化ナトリウム (Sigma) を含む) 中で洗浄し (1500 RPM、室温で5分間)、室温で10分間固定した。固定後、細胞を1x透過処理緩衝液 (eBioscience) で洗浄し (1500 RPM、室温で5分間)、細胞内IFN-γ-PE (Biolegend) で、室温で30分間染色した。細胞を1x透過処理緩衝液で再度洗浄し、その後、FACS緩衝液で洗浄した。細胞ペレットを300 µLのFACS緩衝液中に再懸濁し、BD FACSCelesta (商標) フローサイトメーターを使用して分析した。(プロットされたIFN-γ陽性細胞%、図55)。

【0968】

実施例29：ヒト腫瘍細胞に対するNK細胞のインビトロ細胞傷害性

ヒト骨髓性白血病細胞K562 (CellTrace violetで標識) を、増加濃度の21t15-TGFRs複合体の存在下で、精製ヒトNK細胞 (StemCellヒトNK細胞精製キット (E:T比; 2:1) を使用) とインキュベートした。20時間後、培養物を収集し、ヨウ化プロピジウム (PI) で染色し、フローサイトメトリーで評価した。図56に示されるように、21t15-TGFRs複合体は、対照と比較して、K562に対するヒトNK細胞傷害性を誘導した。

【0969】

実施例30：IL-21/TF変異体/IL-15 DNA構築物の作製、およびTGFβRII/IL-15RαSuとの結果として生じた融合タンパク質複合体

非限定的な例では、IL-21を組織因子219変異体のN末端コーディング領域に直接結合し、さらにIL-21/TF変異体をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによってIL-21/TF変異体/IL-15 DNA構築物を作製した。

【0970】

IL-21/TF変異体/IL-15構築物の核酸配列 (シグナルペプチド配列を含む) は、以下の通りである (配列番号324、影付きのヌクレオチドが変異体であり、変異体コドンには下線が引かれている)。

(シグナル配列)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL-21)

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCGAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCA TCAGCACCTGTCTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

(ヒト組織因子219変異体)

10

20

30

40

50

TCCGGCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGC
ACCAACTTCGACAGCTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTT
ACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTA
CACAACAGACACCGAGTGTGTTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAG
CAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCAC
CGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATTCACCCCTTATT
TAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCAC
CAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGCGGAATAA
CACAATTATCCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGT
ACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAA
CGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAA
GCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTG
AGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

10

20

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAAGATTTAA
TCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

30

【0971】

IL-21／TF変異体／IL-15構築物のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号325、置換残基には影付けされている）。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-21)

QGQDRHMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPP
STNAGRQRKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMI
HQHLSSTRTHGSEDS

40

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFLEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC
FYTTDTECLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYL
ETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVARNNTLSLRDVFVGKDLIYTLYYW
KSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQE
KGEFRE

(ヒトIL-15)

50

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEEL E EKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS

【0972】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【0973】

いくつかの実施形態では、IL-21/TF変異体/IL-15 DNA構築物を、TGFBRII/IL-15R α Su DNA構築物と組み合わせて、上述のようにレトロウイルスベクターを使用して細胞にトランスフェクトし、IL-21/TF変異体/IL-15融合タンパク質およびTGFBRII/IL-15R α Su融合タンパク質として発現させることができる。TGFBRII/IL-15R α Su融合タンパク質のIL-15R α SuドメインがIL-21/TF変異体/IL-15融合タンパク質のIL-15ドメインに結合して、IL-21/TF変異体/IL-15: TGFBRII/IL-15R α Su複合体を作製する。

【0974】

実施例31: IL-21/IL-15R α Su DNA構築物およびTGFBRII/TF/IL-15 DNA構築物の作製、ならびに結果として生じた融合タンパク質複合体

非限定的な例では、IL-21をIL-15R α Suサブユニット配列に直接結合することによってIL-21/IL-15R α Su DNA構築物を作製した。IL-21/IL-15R α Su構築物の核酸配列（シグナル配列を含む）は、以下の通りである（配列番号214）。

（シグナル配列）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（ヒトIL-21）

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCGAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCGAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCA TCAGCACCTGTCTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

（ヒトIL-15R α sushiドメイン）

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTG CATCCGG

【0975】

IL-21/IL-15R α Su構築物のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号213）。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

（ヒトIL-21）

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS

TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLSSRTHGSEDS

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

【0976】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【0977】

いくつかの実施形態では、IL-21/IL-15R α Su DNA構築物を、TGFB β RII/TF/IL-15 DNA構築物と組み合わせて、上述のようにレトロウイルスベクターにトランスフェクトし、IL-21/IL-15R α Su融合タンパク質およびTGFB β RII/TF/IL-15融合タンパク質として発現させることができる。IL-21/IL-15R α Su融合タンパク質のIL-15R α SuドメインがTGFB β RII/TF/IL-15融合タンパク質のIL-15ドメインに結合して、TGFB β RII/TF/IL-15:IL-21/IL-15R α Su複合体を作製する。

【0978】

TGFB β RII配列をヒト組織因子219形態のN末端コーディング領域に結合し、その後、TGFB β RII/TF構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによってTGFB β RII/TF/IL-15R α Su DNA構築物を作製した。上述のように、TGFB β RIIの一本鎖バージョン(TGFB β RII-リンカー-TGFB β RII)を使用した。TGFB β RII/TF/IL-15構築物の核酸配列(リーダー配列を含む)は、以下の通りである(配列番号239)。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
TCCAGCGCCTACTCC

(ヒトTGFB β RII-第1の断片)

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATG
ATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGC
TCTGCAAGTTCTGCGATGTGAGGTTTCAGCACCTGCGATAA
TCAGAAGTCCCTGCATGTCCAACCTGCACGATCACCTCCATC
TGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGA
AAAATGACGAGAACAATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGA
CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCTGAT

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGT
GGGAGT

(ヒトTGFB β RII-第2の断片)

ATTCCTCCCCACGTGCAGAAAGAGCGTGAAATAATGACATG
ATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGC
TGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAA
CCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCACAATCACCTCCATC
TGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGA
AGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGA
TCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCC
GCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAGAAGAGAAAAGAAGCCTG

10

20

30

40

50

GCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATG
CAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGC
AACCCCGAC

(ヒト組織因子219)

TCCGGGCACCAACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACAA
TGGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAAC
CCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCAC
CAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACA
GACACCGAGTGATTTAAACCGACGAAATCGTCAAGGACG
TCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTTACCCTCGC
TGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTC
TACGAGAATTCCCCCGAATTACCCCTTATTTAGAGACCA
ATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGG
CACCAAGGTGAACGTCACCGTTCGAGGATGAAAGGACTTTA
GTGCGGCGGAATAACACATTTTTTATCCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTC
CAGCTCCTCCGGCAAAGAGACCGCTAAGACCAACACCAAC
GAGTTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCT
TCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCG
GAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCGCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

10

20

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAA
TCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

30

【0979】

TGFβRII／TF／IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチドを含む）は、以下の通りである（配列番号238）。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

（ヒトTGFβRII-第1の断片）

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD

40

（リンカー）

GGGGS GGGGS GGGGS

（ヒトTGFβRII-第2の断片）

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD

（ヒト組織因子219）

SGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS

50

TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHD TVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【0980】

実施例32. 例示的な一本鎖キメラポリペプチドの産生

抗CD3scFvである第1の標的結合ドメイン、可溶性ヒト組織因子ドメイン、および抗CD28scFvである第2の標的結合ドメインを含む例示的な一本鎖キメラポリペプチドが生成された(αCD3scFv/TF/αCD28scFv)(図57)。この一本鎖キメラポリペプチドの核酸およびアミノ酸配列を以下に示す。

例示的な一本鎖キメラポリペプチド(αCD3scFv/TF/αCD28scFv)をコードする核酸(配列番号158)

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTATTTC
AGCTCCGCGCTATTCC

(αCD3軽鎖可変領域)

CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCGCATCATGAGCGCT
AGCCCCGGTGAGAAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCA
GCTCCGTGTCTCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGG
AACCAGCCCCAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTG
GCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCG
GCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCGGCATGGAAGCTGA
AGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAAC
CCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAATC
GT

(リンカー)

GGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGA
GGAAGC

(αCD3重鎖可変領域)

CAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGGCGCTGAACTGGCCCCGG
CCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCT
ATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAG
GCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCCT
TCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATA
AAGCCACTTTAACCAGTGAAGAGCTCCTCCACCGCCTA
CATGCAGCTGTCCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTT
TACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAG
ACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCAGTCAGCAGC

(ヒト組織因子219型)

TCCGGGCACCAACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACA
TGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAAC
CCAAGCCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCAC
CAAATCCGGAGAGCTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACA
GACACCGAGTGTTGATTTAACCAGACGAAATCGTCAAGGACG
TCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTTACCCCGC

10

20

30

40

50

TGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTC
TACGAGAATTCCCCCGAATTACCCCTTATTTAGAGACCA
ATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGG
CACCAAGGTGAACGTCACCGTTCGAGGATGAAAGGACTTTA
GTGCGGCGGAATAACACATTTTTTATCCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTC
CAGCTCCTCCGGCAAAGAGACCGCTAAGACCAACACCAAC
GAGTTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCT
TCAGCGGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCG
GAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTG CATGGGCGCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGGAG

10

(α CD28 軽鎖可変領域)

GTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCC
GGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATACA
CCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAAGCC
CGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCGAGCATCAACCCCTTAC
AACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTTAAGGGAAAGG
CTACTTTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCCTACAT
GGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTAC
TATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGG
GCACAACACTGACCGGTGAGCAGC

20

(リンカー)

GGAGGCGGGAGGGCTCCGGCGGGAGGCGGATCTGGCGGTGGC
GGCTCC

(α CD28 軽鎖可変領域)

GACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCC
TCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGTACAGCCTCCT
CCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAA
ACCCGGAAGCTCCCCCTAAACTGTGCATCTACAGCACACAGC
AATCTCGCCAGCGGCGGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGGAAGCG
GAAGCACACAGCTACTCTTTAACCATCTCCTCCATGGAGGC
TGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCAACAGTACCACCGG
TCCCCCACCTTCGGAGGCGGGCACCAAACTGGAGACAAAGA
GG

30

例示的な一本鎖キメラポリペプチド (α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v) (配列番号157)

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFS SAYS

(α CD3 軽鎖可変領域)

QIVLTQSPA IMSASPG EKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKS
GTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEA
EDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

40

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(α CD3 重鎖可変領域)

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQ
RPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFQDKATLTDDKSSSTA
YMQQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSS

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKITILEWEPKPVNQVYTVQIS

50

TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(α CD28 軽鎖可変領域)

VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQK
PGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAY
MEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTTLTVSS

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(α CD28 重鎖可変領域)

DIEMTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQ
KPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSME
AEDAATYFCHQYHRSPTFGGGGTKLETKR

【0981】

抗CD28 scFvである第1の標的結合ドメイン、可溶性ヒト組織因子ドメイン、および抗CD3 scFvである第2の標的結合ドメインを含む第2の例示的な一本鎖キメラポリペプチドが生成された(α CD28 scFv/TF/ α CD3 scFv)(図57)。この一本鎖キメラポリペプチドの核酸およびアミノ酸配列を以下に示す。

例示的な一本鎖キメラポリペプチド(α CD28 scFv/TF/ α CD3 scFv)をコードする核酸(配列番号326)

(シグナルペプチド)

ATGAAATGGGTCACTTTCATCTCTTTACTGTTTTTATTT
AGCAGCGCCTACAGC

(α CD28 軽鎖可変領域)

GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAACCTGGTCAAGCCC
GGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCTTCTGGCTACA
CCTTTACCTCCTACGTCATCCAATGGGTGAAGCAGAAGCC
CGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAATCCCTAC
AACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGG
C CACTCTGACAAGCGACAAGAGCTCCATTACCGCCTACAT
GGAGTTTTCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATAC
TATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAATTATTGGGGGCCGGG
GAACTACTTTTAACAGTGAGCTCC

(リンカー)

GGCGGCGGCGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGA
GGCAGC

(α CD28 重鎖可変領域)

GACATCGAGATGACACAGTCCCCCGCTATCATGAGCGCC
TCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGTACAGCTTCCT
CCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAA
ACCCGGCTCCTCCCTAAACTGTGTATCTACTCCACAAGC
AATTTAGCTAGCGGCGTGCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCG
GCAGCACCTCTTACTCTTTAAACCATTAGCTCTATGGAGGC
CGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGG
TCCCCTACCTTTGGCGGAGGCAACAAGCTGGAGACCAAGC
GG

(ヒト組織因子219型)

AGCGGCACCAACACAGTGGCCCGCCTACAATCTGACT

10

20

30

40

50

TGGAAATCCACCAACTTCAAGACCATCCTCGAGTGGGAGC
CCAAGCCCCTTAATCAAGTTTATACCGTGCAGATTTCCAC
CAAGAGCGGCGACTGGAAATCCAAGTGCTTCTATACCACA
GACACCGAGTGCGATCTCACCGACGAGATCGTCAAAGACG
TGAAGCAGACATATTTAGCTAGGGTGTTCTCCTACCCCGC
TGGAAACGTGGAGAGCACCGGATCCGCTGGAGAGCCTTTA
TACGAGAACTCCCCCGAATTCACCCCCTATCTGGAAACCA
ATTTAGGCCAGCCCCACCATCCAGAGCTTCGAACAAGTTGG
CACAAAGGTGAACGTCACCGTCTGAAGATGAGAGGACTTTA
GTGCGGAGGAACAATACATTTTTTATCCTTACGTGACGTCT
TCGGCAAGGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
TAGCTCCTCCGGCAAGAAGACCGCCAAGACCAATACCAAC
GAATTTTTTAATTGACGTGGACAAGGGCGAGAACTACTGCT
TCTCCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACAGTGAACCG
GAAGTCCACCGACTCCCCCGTGAGGTGCATGGGCGCAAGAG
AAGGGAGAGTTTTCGTGAG

(α CD3 軽鎖可変領域)

CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCTATTATGAGCGCT
AGCCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGCAGCGCCAGCT
CTTCCGTGAGCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGG
CACCAAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTG
GCCAGCGGCGTCCCCGCTCACTTTTCGGGGCTCCGGGCTCCG
GAACAAGCTACTCTCTGACCATCAGCGGCATGGAAGCCGA
GGATGCCGCTACCTATTACTGTGAGCAGTGGAGCTCCAAC
CCCTTCACCTTTGGATCCGGGCACCAAGCTCGAGATTAATC
GT

(リンカー)

GGAGGCGGAGGTTAGCGGAGGAGGCGGATCCGGCGGTGGA
GGTAGC

(α CD3 重鎖可変領域)

CAAGTTTCAGCTCCAGCAAAAGCGGGCGCCGAACCTCGCTCGG
CCCGGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTAAGGCCTCCGGCT
ATACCTTCACCCCGGTACACAATGCACTGGGTCAAGCAACG
GCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGAATTGGCTATATCAACCCC
TCCCCGGGGCTATACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACA
AAGCCACCCCTCACCAACCGACAAGTCCAGCAGCACCGCTTA
CATGCAGCTGAGCTCTTTAACATCCGAGGATTCCGGCCGTG
TACTACTGCGCTCGGTACTACGACGATCACTACTGCCTCG
ATTACTGGGGCCAAGGTACCACCTTAACAGTCTCCTCC

例示的な一本鎖キメラポリペプチド (α CD28 s c F v / T F / α CD3 s c F v) (配列番号327)

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(α CD28 軽鎖可変領域)

VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQK
PGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAY
MEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTTLTVSS

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(α CD28 重鎖可変領域)

10

20

30

40

50

DIEMTQSPA IMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQ
KPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSE
AEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDKVQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVTN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

10

(α CD3 軽鎖可変領域)

QIVLTQSPA IMSASPGGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKS
GTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSSYSLTISGMEA
EDAATYQCQWSSNPFTFGSGTKLEINR

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(α CD3 重鎖可変領域)

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQ
RPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD KATLT TDKSSSTA
YMQLLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSS
[0982]

20

α CD3scFv/TF/ α CD28scFvをコードする核酸を、前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングした(Hughes et al., Hum Gene Ther 16:457-72, 2005)。 α CD3scFv/TF/ α CD28scFvをコードする発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞での発現ベクターの発現により、可溶性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチド(3t28と称する)の分泌が可能になり、これを抗TF抗体親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

[0983]

抗組織因子親和性カラムを使用して、 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドを精製した。抗組織因子親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで、4mL/分の流速を使用した。

30

[0984]

α CD3scFv/TF/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドを含む細胞培養収集物を1Mトリス塩基でpH7.4に調整し、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラム(上記の)にロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基を添加することによってpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図58のデータは、抗組織因子親和性カラムが、ヒト可溶性組織因子ドメインを含む α CD3scFv/TF/ α CD28scFv一本鎖キメラポリペプチドに結合することができることを示す。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。

40

[0985]

各溶出後、抗組織因子親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、10カラム体積のPBS、0.05%NaN₃を使用して中和し、2~8℃で保管した。

[0986]

50

AKTA Avantシステム (GE Healthcare 製) に接続した Superdex 200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラム (GE Healthcare 製) を使用して、 α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドにおいて、分析的サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を行った。カラムを2カラム体積のPBSで平衡化した。0.8 mL / 分の流速を使用した。200 μ L の α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチド (1 mg / mL) を、キャピラリーループを使用してカラムに注入した。一本鎖キメラポリペプチドの注入後、1.25カラム体積のPBSをカラムに流し込んだ。SECクロマトグラフを図59に示す。データは、 α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドの単量体形態と二量体形態または他の異なる形態を表す可能性が高い3つのタンパク質ピークが存在することを示す。

10

【0987】

α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドの純度およびタンパク質分子量を決定するために、抗組織因子親和性カラムから精製した α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v タンパク質試料を、還元条件下で標準的なドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (4~12% NuPageビーストリスゲル) 電気泳動 (SDS-PAGE) 法によって分析した。ゲルをInstant Blueで約30分間染色し、精製水中で一晩脱色した。図60は、抗組織因子親和性カラムを使用して精製した α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドのSDSゲルを示す。結果は、精製した α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドが、還元SDSゲル中で予想された分子量 (72 kDa) を有することを示す。

20

【0988】

実施例33. α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドの機能的特性付け

ELISAベースの方法により、 α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドの形成が確認された。 α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドは、抗TF抗体 (I43) / 抗TF抗体特異的ELISAと捕捉抗体、抗ヒト組織因子抗体 (I43)、および検出抗体、抗TF抗体を使用して検出した (図61)。同様の濃度を有する精製した組織因子タンパク質を対照として使用した。

30

【0989】

α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドがヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を活性化することができるかどうかを判定するために、さらなるインビトロ実験を行った。新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、末梢血単核細胞 (PBMC) を、密度勾配Histopaque (Sigma) を使用して単離した。細胞をカウントし、0.2 mL の完全培地 (RPMI 1640 (Gibco)、2 mM の L-グルタミン (Thermo Life Technologies)、ペニシリン (Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン (Thermo Life Technologies)、および10% FBS (Hyclone) を補充) 中の96ウェル平底プレートに 0.2×10^6 / mL で再懸濁した。細胞を、1000 nM の 0.01 nM ~ 1000 nM の α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本鎖キメラポリペプチドで、37°C、5% CO₂ で3日間刺激した。72時間後、細胞を収集し、CD4-488、CD8-PerCP Cy5.5、CD25-BV421、CD69-APCFire750、CD62L-PE Cy7、およびCD44-PE特異的抗体 (Biolegend) を30分間表面染色した。表面染色後、細胞を、FACS緩衝液 (1X PBS (Hyclone)、0.5% BSA (EMD Millipore) および0.001% アジ化ナトリウム (Sigma) を含む) 中で洗浄した (1500 RPM、室温で5分間)。2回洗浄した後、細胞を、300 μ L のFACS緩衝液で再懸濁し、フローサイトメトリー (Celesta-BD Bioscience) によって分析した。図62および63のデータは、 α CD3 s c F v / T F / α CD28 s c F v 一本

40

50

鎖キメラポリペプチドがCD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞の両方を刺激することができることを示す。

【0990】

さらなる実験を行い、Histopaque (Sigma) を使用して血液から単離されたPBMCをカウントし、0.2mLの完全培地 (RPMI 1640 (Gibco)、2mMのL-グルタミン (Thermo Life Technologies)、ペニシリン (Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン (Thermo Life Technologies)、および10%FBS (Hyclone) を補充) 中の96ウェル平底プレートに0.2×10⁶/mLで再懸濁した。その後、細胞を、0.01nM~1000nMのαCD3scFv/TF/αCD28scFv一本鎖キメラポリペプチドで、37℃、5%CO₂で3日間刺激した。72時間後、細胞を収集し、CD4-488、CD8-PerCP Cy5.5、CD25-BV421、CD69-APCFire750、CD62L-PE Cy7、およびCD44-PE (Biolegend) を30分間表面染色した。表面染色後、細胞を、FACS緩衝液 (1X PBS (Hyclone)、0.5%BSA (EMD Millipore) および0.001%アジ化ナトリウム (Sigma) を含む) 中で洗浄した (1500RPM、室温で5分間)。2回洗浄した後、細胞を、300μLのFACS緩衝液で再懸濁し、フローサイトメトリー (Celesta-BD Bioscience) によって分析した。データは、αCD3scFv/TF/αCD28scFv一本鎖キメラポリペプチドがCD4⁺ T細胞の活性化を刺激することができたことを再び示す (図64)。

【0991】

実施例34: IL-7/IL-15RαSu DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-7/IL-15RαSu DNA構築物を作製した (図65を参照のこと)。ヒトIL-7配列、ヒトIL-15RαSu配列、ヒトIL-15配列、およびヒト組織因子219配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。IL-7配列をIL-15RαSu配列に結合することによってDNA構築物を作製した。最終IL-7/IL-15RαSu DNA構築物配列をGenewizによって合成した。

【0992】

IL-7/IL-15RαSu構築物の第2のキメラポリペプチドをコードする核酸配列 (シグナルペプチド配列を含む) は、以下の通りである (配列番号206)。

(シグナルペプチド)

ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCT
GTGGCCGAGGCC

(ヒトIL-7)

GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAG
AGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCA
TGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCCTGAATAATGAATTTAA
CTTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGT
ATGTTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTT
TTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGTATCTCCACTTATT
AAAAGTTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAAGCTGCACT
GGCCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAG
CCCAACCAACAAGAGTTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAA
GGAACAGAAAAAACTGAATGACTTGTGTTTCTTAAGAGA
CTATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAATAAAATTTTGA
TGGGCACTAAAGAACAC

(ヒトIL-15Rαsushiドメイン)

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCGAGAC
ATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGT

ACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTC
CAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTC
GCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

【0993】

IL-7/IL-15 R α Su 構築物の第2のキメラポリペプチド（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号205）。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

（ヒトIL-7）

DCDIEGKDQKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEF
NFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHL
LKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL
KEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH

（ヒト組織因子219）

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYT TDECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIY TLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

（ヒトIL-15）

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLS SNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS

【0994】

実施例35：IL-21/TF/IL-15 DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-21配列を組織因子219のN末端コーディング領域に結合し、さらにIL-21/TF構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによってIL-21/TF/IL-15構築物を作製した（図66）。

【0995】

Genewizによって合成したIL-21/TF/IL-15構築物の第1のキメラポリペプチドをコードする核酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである（配列番号202）。

（シグナルペプチド）

ATGGGAGTGAAAGTTCTTTT TGCCCTTATTTGTATTGCT
GTGGCCGAGGCC

（ヒトIL-21断片）

CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTT
ATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACT
TGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGAC
AAACTGTGAGTGGTCAGCTTTT TCTGTTTTCAGAAGGCC
CAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAA
TCAATGTATCAATTA AAAAGCTGAAGAGGAAACCACTTC
CACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGC
CCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAAT
TCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTC CAAAAGATGATTCA
TCAGCATCTGTCCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC

（ヒト組織因子219）

TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACT
TGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAAC

10

20

30

40

50

CCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCAC
TAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACA
GACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATG
TGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGC
AGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTG
TATGAGAACTCCCCAGAGTTTACACACCTTACCTGGAGACAA
ACCTCGGACAGCCAACAATTTCAGAGTTTTTGAACAGGTGGG
AACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTA
GTCAGAAGGAACAACACTTTTCTTAAGCCTCCGGGGATGTTT
TTGGCAAGGACTTAATTTATACACTTTTATTATTGGAAATC
TTCAAGTTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAAT
GAGTTTTTTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTACTGTT
TCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCGAACAGTTAACCG
GAAGAGTACAGACAGCCCAGGTAGAGTGATGGGGCCAGGAG
AAAGGGGAATTTCAGAGAA

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【0996】

リーダー配列を含むIL-21／TF／IL-15構築物の第1のキメラポリペプチドは、配列番号201である。

(シグナルペプチド)

MGVKVLFALICIAVAEA (配列番号328)

(ヒトIL-21)

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPP
STNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMI
HQHLS SRTHGSEDS

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS

【0997】

実施例36：IL-7／IL-15R α Su融合タンパク質およびIL-21／TF／IL-15融合タンパク質の分泌

IL-7／IL-15R α Su DNA構築物およびIL-21／TF／IL-15 D

10

20

30

40

50

NA構築物をpMSGV-1修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし（参照により本明細書に組み込まれる、Hughes, Hum Gene Ther 16:457-72, 2005に記載のもの）、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-21/TF/IL-15:IL-7/IL-15R α Suタンパク質複合体（21t15-7sと称する、図67および図68）の形成および分泌が可能になった。21t15-7sタンパク質を、抗TF抗体親和性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを使用してCHO-K1細胞培養上清から精製し、IL-7/IL-15R α Su融合タンパク質およびIL-21/TF/IL-15融合タンパク質からなる可溶性（非凝集）タンパク質複合体を得た。

10

【0998】

ある場合には、リーダー（シグナル配列）ペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【0999】

実施例37：免疫親和性クロマトグラフィーによる21t15-7sの精製

抗TF抗体親和性カラムをGE Healthcare（商標）AKTA Avantタンパク質精製システムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

【1000】

21t15-7sの細胞培養収集物を1Mトリス塩基でpH7.4に調整し、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸（pH2.9）で溶出した。280nmでの吸光度を収集し、その後、1Mトリス塩基の添加により、試料をpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon（登録商標）遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。

20

【1001】

各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン（pH2.5）を使用してストリッピングした。その後、カラムを、10カラム体積のPBS、0.05%アジ化ナトリウムを使用して中和し、2~8℃で保管した。

30

【1002】

実施例38：サイズ排除クロマトグラフィー

GE Healthcare Superdex（登録商標）200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラムを、GE Healthcare AKTA（商標）Avantタンパク質精製システムに接続した。カラムを2カラム体積のPBSで平衡化した。流速は0.7mL/分であった。キャピラリーループを使用して、1mg/mLの7t15-21s複合体200 μ Lをカラムに注入した。注入を1.25カラム体積のPBSで追跡した。

【1003】

40

実施例39：21t15-7sおよび21t15-TGFRsのSDS-PAGE

純度およびタンパク質分子量を決定するために、精製した21t15-7sタンパク質または21t15-TGFRsタンパク質試料を、4~12%NuPageビーストリスタンパク質ゲルSDS-PAGEを使用して分析した。ゲルをInstant Blue（商標）で約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色する。

【1004】

実施例40：CHO-K1細胞における21t15-7sおよび21t15-TGFRsのグリコシル化

CHO-K1細胞における21t15-7sまたはCHO-K1細胞における21t15-TGFRsのグリコシル化を、Protein Deglycosylation M

50

i x I Iキット (New England Biolabs) を製造業者の指示に従って使用して確認した。

【1005】

実施例41: 21t15-7s 複合体および21t15-TGFRs 複合体の組換えタンパク質定量

21t15-7s 複合体または21t15-TGFRs 複合体を、標準のサンドイッチ ELISA 法を使用して検出および定量化した。抗ヒト組織因子抗体 (IgG1) は捕捉抗体として機能し、ビオチン化抗ヒトIL-21、IL-15、もしくはIL-7 抗体 (21t15-7s)、またはビオチン化抗ヒトIL-21、IL-15、もしくはTGFR-βRII 抗体 (21t15-TGFRs) が検出抗体として機能した。精製した21t15-7s タンパク質複合体または21t15-TGFRs タンパク質複合体の組織因子を、抗ヒト組織因子捕捉抗体および抗ヒト組織因子抗体 (IgG1) 検出抗体を使用して検出した。抗TF 抗体ELISAを、同様の濃度の精製組織因子と比較する。

【1006】

実施例42: IL-21/IL-15RαSu DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-21/IL-15RαSu DNA構築物を作製した。ヒトIL-21 配列およびヒトIL-15RαSu 配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。IL-21 配列をIL-15RαSu 配列に結合することによってDNA構築物を作製した。最終IL-21/IL-15RαSu DNA構築物配列をGenewizによって合成した。図69を参照されたい。

【1007】

実施例43: IL-7/TF/IL-15 DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-7 配列を組織因子219のN末端コーディング領域に結合し、さらにIL-7/TF 構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによってIL-7/TF/IL-15 構築物を作製した。図70を参照されたい。

【1008】

実施例44: IL-21/IL-15RαSush DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-21/IL-15RαSuの第2のキメラポリペプチドを生成した。ヒトIL-21 配列およびヒトIL-15Rαsush 配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。IL-21 配列をIL-15Rαsush 配列に結合することによってDNA構築物を作製した。最終IL-21/IL-15RαSu DNA構築物配列をGenewizによって合成した。

【1009】

Genewizによって合成したIL-21/IL-15RαSuドメインの第2のキメラポリペプチドをコードする核酸配列 (リーダー配列を含む) は、以下の通りである (配列番号214)。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCT
CCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL-21)

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCGCGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT

CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACA
TCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTA
TATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGGCACCAGC
AGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGG
CTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTG CATCCGG

【1010】

IL-21／IL-15R α sushiドメインの第2のキメラポリペプチド（リーダー配列を含む）は、以下の通りである（配列番号213）。

10

(シグナル配列)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-21)

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLSSRTHGSEDS

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTS
SLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIR

20

【1011】

実施例45：IL-7／TF／IL-15 DNA構築物の作製

非限定的な例では、IL-7配列を組織因子219のN末端コーディング領域に結合し、さらにIL-7／TF構築物をIL-15のN末端コーディング領域に結合することによってIL-7／TF／IL-15の例示的な第1のキメラポリペプチドを作製した。Genewizによって合成したIL-7／TF／IL-15の第1のキメラポリペプチドをコードする核酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである（配列番号210）。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCAATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCC

30

(ヒトIL-7断片)

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCT
GAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAAGAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGC
TGCTGCAAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCAT

40

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTT
GGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACC
CAAACCCGTTAAACCAAGTTTACACCGTGCAAGATCAGCAC
AAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCAACCG
ACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGT

50

G A A A C A G A C C T A C C T C G C C C G G G T G T T T A G C T A C C C C G C C
G G C A A T G T G G A G A G C A C T G G T T C C G C T G G C G A G C C T T T A T
A C G A G A A C A G C C C C G A A T T T A C C C C T T A C C T C G A G A C C A A
T T T A G G A C A G C C C A C C A T C C A A A G C T T T G A G C A A G T T G G C
A C A A A G G T G A A T G T G A C A G T G G A G G A C G A G C G G A C T T T A G
T G C G G C G G A A C A A C A C C T T T C T C A G C C T C C G G G A T G T G T T
C G G C A A A G A T T T A A T C T A C A C A C T G T A T T A C T G G A A G T C C
T C T T C C T C C G G C A A G A A G A C A G C T A A A A C C A A C A C A A A C G
A G T T T T T A A T C G A C G T G G A T A A A G G C G A A A A C T A C T G T T T
C A G C G T G C A A G C T G T G A T C C C C T C C C G G A C C G T G A A T A G G
A A A A G C A C C G A T A G C C C C G T T G A G T G C A T G G G C C A A G A A A
A G G G C G A G T T C C G G G A G

(ヒトIL-15)

A A C T G G G T G A A C G T C A T C A G C G A T T T A A A G A A G A T C G A A G
A T T T A A T T C A G T C C A T G C A T A T C G A C G C C A C T T T A T A C A C
A G A A T C C G A C G T G C A C C C C T C T T G T A A G G T G A C C G C C A T G
A A A T G T T T T T T A C T G G A G C T G C A A G T T A T C T C T T T A G A G A
G C G G A G A C G C T A G C A T C C A C G A C A C C G T G G A G A A T T T A A T
C A T T T T A G C C A A T A A C T C T T T A T C C A G C A A C G G C A A C G T G
A C A G A G T C C G G C T G C A A G G A G T G C G A A G A G C T G G A G G A G A
A G A A C A T C A A G G A G T T T C T G C A A T C C T T T G T G C A C A T T G T
C C A G A T G T T C A T C A A T A C C T C C

【1012】

IL-7/TF/IL-15の第1のキメラポリペプチド（リーダー配列を含む）は、
以下の通りである（配列番号209）。

(シグナルペプチド)

M K W V T F I S L L F L F S S A Y S

(ヒトIL-7)

D C D I E G K D G K Q Y E S V L M V S I D Q L L D S M K E I G S N C L N N E F N
F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L R Q F L K M N S T G D F D L H L L
K V S E G T T I L L N C T G Q V K G R K P A A L G E A Q P T K S L E E N K S L K
E Q K K L N D L C F L K R L L Q E I K T C W N K I L M G T K E H

(ヒト組織因子219)

S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S T
K S G D W K S K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P A
G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V G
T K V N V T V E D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K S
S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S V Q A V I P S R T V N R
K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E

(ヒトIL-15)

N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A M
K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V
T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S

【1013】

実施例46：IL-21/IL-15 R α S μ 融合タンパク質およびIL-7/TF/IL-15 融合タンパク質の分泌

IL-21/IL-15 R α S μ DNA構築物およびIL-7/TF/IL-15 DNA構築物をpMSGV-1修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし（参照により本明細書に組み込まれる、Hughes, Hum Gene Ther 16:457-72, 2005に記載のもの）、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクト

10

20

30

40

50

した。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15 α Suタンパク質複合体(7t15-21sと称する)の形成および分泌が可能になった。7t15-21sタンパク質を、抗TF抗体(IgG1)親和性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを使用してCHO-K1細胞培養上清から精製し、IL-21/IL-15 α Su融合タンパク質およびIL-7/TF/IL-15融合タンパク質からなる可溶性(非凝集)タンパク質複合体を得た。図71および図72を参照されたい。

【1014】

実施例47:7t15-21s複合体+抗TF IgG1抗体による初代ナチュラルキラー(NK)細胞の増殖能力

初代ナチュラルキラー(NK)細胞を増殖する7t15-21s複合体の能力を評価するために、7t15-21s複合体および7t15-21s複合体+抗TF IgG1抗体を、新鮮なヒト白血球の試料から得たNK細胞に添加する。細胞を、25nMの抗TF IgG1抗体または抗TF IgG4抗体を有するまたは有しない50nMの7t15-21s複合体で、37℃および5%CO₂で刺激する。細胞を、48~72時間毎にカウントすることにより 0.5×10^6 /mL~ 2.0×10^6 /mL未満の濃度で維持し、培地に新鮮な刺激剤を補充する。7t15-21s複合体または抗TF IgG1抗体もしくは抗TF IgG4抗体もしくは抗TF IgG4+7t15-21s複合体で刺激した細胞を5日目まで維持する。21t15-7s複合体+抗TF IgG1抗体とのインキュベーション時の初代NK細胞の増殖が観察される。

【1015】

実施例48:7t15-21s複合体+抗TF IgG1抗体による増殖したNK細胞の活性化

初代NK細胞を、精製NK細胞を7t15-21s複合体+抗TF IgG1抗体で一晩刺激した後にエクスピボで誘導することができる。新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56+NK細胞を、RosetteSep/ヒトNK細胞試薬(Stem Cell Technologies)を使用して単離する。NK細胞の純度は80%超であり、CD56-BV421およびCD16-BV510特異的抗体(BioLegend)で染色することにより確認する。細胞をカウントし、1mLの完全培地(RPMI 1640(Gibco)、4mMのL-グルタミン(Thermo Life Technologies)、ペニシリン(Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン(Thermo Life Technologies)、非必須アミノ酸(Thermo Life Technologies)、ピルビン酸ナトリウム(Thermo Life Technologies)、および10%FBS(Hyclone)を補充)中の24ウェル平底プレートに 1×10^6 /mLで再懸濁する。細胞を、25nMの抗TF IgG1抗体を有するまたは有しない50nMの7t15-21sで、37℃および5%CO₂で刺激する。細胞を48~72時間毎にカウントし、14日目まで 0.5×10^6 /mL~ 2.0×10^6 /mLの濃度で維持する。培地に新鮮な刺激剤を定期的に補充する。細胞を収集し、3日目に、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特異的抗体(BioLegend)で表面染色し、Flow Cytometry-Celeste-BD Bioscienceによって分析する。活性化マーカーCD25 MFIは、7t15-21s複合体+抗TF IgG1抗体刺激で増加するが、7t15-21s複合体刺激では増加しないことが観察される。活性化マーカーCD69 MFIは、7t15-21s複合体+抗TF IgG1抗体および7t15-21s複合体単独の両方で増加することが観察される。

【1016】

実施例49:18t15-12sを使用したNK細胞のグルコース代謝の増加

一連の実験を行い、ヒト血液から精製したNK細胞の酸素消費速度および細胞外酸性化速度(ECAR)に対する18t15-12s構築物の効果を決定した。

【1017】

これらの実験では、2名の異なるヒトドナー由来の血液バンクから新鮮なヒト白血球を入手し、NK細胞を、RosetteSep／ヒトNK細胞試薬（StemCell Technologies）を使用した陰性選択により単離した。NK細胞の純度は80%超であり、CD56-BV421およびCD16-BV510特異的抗体（BioLegend）で染色することにより確認した。細胞をカウントし、1mLの完全培地（RPMI 1640（Gibco）、4mMのL-グルタミン（Thermo Life Technologies）、ペニシリン（Thermo Life Technologies）、ストレプトマイシン（Thermo Life Technologies）、非必須アミノ酸（Thermo Life Technologies）、ピルビン酸ナトリウム（Thermo Life Technologies）、および10%FBS（Hyclone）を補充）中の24ウェル平底プレートに 2×10^6 /mLで再懸濁した。細胞を、（1）培地のみ、（2）100nMの18t15-12s、または（3）単一サイトカインである組換えヒトIL-12（0.25μg）、組換えヒトIL-15（1.25μg）、および組換えヒトIL-18（1.25μg）の混合物のいずれかで、37℃、5%CO₂で一晩刺激した。翌日、細胞を収集し、増殖したNK細胞の細胞外フラックスアッセイを、XFp分析器（Seahorse Bioscience）を使用して行った。収集した細胞を洗浄し、OCR（酸素消費速度）およびECAR（細胞外酸性化速度）の細胞外フラックス分析のために少なくとも二連で、 2.0×10^5 細胞／ウェルでプレATINGした。解糖ストレス試験を、2mMのグルタミンを含有するSeahorse培地中で行った。以下のものをアッセイ中に使用した：10mMのグルコース、100nMのオリゴマイシン、および100mMの2-デオキシ-D-グリコーゼ（2DG）。

【1018】

データは、18t15-12sが、組換えヒトIL-12、組換えヒトIL-15、および組換えヒトIL-18の組み合わせで活性化された同じ細胞と比較して、酸素消費速度（図73）および細胞外酸性化速度（ECAR）を著しく増加させることを示す（図74）。

【1019】

実施例50：7t15-16s21融合タンパク質の生成および特徴付け

抗CD16scFv／IL-15RαSu／IL-21融合タンパク質およびIL-7／TF／IL-15融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した。ヒトIL-7配列およびヒトIL-21配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。具体的には、IL-7配列を組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、IL-15のN末端コーディング領域に結合することによって構築物を作製した。

【1020】

組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合したIL-7を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1021】

IL-7／TF／IL-15構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（ヒトIL-7）

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAA

CTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTCAAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCC

TGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCT
GAAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACC
GGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGG
CCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAA
GGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGG
CTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGA
TGGGCAACCAAGGAGCAT

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCCTCCGGCAAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【1022】

IL-7／TF／IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ヒトIL-7)

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEF
NFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHL
LKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL
KEQKKLNDLCFLKRL LQEI KTCWNKILMGTKEH

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK

10

20

30

40

50

SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVEECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLS SNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【1023】

抗CD16scFv配列をGenewizによって合成したIL-15R α Su鎖のN
末端コーディング領域に、続いて、IL-21のN末端コーディング領域に結合すること
によっても構築物を作製した。IL-15R α Su鎖のN末端に、続いて、IL-21の
N末端コーディング領域に結合した抗CD16scFvを含む構築物の核酸配列およびタ
ンパク質配列を以下に示す。

【1024】

抗CD16SscFv／IL-15R α Su／IL-21構築物の核酸配列（シグナル
ペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTT C
TCCAGCGCCTACTCC

((抗ヒトCD16scFv)

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTG
GGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGA
GGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCA
GGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCC C
TCCGGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCA
ACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGA
CGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGC
AACCATGTGTGGTGTTCCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGG
GCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGGAGGCGGCGGCAGCGGCGG
AGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGAGTCCGGAGGAGGA
GTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTG
CCTCCGGCTTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGT
GAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGC
ATCAACTGGAAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCG
TGAAGGGCAGGTTCAACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAA
CTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGAC
ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCTGT
TCGACTACTGGGGACAGGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGAGGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCA
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG

(ヒトIL-21)

CAGGGCCAGGACAGGCAACATGATCCGGATGAGGCGAGCTC
ATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACC
TGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGAC
CAACTGCGAGTGGTCCGCCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAAGGCC
CAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCA
TCAACGTGAGCATCAAGAAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTC

10

20

30

40

50

C A C A A A C G C C G G C A G G A G G C A G A A G C A C A G G C T G A C C T G C
C C C A G C T G T G A C T C C T A C G A G A A G A A G C C C C C C A A G G A G T
T C C T G G A G A G G T T C A A G T C C C T G C T G C A G A A G A T G A T C C A
T C A G C A C C T G T C C T C C A G G A C C C A C G G C T C C G A G G A C T C C
【1025】

抗CD16s c F v / I L - 1 5 R α S u / I L - 2 1 構築物のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

M K W V T F I S L L F L F S S A Y S

（抗ヒトCD16s c F v）

S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G
Q A P V L V I Y G K N N R P S G I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E
D E A D Y Y C N S R D S S G N H V V F G G G T K L T V G H G G G G S G G G G S G
G G G S E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A S G F T F D D Y G M S W
V R Q A P G K G L E W V S G I N W N G G S T G Y A D S V K G R F T I S R D N A K
N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G R S L L F D Y W G Q G T L V T V S R

（ヒトIL-15Rαsushiドメイン）

I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T
S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R

（ヒトIL-21）

Q G Q D R H M I R M R Q L I D I V D Q L K N Y V N D L V P E F L P A P E D V E
T N C E W S A F S C F Q K A Q L K S A N T G N N E R I I N V S I K K L K R K P P
S T N A G R R Q K H R L T C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I
H Q H L S S R T H G S E D S

【1026】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1027】

抗CD16s c F v / I L - 1 5 R α S u / I L - 2 1 構築物およびI L - 7 / T F /
I L - 1 5 構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし（Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72）、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞での2つの構築物の共発現により、可溶性I L - 7 / T F / I L - 1 5 : 抗CD16s c F v / I L - 1 5 R α S u / I L - 2 1 タンパク質複合体（7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 と称する、図75および図76）の形成および分泌が可能になり、これを抗TF IgG1抗体ベースの親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1028】

ヒトCD16bを発現するCHO細胞への7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 の結合

CHO細胞をpMCプラスミド中のヒトCD16bでトランスフェクトし、10 μ g / mLのブラストサイジンで10日間選択した。CD16bを安定的に発現するCHO細胞を、1.2 μ g / mLの抗ヒトCD16 s c F vを含む7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 または陰性対照として抗ヒトCD16 s c F vを含まない18 t 1 5 - 1 2 sで染色し、その後、ビオチン化抗ヒト組織因子およびPE結合ストレプトアビジンで染色した。図77Aに示されるように、抗ヒトCD16s c F vを含む7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 のみが細胞を染色した。図77Bに示されるように、18 t 1 5 - 1 2 sは、ヒトCD16bを発現するCHO細胞を染色しなかった。

10

20

30

40

50

【1029】

ELISAを使用した7t15-16s21におけるIL-15、IL-21、およびIL-7の検出

96ウェルプレートにR5（コーティング緩衝液）中100μL（8μg/mL）の抗TF IgG1でコーティングし、室温（RT）で2時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、PBS中100μLの1%BSAでブロックした。連続希釈の7t15-16s21（1：3比）をウェルに添加し、室温で60分間インキュベートした。3回洗浄した後、50ng/mLのビオチン化抗IL15抗体（BAM247、R&D Systems）、500ng/mLのビオチン化抗IL-21抗体（13-7218-81、R&D Systems）、または500ng/mLのビオチン化抗IL-7抗体（506602、R&D Systems）をウェルと室温で60分間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、0.25μg/mLのHRP-SA（Jackson ImmunoResearch）と100μL/ウェルで、室温で30分間インキュベートし、その後、4回洗浄し、100μLのABTSと室温で2分間インキュベートした。吸光度を405nmで読み取った。図78A～78Cに示されるように、7t15-16s21中のIL-15ドメイン、IL-21ドメイン、およびIL-7ドメインを個々の抗体によって検出した。

10

【1030】

7t15-16s21におけるIL-15は、IL-2Rβおよび共通γ鎖含有32Dβ細胞の増殖を促進する

20

7t15-16s21におけるIL-15の活性を分析するために、7t15-16s21のIL-15活性を、IL2Rβおよび共通γ鎖を発現する32Dβ細胞を使用して組換えIL-15と比較し、細胞増殖の促進に対するそれらの効果を評価した。IL-15依存性32Dβ細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、 2×10^4 細胞/ウェルでウェル中に播種した。連続希釈した7t15-16s21またはIL-15を細胞に添加した（図79）。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で3日間インキュベートした。3日目に10μLのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。生成されたホルマザン色素の量を分析することにより、吸光度を450nmで測定した。図79に示されるように、7t15-16s21およびIL-15は32Dβ細胞増殖を促進し、7t15-16s21およびIL-15のEC50は、それぞれ、172.2pMおよび16.63pMであった。

30

【1031】

抗TF抗体親和性カラムからの7t15-16s21の精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集した7t15-16s21を、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。次いで、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸（pH2.9）で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5～8.0に中和した。中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図80は、抗TF抗体樹脂への結合およびその上での溶出後の7t15-16s21タンパク質含有細胞培養上清のクロマトグラフィープロファイルを示す線グラフである。図80に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、TFを含む7t15-16s21に結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2～8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン（pH2.5）を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

40

【1032】

50

7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 の分析的サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析

7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析を行うために、AKTA Avant システム (GE Healthcare) に接続した Superdex 200 Increase 10/300 GL ゲル濾過カラム (GE Healthcare) を使用した。カラムを 2 カラム体積の PBS で平衡化した。流速は 0.7 mL/分であった。PBS 中 7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 を含む試料を、キャピラリーループを使用して Superdex 200 カラムに注入し、SEC によって分析した。図 8 1 に示されるように、SEC 結果は、7 t 1 5 - 1 6 s 2 1 の 2 つのタンパク質ピークを示した。

【1033】

実施例 5 1 : TGF β Rt 1 5 - 1 6 s 2 1 融合タンパク質の生成および特徴付け

抗ヒト CD16 s c F v / I L - 1 5 R α S u / I L 2 1 および TGF β 受容体 I I / T F / I L - 1 5 融合タンパク質を含む融合タンパク質複合体を生成した (図 8 2 および図 8 3)。ヒト TGF β 受容体 I I (I l e 2 4 - A s p 1 5 9)、組織因子 2 1 9、および I L - 1 5 配列を UniProt ウェブサイトから入手し、これらの配列の DNA を Genewiz によって合成した。具体的には、G 4 S (3) リンカーを用いて 2 つの TGF β 受容体 I I 配列を結合して TGF β 受容体 I I の一本鎖バージョンを生成し、その後、組織因子 2 1 9 の N 末端コーディング領域に、続いて、I L - 1 5 の N 末端コーディング領域に直接結合することによって構築物を作製した。

【1034】

組織因子 2 1 9 の N 末端に、続いて、I L - 1 5 の N 末端に結合した 2 つの TGF β 受容体 I I を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1035】

2 つの TGF β 受容体 I I / T F / I L - 1 5 構築物の核酸配列 (シグナルペプチド配列を含む) は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C
T C C A G C G C C T A C T C C

(2 つのヒト TGF β 受容体 I I 断片)

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G
A T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C
T C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A
T C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C
T G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A
A A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A
C C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T
G C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G
G A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G
T A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C
A A C C C T G A T G G A G G T G G C G G A T C C G G A G G T G G A G G T T C T G
G T G G A G G T G G G A G T A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T
G A A T A A T G A C A T G A T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G
A A A T T T C C C C A G C T G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T
C C A C C T G C G A C A A C C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C
C A T C A C C T C C A T C T G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G
G C T G T C T G G C G G A A G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A
C C G T C T G C C A C G A T C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T
C C T G G A A G A C G C C G C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G
A A A A A G A A G C C T G G C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A
G C A G C G A C G A A T G C A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A
A T A C A A T A C C A G C A A C C C C G A C

10

20

30

40

50

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAAACCAACACAGTCGCTGCCTATAAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAAACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCCGATAGCCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

10

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGAAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

20

【1036】

TGFβ受容体II／TF／IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

30

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトTGFβ受容体II)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

40

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

50

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【1037】

抗ヒトCD16scFvをGenewizによって合成したIL-15R α Su鎖のN末端コーディング領域に、続いて、IL-21のN末端コーディング領域に直接結合することによっても構築物を作製した。IL-15R α SuのN末端に、続いて、IL-21のN末端コーディング領域に結合した抗ヒトCD16scFvを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1038】

抗CD16scFv／IL-15R α Su／IL-21構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（抗ヒトCD16scFv）

TCCGAGCTGACCCAGGACCCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGGTGGGCCATGGCGGGCGGGCGGCTCCGGAGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGAGTCCGGAGGAGGAGGTGGTGAGGCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCAACATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGG

（ヒトIL-15R α sushiドメイン）

ATTACATGCCCCCCCTCCCATGAGCGTGAGGCACGCCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGTCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG

（ヒトIL-21）

CAGGGCCAGGACAGGACACATGATCCGGATGAGGCGAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACC TGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC CAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGC CCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCA

10

20

30

40

50

TCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC
【1039】

抗CD16scFv／IL-15R α Su／IL-21構築物のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

（抗ヒトCD16scFv）

SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPG
QAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
DEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTTFDDYGM
VSRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLFDYWGQGTLVTVSR

（ヒトIL-15R α sushiドメイン）

ITCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R

（ヒトIL-21）

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPP
STNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMI
HQHLS SRTHGSEDS

【1040】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1041】

抗CD16scFv／IL-15R α Su／IL-21構築物およびTGFR／TF／IL-15構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし（Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72）、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性TGFR／TF／IL-15：CD16scFv／IL-15R α Su／IL-21タンパク質複合体（TGFRt15-16s21と称する）の形成および分泌が可能になり、これを抗TF IgG1ベースの親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1042】

TGFRt15-16s21とヒトCD16bを発現するCHO細胞との間の相互作用

CHO細胞をpMCプラスミド中のヒトCD16bでトランスフェクトし、10 μ g/mLのプラストサイジンで10日間選択した。CD16bを安定的に発現する細胞を、1.2 μ g/mLの抗ヒトCD16scFvを含むTGFRt15-16s21または陰性対照として抗ヒトCD16scFvを含まない7t15-21sで染色し、ビオチン化抗ヒト組織因子抗体およびPE結合ストレプトアビジンで染色した。図84Aおよび84Bに示されるように、抗ヒトCD16scFvを含むTGFRt15-16s21が陽性結合を示した一方で、7t15-21sは結合を示さなかった。

【1043】

HEK-Blue TGF β 細胞におけるTGF β 1活性に対するTGFRt15-16s21の効果

TGFRt15-16s21中のTGF β RIIの活性を評価するために、HEK-B

10

20

30

40

50

Blue TGFβ細胞におけるTGFβ1活性に対するTGFβRt15-16s21の効果
を分析した。HEK-Blue TGFβ細胞 (InvivoGen) を予熱したPBSで2回洗浄し、試験培地 (DMEM、10%熱不活性化FCS、1×グルタミン、1×
抗-抗、および2×グルタミン) 中に 5×10^5 細胞/mLで再懸濁した。平底96ウェ
ルプレート中、50μLの細胞を各ウェルに添加し (2.5×10^4 細胞/ウェル)、そ
の後、50μLの0.1nM TGFβ1 (R&D systems) を添加した。その後
、1:3連続希釈で調製したTGFβRt15-16s21またはTGFβR-Fc (R&D
Systems) をプレートに添加して、総量を200μLにした。37℃で24時間イン
キュベートした後、40μLの誘導されたHEK-Blue TGFβ細胞上清を平底
96ウェルプレート中の160μLの予熱したQUANT-Blue (InvivoGen) に添加し、37℃で1~3時間インキュベートした。その後、OD値を、プレート
リーダー (Multiscan Sky) を使用して620~655nmで決定した。各
タンパク質試料のIC₅₀を、GraphPad Prism 7.04を用いて計算した
。TGFβRt15-16s21およびTGFβR-FcのIC₅₀は、それぞれ、9127
pMおよび460.6pMであった。これらの結果は、TGFβRt15-16s21中の
TGFβRIIドメインがHEK-Blue TGFβ細胞におけるTGFβ-1活性を
遮断することができたことを示した。

【1044】

TGFβRt15-16s21におけるIL-15は、IL-2Rβおよび共通γ鎖含有3
2Dβ細胞の増殖を促進する

TGFβRt15-16s21におけるIL-15の活性を分析するために、TGFβRt
15-16s21のIL-15活性を、IL2Rβおよび共通γ鎖を発現する32Dβ細
胞を使用して組換えIL-15と比較し、細胞増殖の促進に対するそれらの効果を評価し
た。IL-15依存性32Dβ細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、 2×10^4
細胞/ウェルでウェル中に播種した。連続希釈したTGFβRt15-16s21またはIL
-15を細胞に添加した (図86)。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で3
日間インキュベートした。3日目に10μLのWST1を各ウェルに添加し、CO₂イン
キュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検
出した。生成されたホルマザン色素の量を分析することにより、吸光度を450nmで測
定した。データを図85に示す。図86に示されるように、TGFβRt15-16s21
およびIL-15は32Dβ細胞増殖を促進し、TGFβRt15-16s21およびIL
-15のEC₅₀は、それぞれ、51298pMおよび10.63pMであった。

【1045】

ELISAを使用したTGFβRt15-16s21におけるIL-15、IL-21、お
よびTGFβRIIの検出

96ウェルプレートをR5 (コーティング緩衝液) 中100μL (8μg/mL) の抗
TF IgG1でコーティングし、室温 (RT) で2時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、PBS中100μLの1%BSAでブロックした。1:3比で連続希釈し
たTGFβRt15-16s21を添加し、室温で60分間インキュベートした。3回洗浄
した後、50ng/mLのビオチン化抗IL-15抗体 (BAM247、R&D Systems)、500ng/mLのビオチン化抗IL-21抗体 (13-7218-81、
R&D Systems)、または200ng/mLのビオチン化抗TGFβRII抗体
(BAF241、R&D Systems) をウェル毎に適用し、室温で60分間インキ
ュベートした。3回洗浄した後、0.25μg/mLのHRP-SA (Jackson
ImmunoResearch) と100μL/ウェルで、室温で30分間インキュベート
し、その後、4回洗浄し、100μLのABTSと室温で2分間インキュベートした。吸
光度を405nmで読み取った。図87A~87Cに示されるように、TGFβRt15-
16s21中のIL-15ドメイン、IL-21ドメイン、およびTGFβRIIドメイ
ンをそれぞれの抗体によって検出した。

【1046】

抗TF抗体親和性カラムを使用したTGFRt15-16s21の精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集したTGFRt15-16s21を、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図88に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、融合パートナーとして組織因子を含むTGFRt15-16s21に結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

【1047】

TGFRt15-16s21の還元SDS-PAGE

TGFRt15-16s21タンパク質の純度および分子量を決定するために、抗TF抗体親和性カラムで精製したタンパク質試料を、還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル(4~12%NuPageビスートリスゲル)電気泳動(SDS-PAGE)によって分析した。電気泳動後、ゲルをInstantBlueで約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。

【1048】

TGFRt15-16s21タンパク質がCHO細胞において翻訳後にグリコシル化を受けることを検証するために、脱グリコシル化実験を、New England Biolabs製のProtein Deglycosylation Mix IIキットを製造業者の指示に従って使用して実施した。図89は、非脱グリコシル化状態(赤色の縁内のレーン1)および脱グリコシル化状態(黄色の縁内のレーン2)での試料の還元SDS-PAGE分析の結果を示す。結果は、TGFRt15-16s21タンパク質がCHO細胞で発現されるとグリコシル化されることを示した。脱グリコシル化後、精製した試料は、還元SDSゲル中で予想された分子量(69kDaおよび48kDa)を示した。レーンMには、10μLのSeeBlue Plus2 Prestained Standardをロードした。

【1049】

実施例52: 7t15-7s融合タンパク質の生成および特徴付け

IL-7/TF/IL-15融合タンパク質およびIL-7/IL-15RαSu融合タンパク質を含む融合タンパク質複合体を生成した(図90および図91)。ヒトIL-7、組織因子219、およびIL-15配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。具体的には、IL-7配列を組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、IL-15のN末端コーディング領域に結合することによって構築物を作製した。

【1050】

組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合したIL-7を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1051】

7t15構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL7)

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAG

10

20

30

40

50

AGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCA
TGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAA
CTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGC
ATGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGGCAGTTCC
TGAAGATGAACCTCCACCGGCGACTTTCGACCTGCACCTGCT
GAAGGTGTCCGAGGGGCACCACCATCCTGCTGAACCTGCACC
GGACAGGTGAAGGGCCGGAACCTGCTGCTCTGGGAGAGG
CCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAA
GGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGG
CTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGA
TGGGCGACCAAGGAGCAT

10

(ヒト組織因子219)

AGCGGCGACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAAAC
CCAAACCCGTTAACCAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

20

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAA
TCATTTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

30

【1052】

7 t 15 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFS SAYS

(ヒトIL7)

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEF
NFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHL
LKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL
KEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMG TKEH

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS

40

50

TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【1053】

IL-7 配列を Genewiz によって合成した IL-15R α Su 鎖の N 末端コーディング領域に連結することによっても構築物を作製した。IL-15R α Su 鎖の N 末端に結合した IL-7 を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1054】

7 s 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL7)

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAG
AGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCA
TGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAA
CTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGGAGGGC
ATGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCC
TGAAGATGAACTCCACC GGCGACTTCGACCTGCACCTGCT
GAAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACC
GGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGG
CCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAAACAAGTCCCTGAA
GGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGG
CTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGA
TGGGCACCAAGGAGCAT

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGGCACCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

【1055】

7 s 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL7)

DCDIEGKDQKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEF
NFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHL
LKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL
KEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIR

【1056】

10

20

30

40

50

IL-7/TF/IL-15構築物およびIL-7/IL-15R α Su構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし (Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72)、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、7t15-7sと称する可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-7/IL-15R α Suタンパク質複合体の形成および分泌が可能になり、これを抗TF抗体IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

10

【1057】

抗TF抗体親和性カラムを使用した7t15-7sの精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集した7t15-7sを、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図92に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、融合パートナーとして組織因子(TF)を含む7t15-7sに結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

20

【1058】

C57BL/6マウスにおける7t15-7sの免疫刺激

7t15-7sは、ヒトIL-7、ヒト組織因子219断片、およびヒトIL-15の可溶性融合物(7t15)である第1のポリペプチドと、ヒトIL-7およびヒトIL-15受容体アルファ鎖のsushiドメインの可溶性融合物(7s)である第2のポリペプチドとを含む多鎖ポリペプチド(本明細書に記載のタイプA多鎖ポリペプチド)である。

30

【1059】

CHO細胞を、IL7-TF-IL15(7t15)およびIL7-IL-15R α sushiドメイン(7s)ベクターで共トランスフェクトした。7t15-7s複合体を、トランスフェクトしたCHO細胞培養上清から精製した。図93に示されるように、複合体中のIL-7、IL-15、および組織因子(TF)成分をELISAによって実証した。ヒト化抗TF抗体モノクローナル抗体(抗TF IgG1)を捕捉抗体として使用して、7t15-7s中のTFを決定し、ビオチン化抗ヒトIL-15抗体(R&D systems)およびビオチン化抗ヒトIL-7抗体(R&D Systems)を検出抗体として使用して、それぞれ、7t15-7s中のIL-15およびIL-7を検出し、その後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Jackson ImmunoResearch Lab)およびABTS基質(Surmodics IVD, Inc.)を使用した。

40

【1060】

7t15-7sを、C57BL/6マウスに10mg/kgで皮下注射し、インビボでの7t15-7sの免疫刺激活性を測定した。PBSで皮下処理したC57BL/6マウスを対照として使用した。マウスの脾臓を収集し、処理後4日目に秤量した。単一脾細胞懸濁液を調製し、蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1抗体で、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、およびNK細胞のパーセンテージをフローサイトメトリー

50

によって分析した。結果は、7 t 1 5 - 7 s が脾臓重量に基づいて脾臓細胞を拡大するのに効果的であり（図 9 4 A）、具体的には、CD 8⁺ T 細胞と NK 細胞のパーセンテージが対照処理マウスと比較して高かったことを示した（図 9 4 B）。

【1 0 6 1】

実施例 5 3：T G F R t 1 5 - T G F R s 融合タンパク質の生成および特徴付け

T G F β 受容体 I I / I L - 1 5 R α S u 融合タンパク質および T G F β 受容体 I I / T F / I L - 1 5 融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した（図 9 5 および図 9 6）。ヒト T G F β 受容体 I I（I l e 2 4 - A s p 1 5 9）、組織因子 2 1 9、および I L - 1 5 配列を U n i P r o t ウェブサイトから入手し、これらの配列の DNA を G e n e w i z によって合成した。具体的には、G 4 S（3）リンカーを用いて 2 つの T G F β 受容体 I I 配列を結合して T G F β 受容体 I I の一本鎖バージョンを生成し、その後、組織因子 2 1 9 の N 末端コーディング領域に、続いて、I L - 1 5 の N 末端コーディング領域に直接結合することによって構築物を作製した。

【1 0 6 2】

組織因子 2 1 9 の N 末端に、続いて、I L - 1 5 の N 末端に結合した 2 つの T G F β 受容体 I I を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1 0 6 3】

2 つの T G F β 受容体 I I / T F / I L - 1 5 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C
T C C A G C G C C T A C T C C

（2 つのヒト T G F β 受容体 I I 断片）

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G
A T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C
T C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A
T C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C
T G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A
A A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A
C C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T
G C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G
G A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G
T A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C
A A C C C T G A T G G A G G T G G C G G A T C C G G A G G T G G A G G T T C T G
G T G G A G G T G G G A G T A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T
G A A T A A T G A C A T G A T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G
A A A T T T C C C C A G C T G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T
C C A C C T G C G A C A A C C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C
C A T C A C C T C C A T C T G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G
G C T G T C T G G C G G A A G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A
C C G T C T G C C A C G A T C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T
C C T G G A A G A C G C C G C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G
A A A A A G A A G C C T G G C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A
G C A G C G A C G A A T G C A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A
A T A C A A T A C C A G C A A C C C C G A C

（ヒト組織因子 2 1 9）

A G C G G C A C A A C C A A C A C A G T C G C T G C C T A T A A C C T C A C T
T G G A A G A G C A C C A A C T T C A A A A C C A T C C T C G A A T G G G A A C
C C A A A C C C G T T A A C C A A G T T T A C A C C G T G C A G A T C A G C A C
C A A G T C C G G C G A C T G G A A G T C C A A A T G T T T C T A T A C C A C C

10

20

30

40

50

GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【1064】

TGFβ受容体II／TF／IL-15融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトTGFβ受容体II)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC
HDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCCHDPKLPYHDF
ILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVTN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【1065】

2つのTGFβ受容体IIをGenewizによって合成したIL-15RαSu鎖に

10

20

30

40

50

直接結合することによっても構築物を作製した。IL-15R α SuのN末端に結合したTGF β 受容体IIを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1066】

TGF β 受容体II／IL-15R α Su構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（2つのヒトTGF β 受容体II断片）

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATG
ATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGC
TCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAA
TCAGAAGTCTTGCAATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATC
TGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGA
AAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGA
CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTG
GTGGAGGTGGGAGTATTCTCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGT
GAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTG
AAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTT
CCACCTGCGACAACCAGAAAGTCTGTATGAGCAACTGCTC
CATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTG
GCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAA
CCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCAT
CCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAG
AAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCA
GCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

（ヒトIL-15R α sushiドメイン）

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCA
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

【1067】

2つのTGF β 受容体II／IL-15R α Su構築物のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

（2つのヒトTGF β 受容体II細胞外ドメイン）

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCH
DPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDF
ILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE

10

20

30

40

50

E Y N T S N P D

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T
S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R

【1068】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1069】

TGF β R/IL-15R α Su構築物およびTGF β R/TF/IL-15構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし(Hughes MS, Yu Y, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72)、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性TGF β R/TF/IL-15:TGF β R/IL-15R α Suタンパク質複合体(TGFRt15-TGFRsと称する)の形成および分泌が可能になり、これを抗TF IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1070】

HEK-Blue TGF β 細胞におけるTGF β 1活性に対するTGFRt15-TGFRsの効果

TGFRt15-TGFRs中のTGF β RIIの活性を評価するために、HEK-Blue TGF β 細胞におけるTGF β 1活性に対するTGFRt15-16s21の効果进行分析した。HEK-Blue TGF β 細胞(Invivogen)を予熱したPBSで2回洗浄し、試験培地(DMEM、10%熱不活性化FCS、1 $\times$ グルタミン、1 $\times$ 抗-抗、および2 $\times$ グルタミン)中に5 $\times$ 10⁵細胞/mLで再懸濁した。平底96ウェルプレート中、50 μ Lの細胞を各ウェルに添加し(2.5 $\times$ 10⁴細胞/ウェル)、その後、50 μ Lの0.1nM TGF β 1(R&D systems)を添加した。その後、1:3連続希釈で調製したTGFRt15-16s21またはTGFR-Fc(R&D Systems)をプレートに添加して、総量を200 μ Lにした。37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした後、40 μ Lの誘導されたHEK-Blue TGF β 細胞上清を平底96ウェルプレート中の160 μ Lの予熱したQUANT-Blue(Invivogen)に添加し、37 $^{\circ}$ Cで1~3時間インキュベートした。その後、OD値を、プレートリーダー(Multiscan Sky)を使用して620~655nmで決定した(図97)。各タンパク質試料のIC₅₀を、GraphPad Prism 7.04を用いて計算した。TGFRt15-TGFRsおよびTGFR-FcのIC₅₀は、それぞれ、216.9pMおよび460.6pMであった。これらの結果は、TGFRt15-TGFRs中のTGF β RIIドメインがHEK-Blue TGF β 細胞におけるTGF β 1活性を遮断することができたことを示した。

【1071】

TGFRt15-TGFRs中のIL-15は、IL-2R β および共通 γ 鎖含有32D β 細胞の増殖を促進する

TGFRt15-TGFRs中のIL-15の活性を評価するために、TGFRt15-TGFRsのIL-15活性を、IL2R β および共通 γ 鎖を発現する32D β 細胞を使用して組換えIL-15と比較し、細胞増殖の促進に対するそれらの効果を評価した。IL-15依存性32D β 細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、2 $\times$ 10⁴細胞/ウェルでウェル中に播種した。連続希釈したTGFRt15-TGFRsまたはIL-15を細胞に添加した(図98)。細胞をCO₂インキュベーター内で、37 $^{\circ}$ Cで3日間

10

20

30

40

50

インキュベートした。3日目に10 μ LのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。生成されたホルマザン色素の量を分析することにより、吸光度を450nmで測定した。図98に示されるように、TGFRt15-TGFRsおよびIL-15は32D β 細胞増殖を促進し、TGFRt15-16s21およびIL-15のEC₅₀は、それぞれ、1901pMおよび10.63pMであった。

【1072】

ELISAを使用した対応する抗体を用いたTGFRt15-TGFRs中のIL-15ドメインおよびTGF β RIIドメインの検出

96ウェルプレートにR5（コーティング緩衝液）中100 μ L（8 μ g/mL）の抗TF IgG1でコーティングし、室温（RT）で2時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、PBS中100 μ Lの1%BSAでブロックした。TGFRt15-TGFRsを1：3連続希釈で添加し、室温で60分間インキュベートした。3回洗浄した後、50ng/mLのビオチン化抗IL-15抗体（BAM247、R&D Systems）または200ng/mLのビオチン化抗TGF β RII抗体（BAF241、R&D Systems）をウェルに添加し、室温で60分間インキュベートした。次いで、プレートを3回洗浄し、0.25 μ g/mLのHRP-SA（Jackson Immuno Research）を100 μ L/ウェルで添加し、室温で30分間インキュベートし、その後、4回洗浄し、100 μ LのABTSと室温で2分間インキュベートした。吸光度を405nmで読み取った。図99Aおよび99Bに示されるように、TGFRt15-TGFRs中のIL-15ドメインおよびTGF β RIIドメインを個々の抗体によって検出した。

【1073】

抗TF抗体親和性カラムからのTGFRt15-TGFRsの精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集したTGFRt15-TGFRsを、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸（pH2.9）で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5～8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図100に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、融合パートナーとしてTFを含むTGFRt15-TGFRsに結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2～8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン（pH2.5）を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

【1074】

TGFRt15-TGFRsの分析的サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析

Superdex 200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラム（GE Healthcare製）をAKTA Avantシステム（GE Healthcare製）に接続した。カラムを2カラム体積のPBSで平衡化した。流速は0.7mL/分であった。PBS中TGFRt15-TGFRsを含む試料を、キャピラリーループを使用してSuperdex 200カラムに注入し、SECによって分析した。試料のSECクロマトグラフを図101に示す。SECの結果は、TGFRt15-TGFRsの4つのタンパク質ピークを示した。

【1075】

TGFRt15-TGFRsの還元SDS-PAGE分析

TGFRt15-TGFRsタンパク質の純度および分子量を決定するために、抗TF抗体親和性カラムで精製したタンパク質試料を、還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポ

10

20

30

40

50

リアクリルアミドゲル（4～12% NuPageビストリスゲル）電気泳動（SDS-PAGE）法によって分析した。電気泳動後、ゲルをInstant Blueで約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。

【1076】

TGFRt15-TGFRsタンパク質がCHO細胞において翻訳後にグリコシル化を受けることを検証するために、脱グリコシル化実験を、New England Biolabs製のProtein Deglycosylation Mix IIキットおよび製造業者の指示を使用して実施した。図102は、非脱グリコシル化状態（赤色の縁内のレーン1）および脱グリコシル化状態（黄色の縁内のレーン2）での試料の還元SDS-PAGE分析を示す。結果は、TGFRt15-TGFRsタンパク質がCHO細胞で発現されるとグリコシル化されることを示した。脱グリコシル化後、精製した試料は、還元SDSゲル中で予想された分子量（69 kDaおよび39 kDa）を示した。レーンMには、10 μ LのSeeBlue Plus2 Prestained Standardをロードした。

【1077】

C57BL/6マウスにおけるTGFRt15-TGFRsの免疫刺激活性

TGFRt15-TGFRsは、2つのTGFBRIIDメイン、ヒト組織因子219断片、およびヒトIL-15の可溶性融合物である第1のポリペプチドと、2つのTGFBRIIDメインおよびヒトIL-15受容体アルファ鎖のsushiドメインの可溶性融合物である第2のポリペプチドとを含む多鎖ポリペプチド（本明細書に記載のタイプA多鎖ポリペプチド）である。

【1078】

野生型C57BL/6マウスを、対照溶液、または0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、もしくは10 mg/kgの投薬量のTGFRt15-TGFRsのいずれかで皮下処理した。処理の4日後、脾臓の重量および脾臓に存在する様々な免疫細胞型のパーセンテージを評価した。図103Aに示されるように、TGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける脾臓の重量は、TGFRt15-TGFRsの投薬量の増加とともに増加した。さらに、1 mg/kg、3 mg/kg、および10 mg/kgのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける脾臓の重量は、それぞれ、対照溶液で処理したマウスと比較して高かった。加えて、対照処理マウスおよびTGFRt15-TGFRs処理マウスの脾臓に存在するCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、NK細胞、およびCD19⁺ B細胞のパーセンテージを評価した。図103Bに示されるように、TGFRt15-TGFRsで処理したマウスの脾臓では、CD8⁺ T細胞およびNK細胞の両方のパーセンテージが、TGFRt15-TGFRsの投薬量の増加とともに増加した。具体的には、CD8⁺ T細胞のパーセンテージは、対照処理マウスと比較して、0.3 mg/kg、3 mg/kg、および10 mg/kgのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスで高く、NK細胞のパーセンテージは、対照処理マウスと比較して、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、および10 mg/kgのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスで高かった。これらの結果は、TGFRt15-TGFRsが、脾臓中の免疫細胞、特にCD8⁺ T細胞およびNK細胞を刺激することができることを示す。

【1079】

TGFRt15-TGFRs分子の薬物動態を、野生型C57BL/6マウスで評価した。マウスを、3 mg/kgの投薬量のTGFRt15-TGFRsで皮下処理した。マウスの血液を様々な時点で尾静脈から排出し、血清を調製した。マウス血清中のTGFRt15-TGFRs濃度を、ELISAを用いて測定した（捕捉：抗ヒト組織因子抗体、検出：ビオチン化抗ヒトTGFBRI受容体抗体、その後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンおよびABTS基質）。結果は、C57BL/6マウスにおけるTGFRt15-TGFRsの半減期が12.66時間であることを示した。

【1080】

マウスにおける $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ の免疫刺激活性を経時的に評価するために、マウス脾細胞を調製した。図 104A に示されるように、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ で処理したマウスの脾臓重量は、処理後 48 時間時点で増加し、経時的に増加し続けた。加えて、対照処理マウスおよび $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ 処理マウスの脾臓に存在する $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞、NK 細胞、および $CD19^+$ B 細胞のパーセンテージを評価した。図 104B に示されるように、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ で処理したマウスの脾臓では、 $CD8^+$ T 細胞および NK 細胞の両方のパーセンテージが処理後 48 時間時点で増加し、単回投与処理後に経時的に高くなった。これらの結果は、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ が、脾臓中の免疫細胞、特に $CD8^+$ T 細胞および NK 細胞を刺激することができることをさらに示す。

10

【1081】

さらに、脾細胞の $Ki67$ 発現に基づく免疫細胞の動的増殖およびグランザイム B 発現に基づく細胞傷害性の潜在性を、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ の単回投与 ($3\text{mg}/\text{kg}$) 後にマウスから単離した脾細胞で評価した。図 105A および 105B に示されるように、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ で処理したマウスの脾臓では、NK 細胞による $Ki67$ およびグランザイム B の発現は処理後 24 時間時点で増加し、 $CD8^+$ T 細胞および NK 細胞の発現はいずれも単回投与処理後 48 時間およびその後の時点で増加した。これらの結果は、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ が $CD8^+$ T 細胞および NK 細胞の数を増加させるのみならず、これらの細胞の細胞傷害性も増強することを示す。 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ の単回投与処理により、 $CD8^+$ T 細胞および NK 細胞が少なくとも 4 日間増殖した。

20

【1082】

腫瘍細胞に対する $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ 処理マウス由来の脾細胞の細胞傷害性も評価した。マウスモロニー-Moloney 白血病細胞 ($Yac-1$) を $CellTrace\ Violet$ で標識し、腫瘍標的細胞として使用した。脾細胞を、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ ($3\text{mg}/\text{kg}$) で処理したマウス脾臓から処理後の様々な時点で調製し、エフェクター細胞として使用した。標的細胞をエフェクター細胞と E:T 比 10:1 で混合し、 37°C で 20 時間インキュベートした。フローサイトメトリーを使用したヨウ化プロピジウム陽性のバイオレット標識 $Yac-1$ 細胞の分析により、標的細胞の生存率を評価した。 $Yac-1$ 腫瘍阻害のパーセンテージを、式 $(1 - [\text{実験試料中の生存 } Yac-1 \text{ 細胞数}] / [\text{脾細胞を含まない試料中の生存 } Yac-1 \text{ 細胞数}]) \times 100$ を使用して計算した。図 106 に示されるように、 $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ で処理したマウス由来の脾細胞は、対照マウス脾細胞よりも $Yac-1$ 細胞に対してより強い細胞傷害性を有した。

30

【1083】

化学療法および／または $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ に応答した腫瘍サイズ分析

脾臓癌細胞 (SW1990、ATCC (登録商標) CRL-2172) を C57BL/6 scid マウス (The Jackson Laboratory、001913、 2×10^6 細胞/マウス、 $100\mu\text{L}$ の HBSS 中) に皮下 (s.c.) 注射して、脾臓癌マウスモデルを確立した。腫瘍細胞注射の 2 週間後、アブラキサン (Celgene、68817-134、 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、腹腔内) とゲムシタピン (Sigma Aldrich、G6423、 $40\text{mg}/\text{kg}$ 、腹腔内) との組み合わせを用いた化学療法をこれらのマウスに腹腔内で開始し、続いて、2 日後に $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ ($3\text{mg}/\text{kg}$ 、皮下注射) を用いた免疫療法を行った。上記の手順を 1 つの処理サイクルとみなし、さらに 3 サイクル (1 サイクル/週) 繰り返した。対照群を、PBS、化学療法 (ゲムシタピンおよびアブラキサン)、または $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ のみを受けた SW1990 注射マウスとして設定した。処理サイクルに加えて、各動物の腫瘍サイズを、SW1990 細胞を注射した 2 か月後に実験を終了するまで 1 日おきに測定および記録した。腫瘍体積の測定を群毎に分析し、結果は、化学療法と $TGF\alpha$ $15-TGF\alpha$ との組み合わせを受けた動物が PBS 群と比較して有意に小さい腫瘍を有した一方で、化学療法も T

40

50

GFRt15-TGFRs療法も単独では組み合わせほどには十分に機能しないことを示した(図107)。

【1084】

インビトロ老化B16F10黒色腫モデル

次に、活性化マウスNK細胞による老化B16F10黒色腫細胞のインビトロ死滅を評価した。B16F10老化細胞(B16F10-SNC)細胞をCellTrace violetで標識し、異なるE:T比のインビトロ2t2活性化マウスNK細胞(TGFRt15-TGFRsを10mg/kgで4日間注射したC57BL/6マウスの脾臓から単離したもの)と16時間インキュベートした。細胞をトリプシン処理し、洗浄し、ヨウ化プロピジウム(PI)溶液を含有する完全培地中に再懸濁した。細胞傷害性をフローサイトメトリーによって評価した(図108)。

10

【1085】

実施例54:7t15-21s137L(ロングバージョン)融合タンパク質の作製および特徴付け

IL-21/IL-15RαSu/CD137L融合タンパク質およびIL-7/TF/IL-15融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した(図109および図110)。具体的には、IL-7配列を組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、IL-15のN末端コーディング領域に結合することによって構築物を作製した。組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合したIL-7を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

20

【1086】

7t15構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL7)

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAA

CTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCTGTTCAGGGCCGCCAGGAACCTGCGGCAGTTCTCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCAACCAAGGAGCAT

30

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGACAGATCAGCACAAAGTCCGGCGACTGGAAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT

40

50

TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCT
CTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTT
TCAGCGGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGGTGAATAG
GAAAAGCACCCGATAGCCCCGTTGAGTG CATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGAAATTTAA
TCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【1087】

7 t 15 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。
(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL7)

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQL L D S M K E I G S N C L N N E F
N F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L R Q F L K M N S T G D F D L H L
L K V S E G T T I L L N C T G Q V K G R K P A A L G E A Q P T K S L E E N K S L
K E Q K K L N D L C F L K R L L Q E I K T C W N K I L M G T K E H

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

【1088】

21 s 137 Lの核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。21 s 137 L 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
TCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL-21)

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCGAGCTC
ATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACC
TGGTGCCCGAGTTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGAC
CAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
CAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCA
TCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTC
CACAAACGCCGGCAGGAGGCGAGAAGCACAGGCTGACCTGC

10

20

30

40

50

CCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGT
TCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCA
TCAGCACCTGTCTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC
(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCA
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG

((G4S)3リンカー)

GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGGCGGA
GGATCT

(ヒトCD137L)

CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGC
CTCTTGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGG
CCCAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTA
CAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCTGACGGGGGGC
CTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCA
AGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCG
GCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTT
GCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCG
CCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCCTCCTC
CGAGGCTCGGAACCTCGGCCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTG
CTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTC
ACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCA
GGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAA
ATCCCAGCCGGACTCCCTTCAACCGAGGTCTGGAA

【1089】

21s137L融合タンパク質のアミノ酸配列(リーダー配列を含む)は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-21)

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPP
STNAGR RQKHRLTCPS CDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI
HQHLS SRTHGSEDS

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCI R

((G4S)3リンカー)

GGGGSGGGGS GGGGS

(ヒトCD137L)

REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSW
YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL
RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS
SEARNSAFGFQGRLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT
QGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

【1090】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性で

10

20

30

40

50

あり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1091】

IL-21/IL-15R α Su/CD137L構築物およびIL-7/TF/IL-15構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし (Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72)、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15R α Su/CD137Lタンパク質複合体 (7t15-21s137Lと称する) の形成および分泌が可能になり、これを抗TF抗体IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1092】

抗TF抗体親和性カラムを使用した7t15-21s137Lの精製溶出クロマトグラフ細胞培養物から収集した7t15-21s137Lを、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸 (pH 2.9) で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH 7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図111に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、融合パートナーとしてTFを含む7t15-21s137Lに結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン (pH 2.5) を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。図112は、7t15-21s137Lの分析的SECプロファイルを示す。

【1093】

実施例55: 7t15-21s137L (ショートバージョン) 融合タンパク質の生成および特徴付け

IL-21/IL-15R α Su/CD137L融合タンパク質およびIL-7/TF/IL-15融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した。具体的には、IL-7配列を組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、IL-15のN末端コーディング領域に結合することによって構築物を作製した。組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合したIL-7を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1094】

7t15構築物の核酸配列 (シグナルペプチド配列を含む) は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL7)

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAA

CTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTCAAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCC

TGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCT
GAAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCTGCTGAACTGCACC
GGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGG
CCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAA
GGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGG
CTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGA
TGGGCAACCAAGGAGCAT

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCAAC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【1095】

7 t 15 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL7)

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEF
NFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHL
LKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL
KEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR TVN

10

20

30

40

50

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ヒトIL-21)

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPP
STNAGR RQKHRLT C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I
HQHLS SRTHGSEDS

(ヒトIL-15 R α sushiドメイン)

ITC P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T
S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R

((G4S)3リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(ヒトCD137リガンドショートバージョン)

DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV
SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGS
GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG
FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF
RVTPEI

【1098】

IL-21/IL-15 R α Su/CD137L (ショートバージョン) 構築物および
IL-7/TF/IL-15 構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニ
ングし (Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Rob
bins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene
derived from a patient with a marked antit
umor response conveys highly active T-cell
effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16:
457-72)、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K
1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性IL-7/TF/IL-15:
IL-21/IL-15 R α Su/CD137Lタンパク質複合体 (7t15-21s1
37L (ショートバージョン) と称する) の形成および分泌が可能になり、これを抗TF
抗体IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1099】

7t15-21s137L (ショートバージョン) のCD137 (4.1BB) への結合
1日目に、96ウェルプレートを、R5 (コーティング緩衝液) 中100 μ L (2.5
 μ g/mL) のGAH IgG Fc (G-102-C、R&D Systems) または
R5のみでコーティングし、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。2日目に、プレートを3回
洗浄し、PBS中の1%BSA300 μ Lで37 $^{\circ}$ Cで2時間ブロックした。10ng/mL
の4.1BB/Fc (838-4B、R&D Systems) を100 μ L/ウェル
で添加し、室温で2時間インキュベートした。3回洗浄した後、7t15-21s137
Lまたは7t15-21sを1/3比で連続希釈し (10nMから開始)、4 $^{\circ}$ Cで一晩イ
ンキュベートした。3日目に、3回洗浄した後、300ng/mLのビオチン化抗hTF
抗体 (BAF2339、R&D Systems) を100 μ L/ウェルで添加し、室温
で2時間インキュベートした。次いで、プレートを3回洗浄し、0.25 μ g/mLのH
RP-SA (Jackson ImmuneResearch) と100 μ L/ウェルで
30分間インキュベートし、その後、3回洗浄し、100 μ LのABTSと室温で2分間
インキュベートした。吸光度を405nmで読み取った。図113に示されるように、7
t15-21s137L (ショートバージョン) は、7t15-21sと比較して4.1
BB/Fc (青色の線) との有意な相互作用を示した。

【1100】

ELISAを用いた7t15-21s137L (ショートバージョン) 中のIL-15、
IL-21、およびIL-7の検出

10

20

30

40

50

96ウェルプレートにR5（コーティング緩衝液）中100μL（8μg/mL）の抗TF抗体IgG1でコーティングし、室温で2時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、PBS中100μLの1%BSAでブロックした。1:3比で連続希釈した7t15-21s137L（ショートバージョン）を添加し、室温で60分間インキュベートした。3回洗浄した後、50ng/mLのビオチン化抗IL15抗体（BAM247、R&D Systems）、500ng/mLのビオチン化抗IL21抗体（13-7218-81、R&D Systems）、または500ng/mLのビオチン化抗IL7抗体（506602、R&D Systems）をウェルに添加し、室温で60分間インキュベートした。3回洗浄し、0.25μg/mLのHRP-SA（Jackson ImmunoResearch）と100μL/ウェルで、室温で30分間インキュベートした後、4回洗浄し、100μLのABTSと室温で2分間インキュベートした。吸光度を405nmで読み取った。図114A-114Cに示されるように、7t15-21s137L（ショートバージョン）中のIL-15ドメイン、IL-21ドメイン、およびIL-7ドメインをそれぞれの抗体によって検出した。

【1101】

7t15-1s137L（ショートバージョン）におけるIL-15は、IL2Rαβγ含有CTL細胞の増殖を促進する

7t15-21s137L（ショートバージョン）のIL-15活性を評価するために、7t15-21s137L（ショートバージョン）を、IL2Rαβγを発現するCTL細胞の増殖の促進について組換えIL-15と比較した。IL-15依存性CTL細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、 2×10^4 細胞/ウェルでウェルに播種した。連続希釈した7t15-21s137L（ショートバージョン）またはIL-15を細胞に添加した（図115）。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で3日間インキュベートした。3日目に10μLのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。吸光度を450nmで測定することにより、生成されたホルマザン色素の量を分析した。図115に示されるように、7t15-21s137L（ショートバージョン）およびIL-15は、CTL細胞の増殖を促進した。7t15-21s137L（ショートバージョン）およびIL-15のEC₅₀は、それぞれ、55.91pMおよび6.22pMであった。

【1102】

7t15-1s137L（ショートバージョン）におけるIL-21は、IL21R含有B9細胞の増殖を促進する

7t15-21s137L（ショートバージョン）のIL-21活性を評価するために、7t15-21s137L（ショートバージョン）を、IL-21Rを発現するB9細胞の増殖の促進について組換えIL-21と比較した。IL-21R含有B9細胞をRPMI-10%FBSで5回洗浄し、 1×10^4 細胞/ウェルでウェルに播種した。連続希釈した7t15-21s137L（ショートバージョン）またはIL-21を細胞に添加した（図116）。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で5日間インキュベートした。5日目に10μLのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに4時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。吸光度を450nmで測定することにより、生成されたホルマザン色素の量を分析した。図116に示されるように、7t15-21s137L（ショートバージョン）およびIL-21は、B9細胞の増殖を促進した。7t15-21s137L（ショートバージョン）およびIL-21のEC₅₀は、それぞれ、104.1nMおよび72.55nMであった。

【1103】

実施例56：7t15-TGFRs融合タンパク質の生成および特徴付け

TGFβ受容体II/IL-15RαSu融合タンパク質およびIL-7/TF/IL-15融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した（図117および図118）。ヒトTGFβ受容体II（Ile24-Asp159）、組織因子219、IL-

15、およびIL-7配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。具体的には、IL-7配列を組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、IL-15のN末端コーディング領域に結合することによって構築物を作製した。組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合したIL-7を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1104】

7t15構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

10

（ヒトIL7）

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGGCTCCAACCTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGGCAGTTCTTGAAAGATGAACTCCACCGGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCAACCATCCTGCTGAAGTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT

20

（ヒト組織因子219）

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAACCCGTTAACAAGTTTACACCGTGAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAACACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGGATGTGTTCGGCAAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGGCCAAGAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

30

40

（ヒトIL-15）

AACTGGGTGAACGTTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGAGGAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACAATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG

50

TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【1105】

7 t 1 5 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。
（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

（ヒトIL7）

DCDIEGKDQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEF
NFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHL
LKVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL
KEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH

10

（ヒト組織因子219）

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

（ヒトIL-15）

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS

20

【1106】

2つのTGFβ受容体IIをGenewizによって合成したIL-15RαSu鎖に
直接結合することによっても構築物を作製した。IL-15RαSuのN末端に結合した
TGFβ受容体IIを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1107】

TGFRs構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTC
TCCAGCGCCTACTCC

30

（ヒトTGFβ受容体II断片）

ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATG
ATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGC
TCTGCAAGTTCTGCGATGT CAGGTT CAGCACCTGCGATAA
TCAGAAGTCTCTGCATGTCCA ACTG CAGCATCACCTCCATC
TGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGA
AAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGA
CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCA TTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTT CAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTG
GTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGT
GAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTG
AAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTC TGCGATGTGAGGTTTTT
CCACCTGCGACAACCAGAAGTCTCTGTATGAGCAACTGCTC
CATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTG
GCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAA
CCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCAT
CCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG CATCATGAAGAAGAG

40

50

AAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCA
GCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCAATCCGG

【1108】

TGFRs融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSsays

(ヒトTGF β 受容体II)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDE
CNDNIIFSEEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPMsVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R

【1109】

HEK-Blue TGF β 細胞におけるTGF β 1活性に対する7t15-TGFRsの効果

7t15-TGFRs中のTGF β Rの活性を評価するために、HEK-Blue TGF β 細胞におけるTGF β 1活性に対する7t15-TGFRsの効果进行分析した。HEK-Blue TGF β 細胞(InvivoGen)を予熱したPBSで2回洗浄し、試験培地(DMEM、10%熱不活性化FCS、1×グルタミン、1×抗-抗、および2×グルタミン)中に5×10⁵細胞/mLで再懸濁した。平底96ウェルプレート中、50 μ Lの細胞を各ウェルに添加し(2.5×10⁴細胞/ウェル)、その後、50 μ Lの0.1nM TGF β 1(R&D systems)を添加した。その後、1:3連続希釈で調製した7t15-TGFRsまたはTGFR-Fc(R&D Systems)をプレートに添加して、総量を200 μ Lにした。37℃で24時間インキュベートした後、40 μ Lの誘導されたHEK-Blue TGF β 細胞上清を平底96ウェルプレート中の160 μ Lの予熱したQUANT-Blue(InvivoGen)に添加し、37℃で1~3時間インキュベートした。その後、OD値を、プレートリーダー(Multiscan Sky)を使用して620~655nmで決定した。データを図119に示す。各タンパク質試料のIC₅₀を、GraphPad Prism 7.04を用いて計算した。7t15-TGFRsおよびTGFR-FcのIC₅₀は、それぞれ、1142pMおよび558.6pMであった。これらの結果は、7t15-TGFRs中のTGF β RがHEK-Blue TGF β 細胞におけるTGF β 1活性を遮断することができたことを示した。

【1110】

ELISAを用いた7t15-TGFRs中のIL-15、TGF β RII、およびIL-7の検出

10

20

30

40

50

96ウェルプレートにR5（コーティング緩衝液）中100μL（8μg/mL）の抗TF抗体IgG1でコーティングし、室温（RT）で2時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、PBS中100μLの1%BSAでブロックした。連続希釈の7t15-TGFRs（1：3比）を添加し、室温で60分間インキュベートした。3回洗浄した後、50ng/mLのビオチン化抗IL-15抗体（BAM247、R&D Systems）、200ng/mLのビオチン化抗TGFRα抗体（BAF241、R&D Systems）、または500ng/mLのビオチン化抗IL-7抗体（506602、R&D Systems）を添加し、室温で60分間インキュベートした。3回洗浄した後、0.25μg/mLのHRP-SA（Jackson ImmunoResearch）と100μL/ウェルで、室温で30分間インキュベートし、その後、4回洗浄し、100μLのABTSと室温で2分間インキュベートした。吸光度を405nmで読み取った。図120A～120Cに示されるように、7t15-TGFRs中のIL-15、TGFR、およびIL-7をそれぞれの抗体によって検出した。

10

【1111】

7t15-TGFRs中のIL-15は、IL-2Rβおよび共通γ鎖含有32Dβ細胞の増殖を促進する

7t15-TGFRs中のIL-15の活性を評価するために、7t15-TGFRsを、IL-2Rβおよび共通γ鎖を発現する32Dβ細胞を使用して組換えIL-15と比較し、細胞増殖の促進に対するそれらの効果を評価した。IL-15依存性32Dβ細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、 2×10^4 細胞/ウェルでウェル中に播種した。連続希釈した7t15-TGFRsまたはIL-15を細胞に添加した（図121）。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で3日間インキュベートした。3日目に10μLのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。吸光度を450nmで測定することにより、生成されたホルマザン色素の量を分析した。図121に示されるように、7t15-TGFRsおよびIL-15は32Dβ細胞増殖を促進し、7t15-TGFRsおよびIL-15のEC₅₀は、それぞれ、126nMおよび16.63pMであった。

20

【1112】

抗TF抗体親和性カラムを使用した7t15-TGFRsの精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集した7t15-TGFRsを、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸（pH2.9）で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5～8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図122に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、7t15-TGFRsの融合パートナーとしてTFを含む7t15-TGFRsに結合することができる。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2～8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン（pH2.5）を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

30

40

【1113】

7t15-TGFRsの還元SDS-PAGE分析

タンパク質の純度および分子量を決定するために、抗TF抗体親和性カラムで精製した7t15-TGFRsタンパク質試料を、還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル（4～12%NuPageブーストリスゲル）電気泳動（SDS-PAGE）法によって分析した。電気泳動後、ゲルをInstantBlueで約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。

50

【1114】

7t15-TGFRsタンパク質がCHO細胞において翻訳後にグリコシル化を受けることを検証するために、脱グリコシル化実験を、New England Biolabs製のProtein Deglycosylation Mix IIキットおよび製造業者の指示を使用して実施した。図123は、非脱グリコシル化状態（赤色の縁内のレーン1）および脱グリコシル化状態（黄色の縁内のレーン2）での試料の還元SDS-PAGE分析を示す。これらの結果は、タンパク質がCHO細胞で発現されるとグリコシル化されることを示した。脱グリコシル化後、精製した試料は、還元SDSゲル中で予想された分子量（55kDaおよび39kDa）を示した。レーンMには、10uLのSeeBlue Plus2 Prestained Standardをロードした。

10

【1115】

7t15-TGFRsの特徴付け

7t15-TGFRsは、ヒトIL-7、ヒト組織因子219断片、およびヒトIL-15の可溶性融合物（7t15）である第1のポリペプチドと、一本鎖の2つのTGFBRIIDメインおよびヒトIL-15受容体アルファ鎖のsushiドメインの可溶性融合物（TGFRs）である第2のポリペプチドとを含む多鎖ポリペプチド（本明細書に記載のタイプA多鎖ポリペプチド）である。

【1116】

CHO細胞を、7t15およびTGFRsベクターで共トランスフェクトした。7t15-TGFRs複合体を、トランスフェクトしたCHO細胞培養上清から精製した。図124に示されるように、複合体中のIL-7、IL-15、TGFB受容体、および組織因子（TF）成分をELISAによって実証した。ヒト化抗抗体TFモノクローナル抗体（抗TF抗体IgG1）を捕捉抗体として使用して、7t15-TGFRs中のTFを決定し、ヒトIL-15（R&D systems）、ヒトIL-7（Biolegend）、抗TGFB受容体（R&D Systems）に対するビオチン化抗体を検出抗体として使用して、それぞれ、7t15-TGFRs中のIL-7、IL-15、およびTGFB受容体を決定した。その後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（Jackson ImmunoResearch Lab）およびABTS基質（Surmodics IVD, Inc.）を使用して、結合したビオチン化抗体を検出した。結果をELISAによって分析した（図124）。

20

30

【1117】

C57BL/6マウスにおける7t15-TGFRsのインビボ特徴付け

インビボでの7t15-TGFRsの免疫刺激活性を決定するために、C57BL/6マウスを、対照溶液（PBS）または0.3、1、3、および10mg/kgの7t15-TGFRsで皮下処理した。処理したマウスを安楽死させた。マウスの脾臓を収集し、処理後4日目に秤量した。単一脾細胞懸濁液を調製し、蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1抗体で染色し、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって分析した。結果は、脾臓重量に基づいて、7t15-TGFRsが特に1~10mg/kgで脾臓細胞を増殖させるのに効果的であることを示した（図125A）。CD8⁺ T細胞およびNK細胞のパーセンテージは、試験した全ての用量で対照処理マウスと比較して高かった（図125B）。

40

【1118】

CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞のCD44発現

IL-15がT細胞でのCD44発現およびメモリーT細胞の成長を誘導することが知られている。7t15-TGFRsで処理したマウスにおけるCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞のCD44発現を評価した。C57BL/6マウスを7t15-TGFRsで皮下処理した。脾細胞を、免疫細胞サブセット用の蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、および抗CD44モノクローナル抗体で染色した。総CD4⁺ T細胞のCD4⁺CD44^高 T細胞および総CD8⁺ T細胞のCD8⁺CD44^高 T細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって分析した。図126Aおよび図126Bに示されるように、

50

7 t 1 5 - T G F R s は、C D 4 ⁺ T 細胞および C D 8 ⁺ T 細胞を有意に活性化して、メモリー T 細胞に分化した。

【1119】

さらに、脾細胞の K i 6 7 発現に基づく免疫細胞の動的増殖およびマウスの単回投与処理後に 7 t 1 5 - T G F R s によって誘導された脾細胞のグランザイム B 発現に基づく細胞傷害性の潜在性も評価した。C 5 7 B L / 6 マウスを 3 m g / k g の 7 t 1 5 - T G F R s で皮下処理した。処理したマウスを安楽死させ、脾細胞を調製した。調製した脾細胞を、免疫細胞サブセット用の蛍光色素結合抗 C D 4、抗 C D 8、および抗 N K 1 . 1 (N K) 抗体で染色し、その後、細胞増殖用の抗 K i 6 7 抗体および細胞傷害性マーカー用の抗グランザイム B 抗体で細胞内染色した。対応する免疫細胞サブセットの K i 6 7 およびグランザイム B の平均蛍光強度 (M F I) をフローサイトメトリーによって分析した。図 1 2 7 A および図 1 2 7 B に示されるように、7 t 1 5 - T G F R s で処理したマウスの脾臓では、C D 8 ⁺ T 細胞および N K 細胞による K i 6 7 およびグランザイム B の発現が P B S 対照処理と比較して増加した。これらの結果は、7 t 1 5 - T G F R s が C D 8 ⁺ T 細胞および N K 細胞の数を増加させるのみならず、これらの細胞の潜在的な細胞傷害性も増強することを示す。

【1120】

加えて、腫瘍細胞に対するマウス脾細胞の細胞傷害性も評価した。マウス Y a c - 1 細胞を C e l l T r a c e V i o l e t で標識し、腫瘍標的細胞として使用した。脾細胞を 7 t 1 5 - T G F R s で処理したマウスから調製し、エフェクター細胞として使用した。標的細胞を、1 0 0 n M の 7 t 1 5 - T G F R s を有するまたは有しない R P M I - 1 0 培地中でエフェクター細胞と E : T 比 1 0 : 1 で混合し、3 7 ° C で 2 0 時間インキュベートした。標的 Y a c - 1 細胞阻害を、フローサイトメトリーを使用した生存 v i o l e t 標識 Y a c - 1 細胞の分析によって評価した。Y a c - 1 阻害のパーセンテージを、式 (1 - 実験試料中の生存 Y a c - 1 細胞数 / 脾細胞を含まない試料中の生存 Y a c - 1 細胞数) × 1 0 0 を使用して計算した。図 1 2 8 に示されるように、7 t 1 5 - T G F R s で処理したマウス脾細胞は、対照マウス脾細胞よりも Y a c - 1 細胞に対して強い細胞傷害性を示し、細胞傷害性アッセイ中に 7 t 1 5 - T G F R s を添加することにより、Y a c - 1 標的細胞に対する脾細胞の細胞傷害性がさらに増強された。

【1121】

実施例 5 7 : T G F R t 1 5 - 2 1 s 1 3 7 L 融合タンパク質の生成および特徴付け

I L - 2 1 / I L - 1 5 R α S u / C D 1 3 7 L 融合タンパク質および T G F β 受容体 I I / T F / I L - 1 5 融合タンパク質を含む融合タンパク質複合体を生成した (図 1 2 9 および図 1 3 0) 。ヒト T G F β 受容体 I I (I l e 2 4 - A s p 1 5 9) 、組織因子 2 1 9、および I L - 1 5 配列を U n i P r o t ウェブサイトから入手し、これらの配列の DNA を G e n e w i z によって合成した。具体的には、G 4 S (3) リンカーを用いて 2 つの T G F β 受容体 I I 配列を結合して T G F β 受容体 I I の一本鎖バージョンを生成し、その後、組織因子 2 1 9 の N 末端コーディング領域に、続いて、I L - 1 5 の N 末端コーディング領域に直接結合することによって構築物を作製した。

【1122】

T G F R t 1 5 構築物の核酸配列 (シグナルペプチド配列を含む) は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C
T C C A G C G C C T A C T C C

(ヒト T G F β 受容体 I I 断片)

A T C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G
A T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C
T C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A
T C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C

T G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A
A A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A
C C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T
G C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G
G A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G
T A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C
A A C C C T G A T G G A G G T G G C G G A T C C G G A G G T G G A G G T T C T G
G T G G A G G T G G G A G T A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T
G A A T A A T G A C A T G A T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G
A A A T T T C C C C A G C T G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T
C C A C C T G C G A C A A C C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C
C A T C A C C T C C A T C T G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G
G C T G T C T G G C G G A A G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A
C C G T C T G C C A C G A T C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T
C C T G G A A G A C G C C G C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G
A A A A A G A A G C C T G G C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A
G C A G C G A C G A A T G C A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A
A T A C A A T A C C A G C A A C C C C G A C

(ヒト組織因子219)

A G C G G C A C A A C C A A C A C A G T C G C T G C C T A T A A C C T C A C T
T G G A A G A G C A C C A A C T T C A A A A C C A T C C T C G A A T G G G A A C
C C A A A C C C G T T A A C C A A G T T T A C A C C G T G C A G A T C A G C A C
C A A G T C C G G C G A C T G G A A G T C C A A A T G T T T C T A T A C C A C C
G A C A C C G A G T G C G A T C T C A C C G A T G A G A T C G T G A A A G A T G
T G A A A C A G A C C T A C C T C G C C C G G G T G T T T A G C T A C C C C G C
C G G C A A T G T G G A G A G C A C T G G T T C C G C T G G C G A G C C T T T A
T A C G A G A A C A G C C C C G A A T T T A C C C C T T A C C T C G A G A C C A
A T T T A G G A C A G C C C A C C A T C C A A A G C T T T G A G C A A G T T G G
C A C A A A G G T G A A T G T G A C A G T G G A G G A C G A G C G G A C T T T A
G T G C G G C G G A A C A A C A C C T T T C T C A G C C T C C G G G A T G T G T
T C G G C A A A G A T T T A A T C T A C A C A C T G T A T T A C T G G A A G T C
C T C T T C C T C C G G C A A G A A G A C A G C T A A A A C C A A C A C A A A C
G A G T T T T T A A T C G A C G T G G A T A A A G G C G A A A A C T A C T G T T
T C A G C G T G C A A G C T G T G A T C C C C T C C C G G A C C G T G A A T A G
G A A A A G C A C C G A T A G C C C C G T T G A G T G C A T G G G C C A A G A A
A A G G G C G A G T T C C G G G A G

(ヒトIL-15)

A A C T G G G T G A A C G T C A T C A G C G A T T T A A A G A A G A T C G A A
G A T T T A A T T C A G T C C A T G C A T A T C G A C G C C A C T T T A T A C A
C A G A A T C C G A C G T G C A C C C C T C T T G T A A G G T G A C C G C C A T
G A A A T G T T T T T T A C T G G A G C T G C A A G T T A T C T C T T T A G A G
A G C G G A G A C G C T A G C A T C C A C G A C A C C G T G G A G A A T T T A A
T C A T T T T A G C C A A T A A C T C T T T A T C C A G C A A C G G C A A C G T
G A C A G A G T C C G G C T G C A A G G A G T G C G A A G A G C T G G A G G A G
A A G A A C A T C A A G G A G T T T C T G C A A T C C T T T G T G C A C A T T G
T C C A G A T G T T C A T C A A T A C C T C C

【1123】

T G F R t 15 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ヒトTGFβ受容体II)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEECNDNIIFSE
EYNTSNPD

10

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS

20

【1124】

21s137Lの核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。21s137L構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCT
TCCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL-21)

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTC
ATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACC
TGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGAC
CAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
CAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCA
TCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTC
CACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGC
CCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGT
TCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCA
TCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

30

(ヒトIL-15Rαsushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGAGGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTG CATCCGG

40

((G4S)3リンカー)

GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGA
GGATCT

(ヒトCD137L)

CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGC
CTCTTGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGG

50

CCCAA AATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTA
CAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGGC
CTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCA
AGGCTGGAGTCTACTATGTCTTTCTTTCAACTAGAGCTGCG
GCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTT
GCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCG
CCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCCTCCTC
CGAGGCTCGGAACCTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTG
CTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTC
ACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCA
GGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAA
ATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA

【1125】

21s137L融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

（ヒトIL-21）

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPP
STNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI
HQHLS SRTHGSEDS

（ヒトIL-15R α sushiドメイン）

ITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R

（（G4S）3リンカー）

GGGGS GGGGS GGGGS

（ヒトCD137L）

REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSW
YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL
RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PAS
SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT
QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

【1126】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1127】

IL-21/IL-15R α Su/CD137L構築物およびTGFR/TF/IL-15構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし（Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72）、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性TGFR/TF/IL-15:IL-21/IL-15R α Su/CD137Lタンパク質複合体（TGFRt15-21s137Lと称する）の形成および分泌が可能になり、これを抗TF抗体IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1128】

10

20

30

40

50

抗TF抗体親和性カラムを使用したTGFRt15-21s137Lの精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集したTGFRt15-21s137Lを、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30KDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図131に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、TGFRt15-21s137Lの融合パートナーとしてTFを含むTGFRt15-21s137Lに結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

【1129】

実施例58：TGFRt15-TGFRs21融合タンパク質の生成および特徴付け

TGFβ受容体II/IL-15RαSu/IL-21融合タンパク質およびTGFβ受容体II/TF/IL-15融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した(図132および図133)。ヒトTGFβ受容体II(ILE24-ASP159)、組織因子219、IL-21、およびIL-15配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。具体的には、G4S(3)リンカーを用いて2つのTGFβ受容体II配列を結合してTGFβ受容体IIの一本鎖バージョンを生成し、その後、組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、IL-15のN末端コーディング領域に直接結合することによって構築物を作製した。

【1130】

組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合した2つのTGFβ受容体IIを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1131】

TGFRt15構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトTGFβ受容体II断片)

ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATG
ATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGC
TCTGCAAGTTCTGCGATGTCAAGTTTCAGCACCTGCGATAA
TCAGAAGTCTCTGCAATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATC
TGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGA
AAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTCAACGA
CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTG
GTGGAGGTGGGAGTATTCTCTCCCAACGTGCAGAAAGAGCGT
GAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCCGTG
AAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTT

CCACCTGCGACAACCAGAAAGTCTGTATGAGCAACTGCTC
CATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTG
GCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAA
CCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCAT
CCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAG
AAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCA
GCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAACAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTAAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCTTCCCGGACCGTGGAATAG
GAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCAATGGGCGCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAA
TCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【1132】

TGFR ϵ 15融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトTGF β 受容体II)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAAASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

10

20

30

40

50

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVN
RKSTDSPVEECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS

10

【1133】

2つのTGFβ受容体IIをGenewizによって合成したIL-15RαSu鎖に、続いて、IL-21のN末端コーディング領域に直接結合することによっても構築物を作製した。IL-15RαSuのN末端に、続いて、IL-21のN末端に結合したTGFβ受容体IIを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1134】

TGFRs21構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

20

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒトTGFβ受容体II断片)

ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAAACAACGATATG
ATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGC
TCTGCAAGTTCTGCGATGTTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAA
TCAGAAAGTCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATC
TGCGAGAAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGA
AAAATGACGAGAAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTTCACGA
CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTG
GTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGT
GAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTG
AAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTT
CCACCTGCGACAACCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTC
CATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTG
GCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAA
CCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCAT
CCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAATCATGAAAGAG
AAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCA
GCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATAACAGCAACCCCCGAC

30

40

(ヒトIL-15Rαsushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACACG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG

50

GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

(ヒトIL-21)

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCGAGCTC
ATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACC
TGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGAC
CAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTTCAGAAGGCC
CAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCCAACACGAGCGGATCA
TCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTC
CACAAACGCCGGCAGGAGGCGAGAAGCACAGGCTGACCTGC
CCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGT
TCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCA
TCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC
【1135】

TGFRs 21 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ヒトTGFβ受容体II)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

(ヒトIL-15Rα sushiドメイン)

ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

(ヒトIL-21)

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVE
TNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPP
STNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI
HQHLS SRTHGSEDS

【1136】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1137】

TGFR/IL-15RαSu/IL-21 構築物およびTGFR/TF/IL-15 構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし (Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72)、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性TGFR/TF/IL-15: TGFR/IL-15RαSu/IL-21タンパク質複合体 (TGFRt15-TGFRs21と称する) の形成および分泌が可能になり、これを抗TF抗体IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1138】

抗TF抗体親和性カラムを使用したTGFRt15-TGFRs21の精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集したTGFRt15-TGFRs21を、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図134に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、融合パートナーとしてTFを含むTGFRt15-TGFRs21に結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

10

【1139】

TGFRt15-TGFRs21の還元SDS-PAGE分析

タンパク質の純度および分子量を決定するために、抗TF抗体親和性カラムで精製したTGFRt15-TGFRs21タンパク質試料を、還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル(4~12%NuPageビスートリスゲル)電気泳動(SDS-PAGE)法によって分析した。電気泳動後、ゲルをInstantBlueで約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。

20

【1140】

TGFRt15-TGFRs21タンパク質がCHO細胞において翻訳後にグリコシル化を受けることを検証するために、脱グリコシル化実験を、New England Biolabs製のProtein Deglycosylation Mix IIキットおよび製造業者の指示を使用して実施した。図135は、非脱グリコシル化状態(赤色の縁内のレーン1)および脱グリコシル化状態(黄色の縁内のレーン2)での試料の還元SDS-PAGE分析を示す。タンパク質がCHO細胞で発現されるとグリコシル化されることは明らかである。脱グリコシル化後、精製した試料は、還元SDSゲル中で予想された分子量(69kDaおよび55kDa)を示した。レーンMには、10uLのSeeBlue Plus2 Prestained Standardをロードした。

30

【1141】

C57BL/6マウスにおけるTGFRt15-TGFRs21の免疫刺激

TGFRt15-TGFRs21は、一本鎖の2つのTGFBRIIDメイン、ヒト組織因子219断片、およびヒトIL-15の可溶性融合物(TGFRt15)である第1のポリペプチドと、一本鎖の2つのTGFBRIIDメイン、ヒトIL-15受容体アルファ鎖のsushiドメイン、およびヒトIL-21の可溶性融合物(TGFRs21)である第2のポリペプチドとを含む多鎖ポリペプチド(本明細書に記載のタイプA多鎖ポリペプチド)である。

40

【1142】

CHO細胞を、TGFRt15およびTGFRs21ベクターで共トランスフェクトした。TGFRt15-TGFRs21複合体を、トランスフェクトしたCHO細胞培養上清から精製した。図136に示されるように、複合体中のTGFB受容体、IL-15、IL-21、および組織因子(TF)成分をELISAによって実証した。ヒト化抗TFモノクローナル抗体(抗TF IgG1)を捕捉抗体として使用して、TGFRt15-TGFRs21、ビオチン化抗ヒトIL-15抗体(R&D systems)、ビオチン化抗ヒトTGFB受容体抗体(R&D systems)中のTFを決定し、ビオチン化抗ヒトIL-21抗体(R&D Systems)を検出抗体として使用して、それぞ

50

れ、TGF α 15-TGF α 21中のIL-15、TGF β 受容体、およびIL-21を決定した。検出のために、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（Jackson ImmunoResearch Lab）およびABTSを使用した。

【1143】

野生型C57BL/6マウスを、対照溶液（PBS）または3mg/kgのTGF α 15-TGF α 21のいずれかで皮下処理した。処理の4日後、脾臓の重量および脾臓に存在する様々な免疫細胞型のパーセンテージを評価した。図137Aに示されるように、対照処理マウスおよびTGF α 15-TGF α 21処理マウスの脾臓に存在するCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージを評価した。TGF α 15-TGF α 21処理後のKi67発現に基づく免疫細胞の動的増殖も評価した。脾細胞を蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1（NK）抗体で染色し、抗Ki67抗体で細胞内染色した。CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージ、ならびに対応する免疫細胞サブセットのKi67の平均蛍光強度（MFI）をフローサイトメトリーによって分析した（図137Aおよび図137B）。さらに、マウスの単回投与処理後にTGF α 15-TGF α 21によって誘導された脾細胞のグランザイムB発現に基づく細胞傷害性の潜在性も評価した。図138に示されるように、TGF α 15-TGF α 21で処理したマウスの脾臓では、NK細胞によるグランザイムBの発現が処理後に増加した。TGF α 15-TGF α 21で処理したマウスの脾細胞を、蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1（NK）抗体で染色し、抗グランザイムB抗体で細胞内染色した。対応する免疫細胞サブセットのグランザイムBの平均蛍光強度（MFI）をフローサイトメトリーによって分析した（図138）。

【1144】

図137Aに示されるように、TGF α 15-TGF α 21で処理したマウスの脾臓では、CD8⁺ T細胞およびNK細胞の両方のパーセンテージが、単回TGF α 15-TGF α 21処理後4日目に増加した。これらの結果は、TGF α 15-TGF α 21が免疫細胞を誘導して、マウス脾臓、特にCD8⁺ T細胞およびNK細胞を増殖させることができることを示す。

【1145】

加えて、腫瘍細胞に対するマウス脾細胞の細胞傷害性も評価した。マウスYac-1細胞をCellTrace Violetで標識し、腫瘍標的細胞として使用した。脾細胞をTGF α 15-TGF α 21で処理したマウスから調製し、エフェクター細胞として使用した。標的細胞を、100nMのTGF α 15-TGF α 21を有するまたは有しないRPMI-10培地中でエフェクター細胞とE:T比10:1で混合し、37℃で24時間インキュベートした。標的Yac-1細胞阻害を、フローサイトメトリーを使用した生存violet標識Yac-1細胞の分析によって評価した。Yac-1阻害のパーセンテージを、式（1- [実験試料中の生存Yac-1細胞数] / [脾細胞を含まない試料中の生存Yac-1細胞数]）×100を使用して計算した。図139に示されるように、TGF α 15-TGF α 21で処理したマウス脾細胞は、細胞傷害性アッセイ中にTGF α 15-TGF α 21の存在下で対照マウス細胞よりもYac-1細胞に対して強い細胞傷害性を示した（図139）。

【1146】

実施例59：TGF α 15-TGF α 16融合タンパク質の生成

TGF β 受容体II/IL-15R α Su/抗CD16scFv融合タンパク質およびTGF β 受容体II/TF/IL-15融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した（図140および図141）。ヒトTGF β 受容体II（Ile24-Asp159）、組織因子219、およびIL-15配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。具体的には、G4S（3）リンカーを用いて2つのTGF β 受容体II配列を結合してTGF β 受容体IIの一本鎖バージョンを生成し、その後、組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、

IL-15のN末端コーディング領域に直接結合することによって構築物を作製した。

【1147】

組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合した2つのTGFβ受容体IIを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1148】

TGFR α 15構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

10

（ヒトTGFβ受容体II断片）

ATCCCCCCCCCATGTGC AAAAGAGCGTGAAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGT CAGGTT CAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAA AATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTGT AACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCA ACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGGCCGTGA AATTTCCCCAGCTGTGC AAATTC TGCGATGTGAGGTTTTC CACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTG CATCATGAAAGAGA AAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAA TACAATAACAGCAACCCCGAC

20

30

（ヒト組織因子219）

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAA AACCATCCTCGAATGGGAACCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTG CAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGC GATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGT TTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCTCCCGGACCGTG AATAGGAAAAGCACCCGATAGCCCCGTTGAGTG CATGGGCCAAGAA

40

50

A A G G G C G A G T T C C G G G A G

(ヒトIL-15)

A A C T G G G T G A A C G T C A T C A G C G A T T T A A A G A A G A T C G A A
G A T T T A A T T C A G T C C A T G C A T A T C G A C G C C A C T T T A T A C A
C A G A A T C C G A C G T G C A C C C C T C T T G T A A G G T G A C C G C C A T
G A A A T G T T T T T T A C T G G A G C T G C A A G T T A T C T C T T T A G A G
A G C G G A G A C G C T A G C A T C C A C G A C A C C G T G G A G A A T T T A A
T C A T T T T A G C C A A T A A C T C T T T A T C C A G C A A C G G C A A C G T
G A C A G A G T C C G G C T G C A A G G A G T G C G A A G A G C T G G A G G A G
A A G A A C A T C A A G G A G T T T C T G C A A T C C T T T G T G C A C A T T G
T C C A G A T G T T C A T C A A T A C C T C C

10

【1149】

T G F R t 1 5 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

M K W V T F I S L L F L F S S A Y S

(ヒトTGFβ受容体II)

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D
N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H
D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E
C N D N I I F S E E Y N T S N P D G G G G S G G G G S G G G G S I P P H V Q K S
V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C
S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F
I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E
E Y N T S N P D

20

(ヒト組織因子219)

S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S
T K S G D W K S K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P
A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V
G T K V N V T V E D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K
S S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S V Q A V I P S R T V N
R K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E

30

(ヒトIL-15)

N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A
M K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N
V T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S

【1150】

2つのTGFβ受容体IIをGenewizによって合成したIL-15RαSu鎖に、続いて、抗CD16scFv配列に直接結合することによっても構築物を作製した。IL-15RαSuのN末端に、続いて、抗CD16scFv配列に結合したTGFβ受容体IIを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

40

【1151】

T G F R s 1 6 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C
T C C A G C G C C T A C T C C

(ヒトTGFβ受容体II断片)

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G
A T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C

50

TCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAA
TCAGAAGTCTCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATC
TGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGA
AAAATGACGAGAACATCACCCCTGGAGACCGTGTGTACGA
CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCAATTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTG
GTGGAGGTGGGAGTATTCTCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGT
GAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTG
AAATTTCCCCAGCTGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTT
CCACCTGCGACAACCAGAAGTCTCTGTATGAGCAACTGCTC
CATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTG
GCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAA
CCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCAT
CCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGTCATCATGAAAGAG
AAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCA
GCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATAACCAGCAACCCCGAC

10

20

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGTCATCCGG

(抗ヒトCD16scFv)

TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTG
GGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGA
GGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCA
GGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAAACAGGCC
TCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCA
ACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGA
CGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGC
AACCATGTGGTGTTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGG
GCCATGGCGGGCGGGCGGCTCCGGAGGGCGGGCGGCAGCGGCGG
AGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGA
GTGGTGAGGCCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTG
CCTCCGGCTTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCTCTGGGT
GAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGC
ATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCG
TGAAGGGCAGGTTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAA
CTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGGCCGAGGAC
ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGT
TCGACTACTGGGGACAGGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGG

30

40

【1152】

TGFRs16融合タンパク質のアミノ酸配列(リーダー配列を含む)は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSsays

50

(ヒトTGFB受容体II)

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D
N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H
D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E
C N D N I I F S E E Y N T S N P D G G G G S G G G G S G G G G S I P P H V Q K S
V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C
S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F
I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E
E Y N T S N P D

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T
S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R

(抗ヒトCD16scFv)

S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G
Q A P V L V I Y G K N N R P S G I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E
D E A D Y Y C N S R D S S G N H V V F G G G T K L T V G H G G G G S G G G G S G
G G G S E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A S G F T F D D Y G M S W
V R Q A P G K G L E W V S G I N W N G G S T G Y A D S V K G R F T I S R D N A K
N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G R S L L F D Y W G Q G T L V T V S R
【1153】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1154】

TGFR/IL-15R α Su/抗CD16scFv構築物およびTGFR/TF/IL-15構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし(Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005; 16: 457-72)、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性TGFR/TF/IL-15: TGFR/IL-15R α Su/anti-CD16scFvタンパク質複合体(TGFRt15-TGFRs16と称する)の形成および分泌が可能になり、これを抗TF IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1155】

実施例60: TGFRt15-TGFRs137L融合タンパク質の生成

TGFB受容体II/IL-15R α Su/CD137L融合タンパク質およびTGFB受容体II/TF/IL-15融合タンパク質からなる融合タンパク質複合体を生成した(図142および図143)。ヒトTGFB受容体II(Ile24-Asp159)、組織因子219、CD137L、およびIL-15配列をUniProtウェブサイトから入手し、これらの配列のDNAをGenewizによって合成した。具体的には、G4S(3)リンカーを用いて2つのTGFB受容体II配列を結合してTGFB受容体IIの一本鎖バージョンを生成し、その後、組織因子219のN末端コーディング領域に、続いて、IL-15のN末端コーディング領域に直接結合することによって構築物を作製した。

【1156】

組織因子219のN末端に、続いて、IL-15のN末端に結合した2つのTGFB受容体IIを含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1157】

T G F R t 1 5 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C
T C C A G C G C C T A C T C C

（ヒト T G F β 受容体 I I 断片）

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G A
T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C T
C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A T
C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C T
G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A A
A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A C
C C C A A G C T C C C T T A T C A C G A C T T C A T T C T G G A G G A C G C T G
C C T C C C C C A A A T G C A T C A T G A A G G A G A A G A A G A A G C C C G G
A G A G A C C T T C T T T A T G T G T T C C T G T A G C A G C G A C G A G T G T
A A C G A C A A C A T C A T C T T C A G C G A A G A G T A C A A C A C C A G C A
A C C C T G A T G G A G G T G G C G G A T C C G G A G G T G G A G G T T C T G G
T G G A G G T G G G A G T A T T C C T C C C C A C G T G C A G A A G A G C G T G
A A T A A T G A C A T G A T C G T G A C C G A T A A C A A T G G C G C C G T G A
A A T T T C C C C A G C T G T G C A A A T T C T G C G A T G T G A G G T T T T C
C A C C T G C G A C A A C C A G A A G T C C T G T A T G A G C A A C T G C T C C
A T C A C C T C C A T C T G T G A G A A G C C T C A G G A G G T G T G C G T G G
C T G T C T G G C G G A A G A A T G A C G A G A A T A T C A C C C T G G A A A C
C G T C T G C C A C G A T C C C A A G C T G C C C T A C C A C G A T T T C A T C
C T G G A A G A C G C C G C C A G C C C T A A G T G C A T C A T G A A A G A G A
A A A A G A A G C C T G G C G A G A C C T T T T T C A T G T G C T C C T G C A G
C A G C G A C G A A T G C A A C G A C A A T A T C A T C T T T A G C G A G G A A
T A C A A T A C C A G C A A C C C C G A C

（ヒト組織因子 2 1 9）

A G C G G C A C A A C C A A C A C A G T C G C T G C C T A T A A C C T C A C T
T G G A A G A G C A C C A A C T T C A A A A C C A T C C T C G A A T G G G A A C
C C A A A C C C G T T A A C C A A G T T T A C A C C G T G C A G A T C A G C A C
C A A G T C C G G C G A C T G G A A G T C C A A A T G T T T C T A T A C C A C C
G A C A C C G A G T G C G A T C T C A C C G A T G A G A T C G T G A A A G A T G
T G A A A C A G A C C T A C C T C G C C C G G G T G T T T A G C T A C C C C G C
C G G C A A T G T G G A G A G C A C T G G T T C C G C T G G C G A G C C T T T A
T A C G A G A A C A G C C C C G A A T T T A C C C C T T A C C T C G A G A C C A
A T T T A G G A C A G C C C A C C A T C C A A A G C T T T G A G C A A G T T G G
C A C A A A G G T G A A T G T G A C A G T G G A G G A C G A G C G G A C T T T A
G T G C G G C G G A A C A A C A C C T T T C T C A G C C T C C G G G A T G T G T
T C G G C A A A G A T T T A A T C T A C A C A C T G T A T T A C T G G A A G T C
C T C T T C C T C C G G C A A G A A G A C A G C T A A A A C C A A C A C A A A C
G A G T T T T T A A T C G A C G T G G A T A A A G G C G A A A A C T A C T G T T
T C A G C G T G C A A G C T G T G A T C C C C T C C C G G A C C G T G A A T A G
G A A A A G C A C C G A T A G C C C C G T T G A G T G C A T G G G C C A A G A A
A A G G G C G A G T T C C G G G A G

（ヒト IL-15）

A A C T G G G T G A A C G T C A T C A G C G A T T T A A A G A A G A T C G A A
G A T T T A A T T C A G T C C A T G C A T A T C G A C G C C A C T T T A T A C A
C A G A A T C C G A C G T G C A C C C C T C T T G T A A G G T G A C C G C C A T

10

20

30

40

50

G A A A T G T T T T T T A C T G G A G C T G C A A G T T A T C T C T T T A G A G
A G C G G A G A C G C T A G C A T C C A C G A C A C C G T G G A G A A T T T A A
T C A T T T T A G C C A A T A A C T C T T T A T C C A G C A A C G G C A A C G T
G A C A G A G T C C G G C T G C A A G G A G T G C G A A G A G C T G G A G G A G
A A G A A C A T C A A G G A G T T T C T G C A A T C C T T T G T G C A C A T T G
T C C A G A T G T T C A T C A A T A C C T C C

【1158】

T G F R t 1 5 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

M K W V T F I S L L F L F S S A Y S

（ヒト T G F β 受容体 I I）

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D
N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H
D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E
C N D N I I F S E E Y N T S N P D G G G G S G G G G S G G G G S I P P H V Q K S
V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C
S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F
I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E
E Y N T S N P D

（ヒト組織因子219）

S G T T N T V A A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K P V N Q V Y T V Q I S
T K S G D W K S K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S Y P
A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L G Q P T I Q S F E Q V
G T K V N V T V E D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K
S S S S G K K T A K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S V Q A V I P S R T V N
R K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E

（ヒト I L - 1 5）

N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A
M K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N
V T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S

【1159】

2つの T G F β 受容体 I I を G e n e w i z によって合成した I L - 1 5 R α S u 鎖に、続いて、（G 4 S）3リンカーおよび C D 1 3 7 L 配列に直接結合することによっても構築物を作製した。I L - 1 5 R α S u の N 末端に、続いて、（G 4 S）3リンカーおよび C D 1 3 7 L 配列に結合した T G F β 受容体 I I を含む構築物の核酸配列およびタンパク質配列を以下に示す。

【1160】

T G F R s 1 3 7 L 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである。

（シグナルペプチド）

A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T T C
T C C A G C G C C T A C T C C

（ヒト T G F β 受容体 I I 断片）

A T C C C C C C C C A T G T G C A A A A G A G C G T G A A C A A C G A T A T G
A T C G T G A C C G A C A A C A A C G G C G C C G T G A A G T T T C C C C A G C
T C T G C A A G T T C T G C G A T G T C A G G T T C A G C A C C T G C G A T A A
T C A G A A G T C C T G C A T G T C C A A C T G C A G C A T C A C C T C C A T C
T G C G A G A A G C C C C A A G A A G T G T G C G T G G C C G T G T G G C G G A
A A A A T G A C G A G A A C A T C A C C C T G G A G A C C G T G T G T C A C G A

10

20

30

40

50

CCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTTCATTCTGGAGGACGCT
GCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCG
GAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTG
TAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGC
AACCCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTG
GTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGT
GAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTG
AAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCCTGCGATGTGAGGTTTT
CCACCTGCGACAACCAGAAGTCCCTGTATGAGCAACTGCTC
CATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTG
GCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCCTGGAAA
CCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCA
CCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGTCATCATGAAAGAG
AAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTTCATGTGCTCCTGCA
GCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATAACCAGCAACCCCGAC

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGAC
ATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGT
ATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACACG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTG
GCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGATCCGG

((G4S)3リンカー)

GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGGCGGA
GGATCT

(ヒトCD137L)

CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGC
CTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGG
CCCAAATGTTCTGTGATCGATGGGCCCTGAGCTGGTA
CAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCTGACGGGGGGC
CTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCA
AGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCG
GCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTT
GCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCG
CCGCCCTGGCTTTGACCGTGACCTGCCACCCGCCTCCTC
CGAGGCTCGGAACCTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTG
CTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTC
ACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCA
GGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAA
ATCCCAGCCGGACTCCCTTCAACCGAGGTGGGA

【1161】

TGFRs137L融合タンパク質のアミノ酸配列(リーダー配列を含む)は、以下の通りである。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSsays

(ヒトTGF β 受容体II)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPEVCVAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS

10

20

30

40

50

VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT
SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI R

((G4S)3リンカー)

GGGGSGGGGS GGGGS

(ヒトCD137L)

REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW
YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL
RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS
SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT
QGATVVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

【1162】

ある場合には、リーダーペプチドをインタクトなポリペプチドから切断して、可溶性であり得るか、または分泌され得る成熟形態を生成する。

【1163】

TGFR/IL-15R α Su/CD137L構築物およびTGFR/TF/IL-15構築物を前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングし(Hughes M S, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, et al. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther 2005;16:457-72)、発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞でのこれらの2つの構築物の共発現により、可溶性TGFR/TF/IL-15:TGFR/IL-15R α Su/CD137Lタンパク質複合体(TGFRt15-TGFRs137Lと称する)の形成および分泌が可能になり、これを抗TF IgG1親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1164】

実施例61. 例示的な一本鎖キメラポリペプチド2t2の産生および特徴付け

IL-2受容体に結合する第1の標的結合ドメイン、可溶性ヒト組織因子ドメイン、およびIL-2受容体に結合する第2の標的結合ドメインを含む例示的な一本鎖キメラポリペプチドが生成された(IL-2/TF/IL-2、2t2と称される)(図144)。この一本鎖キメラポリペプチドの核酸およびアミノ酸配列を以下に示す。

例示的な一本鎖キメラポリペプチド(IL-2/TF/IL-2)をコードする核酸(配列番号164)

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(第1のIL-2断片)

GCCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTCTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACCTACAAGAACCCTAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTT

10

20

30

40

50

TTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGT
ACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTTAAATCG
TTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACC
(ヒト組織因子219型)

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCGCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

10

20

(第2のIL-2断片)

GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAA
CTGGAGCATTTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATG
GAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACCTCACCGAGGATGCT
CACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTG
AAACATCTTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGG
AGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTT
AAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTT
CTGGAACATAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAAT
ATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAG
ATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT
例示的な一本鎖キメラポリペプチド(IL-2/Tf/IL-2)(配列番号163)

30

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-2)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM
LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN
RWITFCQSIISTLT

40

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVTN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

(ヒトIL-2)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM
LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH

50

L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N
R W I T F C Q S I I S T L T

【1165】

IL-2/TF/IL-2をコードする核酸を、前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングした(Hughes et al., Hum Gene Ther 16:457-72, 2005)。IL-2/TF/IL-2をコードする発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞での発現ベクターの発現により、可溶性IL-2/TF/IL-2一本鎖キメラポリペプチド(2t2と称される)の分泌が可能になり、これを抗TF抗体親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

10

【1166】

IL-2および2t2は、同様の様式においてIL-2R β および共通 γ 鎖含有32D β 細胞の増殖を促進した

2t2のIL-2の活性を評価するために、2t2を、IL-2R β および共通 γ 鎖を発現する32D β 細胞の増殖を促進するために、組換えIL-2と比較した。IL-2依存性32D β 細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、 2×10^4 細胞/ウェルでウェルに播種した。連続希釈した2t2またはIL-2を細胞に添加した(図145)。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で3日間インキュベートした。3日目に10 μ LのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。吸光度を450nmで測定することにより、生成されたホルマザン色素の量を分析した。図145に示されるように、2t2およびIL-2は、同様の様式において32D β 細胞を活性化した。2t2およびIL-2のEC₅₀は、それぞれ、158.1pMおよび140pMであった。

20

【1167】

2t2は、IL-2と比較して、CTLL-2細胞増殖を含むIL-2R $\alpha\beta\gamma$ を促進する改善された能力を示した。

2t2のIL-2の活性を評価するために、2t2を、IL-2R α 、IL-2R β 、および共通 γ 鎖を発現するCTLL-2細胞の増殖を促進するために、組換えIL-2と比較した。IL-2依存性CTLL-2細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、 2×10^4 細胞/ウェルでウェルに播種した。連続希釈した2t2またはIL-2を細胞に添加した(図146)。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で3日間インキュベートした。3日目に10 μ LのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。吸光度を450nmで測定することにより、生成されたホルマザン色素の量を分析した。図146に示されるように、2t2は、IL-2よりも4~5倍強力にCTLL-2細胞の増殖を促進した。2t2のEC₅₀は、123.2pMであり、IL-2のEC₅₀は、548.2pMであった。

30

【1168】

2t2は、ApoE^{-/-}マウスにおける高脂肪誘発性高血糖の増加を抑制した

6週齢の雌ApoE^{-/-}マウス(Jackson Lab)に、21%脂肪、0.15%コレステロール、34.1%スクロース、19.5%カゼイン、および15%デンプンを含む標準固形食または高脂肪食(TD88137, Envigo Laboratories)を与え、標準的な条件で維持した。7週目に、高脂肪食を与えたマウスを、対照群および処理群にランダムに割り当てた。その後、マウスに、3mg/kgの投薬量で皮下注射ごとに2t2(処理群)またはPBS(固形食群および対照群)のいずれかを施した。投与の3日後、マウスを一晩絶食させ、血液試料を後眼窩静脈叢穿刺によって収集した。一晩の空腹時グルコース値は、OneTouch血糖測定器を使用して測定した。図147に示されるように、結果は、2t2注射がApoE^{-/-}マウスにおけるグルコース値の上昇を効果的に抑制することを示した。

40

【1169】

50

2t2は、血中リンパ球のCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T制御性(Treg)細胞の比率を大幅にアップレギュレートする

6週齢の雌ApoE^{-/-}マウス(Jackson Lab)に、21%脂肪、0.15%コレステロール、34.1%スクロース、19.5%カゼイン、および15%デンプンを含む標準固形食または高脂肪食(TD88137、Envigo Laboratories)を与え、標準的な条件で維持した。7週目に、高脂肪食を与えたマウスを、対照群および処理群にランダムに割り当てた。その後、マウスに、3mg/kgの投薬量で皮下注射ごとに2t2(処理群)またはPBS(固形食群および対照群)のいずれかを施した。投与の3日後、一晩の空腹時血液試料を眼窩後静脈叢穿刺により収集し、ACK溶解緩衝液(Thermo Fisher Scientific)と37℃で5分間インキュベートした。その後、試料を、FACS緩衝液(1X PBS(Hyclone)、0.5%BSA(EMD Millipore)および0.001%アジ化ナトリウム(Sigma)を含む)中で再懸濁し、FITC-抗-CD4およびAPC-抗-CD25抗体(BioLegend)で30分間表面染色した。表面染色し試料を、さらに固定し、Fix/Perm緩衝液(BioLegend)で予備金属化し、PE-抗-Foxp3抗体(BioLegend)で細胞内染色した。染色後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した後、1500RPMで5分間室温で遠心分離した。細胞をフローサイトメトリー(Celesta-BD Bioscience)によって分析した。図148に示されるように、2t2処理は、未処理群(固形食群では0.4%±0.16、高脂肪食群では0.46%±0.09)と比較して、血中リンパ球のTreg集団を著しく増加させた(3.5%±0.32)。

【1170】

抗TF抗体親和性カラムからの2t2の精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集した2t2を、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図149に示されるように、抗TF抗体親和性カラムは、融合ドメインとしてTFを含む2t2に結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

【1171】

2t2の分析的サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析

分析的サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を使用して2t2を分析するために、Superdex 200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラム(GE Healthcare製)をAKTA Avantシステム(GE Healthcare製)に接続した。カラムを2カラム体積のPBSで平衡化した。流速は0.7mL/分であった。PBS中2t2を含む試料を、キャピラリーループを使用してSuperdex 200カラムに注入し、SECによって分析した。試料のSECクロマトグラフを図150に示す。SECの結果は、2t2の2つのタンパク質ピークを示した。

【1172】

2t2の還元SDS-PAGE

タンパク質の純度および分子量を決定するために、抗TF抗体親和性カラムで精製した2t2タンパク質試料を、還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル(4~12%NuPageビス-トリスゲル)電気泳動(SDS-PAGE)法によって

10

20

30

40

50

分析した。電気泳動後、ゲルをInstant Blueで約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。

【1173】

2t2タンパク質がCHO細胞において翻訳後にグリコシル化を受けることを検証するために、脱グリコシル化実験を、New England Biolabs製のProtein Deglycosylation Mix IIキットを製造業者の指示に従って使用して実施した。図151Aおよび151Bは、非脱グリコシル化状態（赤色の縁内のレーン1）および脱グリコシル化状態（黄色の縁内のレーン2）での試料の還元SDS-PAGE分析を示す。結果は、2t2タンパク質がCHO細胞で発現されるとグリコシル化されることを示した。脱グリコシル化後、精製した試料は、還元SDSゲル中で予想された分子量（56 kDa）で実行した。レーンMには、10 μ LのSeeBlue Plus 2 Prestained Standardをロードした。

10

【1174】

2t2のインビボ特徴付け

2t2を、C57BL/6マウスに様々な用量で皮下注射し、インビボでの2t2の免疫刺激活性を測定した。マウスを、対照溶液（PBS）または0.1、0.4、2および10 mg/kgの2t2で皮下処理した。処理したマウスを処理の3日後に安楽死させた。マウスの脾臓を収集し、処理後3日目に秤量した。単一脾細胞懸濁液を調製し、調製した脾細胞をCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞（蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1抗体で）を染色し、フローサイトメトリーによって分析した。結果は、脾臓重量に基づいて、2t2が特に0.1~10 mg/kgで脾臓細胞を増殖させるのに効果的であることを示した（図152A）。CD8⁺ T細胞のパーセンテージは、2および10 mg/kgで対照処理マウスと比較して高かった（図125B）。NK細胞のパーセンテージは、試験した全ての用量で対照処理マウスと比較して高かった（図152B）。

20

【1175】

IL-2が免疫細胞によるCD25発現をアップレギュレートすることが知られている。したがって、2t2で処理したマウスにおけるCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のCD25発現にアクセスした。上記の段落で説明したように、C57BL/6マウスを2t2で皮下処理した。脾細胞を、蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、CD25、およびNK1.1モノクローナル抗体で染色した。脾細胞サブセットのCD25発現（MFI）を、フローサイトメトリーで分析した。図153に示されるように、試験した用量および時点で、2t2は、CD4⁺ T細胞によるCD25発現を有意にアップレギュレートしたが、CD8⁺ T細胞またはNK細胞ではアップレギュレートしなかった。

30

【1176】

C57BL/6マウスにおける2t2の薬物動態も調査した。2t2を、C57BL/6マウスに1 mg/kgで皮下注射した。マウスの血液を、図154に示されるように、様々な時点で尾静脈から排出し、血清を調製した。2t2濃度を、ELISAを用いて測定した（捕捉：抗組織因子抗体；検出：ビオチン化抗ヒトIL-2抗体、その後SA-HRPおよびABTS基質）。2t2の半減期は、PK Solutions 2.0（Summit Research Services）で計算して1.83時間であった。

40

【1177】

2t2は、ApoE^{-/-}マウスにおける高脂肪誘発性アテローム性動脈硬化症プラークの形成を弱めた。

6週齢の雌ApoE^{-/-}マウス（The Jackson Laboratory）に、標準固形食または高脂肪食（21%脂肪、0.15%コレステロール、34.1%スクロース、19.5%カゼイン、および15%デンプン）（TD88137、Envigo Laboratories）を与え、標準的な条件で維持した。7週目に、高脂肪食（HFD）を与えたマウスを、対照群および処理群にランダムに割り当てた。その後、マウスに、3 mg/kgの投薬量で2t2（処理群）またはPBS（固形食群および対照群）の

50

いずれかを4週間毎週皮下投与した。12週目に、全てのマウスをイソフルランで安楽死させた。大動脈を収集し、縦方向に開き、正面法を使用してスーダンIV溶液（0.5%）で染色した。その後、総大動脈面積に対するプラーク面積（図155Aに示されるように、赤色）のパーセンテージを、ImageJソフトウェアで定量化した。図155Aは、各群からのアテローム性動脈硬化症のプラークの代表的な図を示す。図155Bは、各群のアテローム性動脈硬化症のプラークの定量分析の結果を示す。対照群（HF食）のプラーク面積のパーセンテージは、処理群（HFD+2t2）よりもはるかに高く、10.28%対4.68%であった。

【1178】

2t2は、2型糖尿病の進行を抑制する。

雄BKS.Cg-Dock7^{m+}/+Lepr^{db}/J (db/db (Jackson Lab)) マウスに、標準固形食を与え、不断給餌で飲料水を与えた。6週齢時に、マウスを、対照群および処理群にランダムに割り当てた。処理群は、隔週で3mg/kgの皮下注射により2t2を施したが、対照群は、ビヒクル（PBS）のみを施した。一晩の空腹時グルコース値は、OneTouch血糖測定器を使用して毎週測定した。結果は、2t2がBKS.Cg-Dock7^{m+}/+Lepr^{db}/Jマウスにおけるグルコース値の上昇を効果的に抑制したことを示した（図156）。

【1179】

2t2は、第1の注射後に、血中リンパ球のCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T制御性細胞の比率を大幅にアップレギュレートする

雄BKS.Cg-Dock7^{m+}/+Lepr^{db}/J (db/db) (The Jackson Laboratory) マウスは、標準固形食を与え、不断給餌で飲料水を与えた。6週齢時に、マウスを、対照群および処理群にランダムに割り当てた。処理群は、隔週で3mg/kgの皮下注射により2t2を施したが、対照群は、ビヒクル（PBS）のみを施した。第1の薬物注射の4日後、一晩の空腹時血液試料を収集し、ACK溶解緩衝液（Thermo Fisher Scientific）と37℃で5分間インキュベートした。その後、試料を、FACS緩衝液（1X PBS (Hyclone)、0.5% BSA (EMD Millipore)、および0.001%アジ化ナトリウム (Sigma) を含む）中で再懸濁し、FITC-抗-CD4およびAPC-抗-CD25抗体 (BioLegend) で30分間表面染色した。表面染色し試料を、さらに固定し、Fix/Perm緩衝液 (BioLegend) で予備金属化し、PE-抗-Foxp3抗体 (BioLegend) で細胞内染色した。染色後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、フローサイトメトリー (Celesta-BD Bioscience) によって分析した。血中リンパ球中のCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Tregsのパーセンテージを測定した。図157に示されるように、結果は、2t2が血中リンパ球のTregsの比率を有意にアップレギュレートすることを示した（*p<0.05）。

【1180】

実施例62. 例示的な一本鎖キメラポリペプチド15t15の産生および特徴付け

IL-15受容体に結合する第1の標的結合ドメイン、可溶性ヒト組織因子ドメイン、およびIL-15受容体に結合する第2の標的結合ドメインを含む第2の例示的な一本鎖キメラポリペプチドが生成された（IL-15/TF/IL-15、15t15と称される）（図158）。この一本鎖キメラポリペプチドの核酸およびアミノ酸配列を以下に示す。

例示的な一本鎖キメラポリペプチド（IL-15/TF/IL-15）をコードする核酸（配列番号170）

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（第1のIL-15断片）

AACTGGGTGAACGTGATCAGCGATTATAAGAAGATCGAG

GATTTAATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACTCTGTACA
CTGAGAGCGACGTGCACCCCTAGCTGCAAGGTGACTGCCAT
GAAGTGCTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGCGATGCCAGCATCCACGACACTGTGGAGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAACAACCTCTTTAAGCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGCGAGGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTTTTACAGAGCTTCGTGCACATCG
TGCAGATGTTTCATCAACACTAGC

(ヒト組織因子219型)

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAAGAGCACCAACTTCAA AACCATCCTCGAATGGGAAC
CCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCGAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACC
GACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATG
TGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGC
CGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTA
TACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCA
ATTTAGGACAGCCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGG
CACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTA
GTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGT
TCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTC
CTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAAC
GAGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTT
TCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAATAG
GAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTG CATGGGGCCAAGAA
AAGGGCGAGTTCCGGGAG

(第2のIL-15断片)

AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAA
GATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCAT
GAAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAG
AGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAAGAATTTAA
TCATTTTATAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGT
GACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAG
AAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTG
TCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

例示的な一本鎖キメラポリペプチド (IL-15 / TF / IL-15) (配列番号169)

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

(ヒト組織因子219)

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIS
TKSGDWKSKCFYT TDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYP
AGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQV
GTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR TVN
RKSTDSPVECMGQEKGEFRE

10

20

30

40

50

(ヒトIL-15)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【1181】

IL-15/TF/IL-15をコードする核酸を、前述の修飾レトロウイルス発現ベクターにクローニングした(Hughes et al., Hum Gene Ther 16:457-72, 2005)。IL-15/TF/IL-15をコードする発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトした。CHO-K1細胞での発現ベクターの発現により、可溶性IL-15/TF/IL-15一本鎖キメラポリペプチド(15t15と称される)の分泌が可能になり、これを抗TF抗体親和性および他のクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【1182】

15t15は、IL-2R β および共通 γ 鎖含有32D β 細胞の増殖を促進する

15t15のIL-15活性を、IL-2R β および共通 γ 鎖で発現した32D β 細胞で組換えIL-15と比較した。IL-15依存性32D β 細胞をIMDM-10%FBSで5回洗浄し、ウェルに 2×10^4 細胞/ウェルで播種した。連続希釈した15t15またはIL-15を細胞に添加した(図159)。細胞をCO₂インキュベーター内で、37℃で3日間インキュベートした。3日目に10 μ LのWST1を各ウェルに添加し、CO₂インキュベーター内で、37℃でさらに3時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。吸光度を450nmで測定することにより、生成されたホルマザン色素の量を分析した。図159に示されるように、15t15は、IL-15と比較して32D β 細胞の増殖を効率的に促進しなかった。15t15およびIL-15のEC₅₀は、それぞれ、161.4pMおよび1.6pMであった。

【1183】

抗TF抗体親和性カラムからの15t15の精製溶出クロマトグラフ

細胞培養物から収集した15t15を、5カラム体積のPBSで平衡化した抗TF抗体親和性カラムにロードした。試料をロードした後、カラムを5カラム体積のPBSで洗浄し、その後、6カラム体積の0.1M酢酸(pH2.9)で溶出した。A280溶出ピークを収集し、1Mトリス塩基でpH7.5~8.0に中和した。その後、中和した試料を、分子量カットオフ30kDaでAmicon遠心フィルターを使用してPBSに緩衝液交換した。図160に示されるように、抗TF抗体アフィニティークラムは、融合ドメインとしてTFを含む15t15に結合した。緩衝液交換したタンパク質試料を、さらなる生化学的分析および生物学的活性試験のために2~8℃で保管した。各溶出後、抗TF抗体親和性カラムを6カラム体積の0.1Mグリシン(pH2.5)を使用してストリッピングした。その後、カラムを、保管のために5カラム体積のPBSおよび7カラム体積の20%エタノールを使用して中和した。抗TF抗体親和性カラムを、GE Healthcare AKTA Avantシステムに接続した。流速は、2mL/分の溶出ステップを除く全てのステップで4mL/分であった。

【1184】

15t15の還元SDS-PAGE

タンパク質の純度および分子量を決定するために、抗TF抗体親和性カラムで精製した15t15タンパク質試料を、還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル(4~12%NuPageビスートリスゲル)電気泳動(SDS-PAGE)法によって分析した。電気泳動後、ゲルをInstantBlueで約30分間染色し、その後、精製水中で一晩脱色した。

【1185】

15t15タンパク質がCHO細胞において翻訳後にグリコシル化を受けることを検証するために、脱グリコシル化実験を、New England Biolabs製のProtein Deglycosylation Mix IIキットおよび製造業者の指示を

使用して実施した。図161Aおよび161Bは、非脱グリコシル化状態（赤色の縁内のレーン1）および脱グリコシル化状態（黄色の縁内のレーン2）での試料の還元SDS-PAGE分析を示す。結果は、15t15タンパク質がCHO細胞で発現されるとグリコシル化されることを示した。脱グリコシル化後、精製した試料は、還元SDSゲル中で予想された分子量（50kDa）で実行した。レーンMには、10μLのSeeBlue Plus 2 Prestained Standardをロードした。

【1186】

実施例63：インビトロでのNK細胞の刺激

18t15-12s、18t15-12s16、および7t15-21s+抗TF抗体で刺激した後のNK細胞の表面表現型の変化を評価するために一連の実験を行った。これらの実験では、新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56⁺ NK細胞をRosetteSep/ヒトNK細胞試薬（StemCell Technologies）で単離した。NK細胞の純度は90%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、およびCD69-APCFire750抗体（BioLegend）で染色することによって確認した。細胞をカウントし、0.2mLの完全培地（RPMI 1640（Gibco）、2mMのL-グルタミン（Thermo Life Technologies）、ペニシリン（Thermo Life Technologies）、ストレプトマイシン（Thermo Life Technologies）、および10%FBS（Hyclone）を補充）中の96ウェル平底プレートに0.2×10⁶/mLで再懸濁した。細胞を、18t15-12s（100nM）、18t15-12s16（100nM）、単一サイトカインrhIL15（50ng/mL）（Miltenyi）とrhIL18（50ng/mL）（Invivogen）とrhIL-12（10ng/mL）（Peprotech）との混合物、7t15-21s+抗TF抗体（100nM~50nM）、7t15-21s（100nM）、または抗TF抗体（50nM）で、37℃および5%CO₂で16時間刺激した。翌日、細胞を収集し、CD56、CD16、CD25、CD69、CD27、CD62L、NKp30、およびNKp44に特異的な抗体で30分間表面染色した。表面染色後、細胞を、FACS緩衝液（1XPBS（Hyclone）、0.5%BSA（EMD Millipore）および0.001%アジ化ナトリウム（Sigma）を含む）中で洗浄した（1500RPM、室温で5分間）。2回洗浄した後、細胞をフローサイトメトリー（Celesta-BD Bioscience）によって分析した。図126Aおよび162Bは、精製NK細胞を18t15-12s、18t15-12s16、または7t15-21s+抗TF抗体と一晩インキュベートすることにより、CD25、CD69、NKp44、およびNKp30活性化マーカーを発現する細胞のパーセンテージが増加し、CD62Lを発現する細胞のパーセンテージを減少したことを示す。全ての活性化マーカーのデータは、CD56⁺ ゲート化リンパ球からのものである。

【1187】

18t15-12s、18t15-12s16、および7t15-21sで刺激した後のリンパ球集団の表面表現型の変化を評価するために一連の実験を行った。これらの実験では、新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手した。末梢血リンパ球を、Ficoll-PAQUE Plus（GE Healthcare）密度勾配培地で単離した。細胞をカウントし、0.2mLの完全培地（RPMI 1640（Gibco）、2mMのL-グルタミン（Thermo Life Technologies）、ペニシリン（Thermo Life Technologies）、ストレプトマイシン（Thermo Life Technologies）、および10%FBS（Hyclone）を補充）中の96ウェル平底プレートに0.2×10⁶/mLで再懸濁した。細胞を、18t15-12s（100nM）、18t15-12s16（100nM）、単一サイトカインrhIL15（50ng/mL）（Miltenyi）とrhIL18（50ng/mL）（Invivogen）とrhIL-12（10ng/mL）（Peprotech）との混合物、7t15-21s（100nM）+抗TF抗体（50nM）、7t15-21s

(100 nM)、または抗TF抗体(50 nM)で、37℃および5%CO₂で16時間刺激した。翌日、細胞を収集し、CD4またはCD8、CD62L、およびCD69に特異的な抗体で30分間表面染色した。表面染色後、細胞を、FACS緩衝液(1X PBS (Hyclone)、0.5%BSA (EMD Millipore)および0.001%アジ化ナトリウム(Sigma)を含む)中で洗浄した(1500 RPM、室温で5分間)。2回洗浄した後、細胞をフローサイトメトリー(Celesta-BD Bioscience)によって分析した。図163は、精製リンパ球集団(CD4およびCD8 T細胞)を18t15-12s、18t15-12s16、または7t15-21s+抗TF抗体と一晩インキュベートすることにより、CD69を発現するCD8およびCD4 T細胞のパーセンテージが増加したことを示す。さらに、7t15-21s+抗TF抗体とインキュベートすることにより、CD62Lを発現するCD8およびCD4 T細胞のパーセンテージが増加した(図163)。

【1188】

一連の実験を行い、ヒト血液から精製したNK細胞の細胞外酸性化速度(ECAR)に対する18t15-12sの効果を決定した。ECARは、解糖を測定するために使用することができる。解糖は、1分子のグルコースが2分子のピルビン酸に細胞内で生化学的変換され、同時に2分子のATPが生成されることである。解糖の増加は、Seahorse XF96アナライザーによって測定されたECARの増加によって示された。これらの実験では、新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56⁺ NK細胞をRosetteSep/ヒトNK細胞試薬(StemCell Technologies)で単離した。NK細胞の純度は70%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、およびCD69-APCFire750抗体(BioLegend)で染色することによって確認した。細胞をカウントし、0.2mLの完全培地(RPMI 1640 (Gibco)、2mMのL-グルタミン(Thermo Life Technologies)、ペニシリン(Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン(Thermo Life Technologies)、および10%FBS (Hyclone)を補充)中の96ウェル平底プレートに0.2×10⁶/mLで再懸濁した。細胞を、hIL-12(10 ng/mL)(BioLegend)、hIL-18(50 ng/mL)(R&D)、およびhIL-15(50 ng/mL)(NCI)の混合物、または18t15-12s(100 nM)のいずれかで、37℃および5%CO₂で14~18時間刺激した。翌日、細胞を収集し、Seahorse培地で2回洗浄した。細胞(2×10⁵細胞/ウェル)を、10μLのポリ-L-リジン(Sigma)でコーティングされた96ウェルフラックスプレートに播種した。NK細胞は、アッセイ前に30分間プレートに接着した。グルコース、オリゴマイシン、および2DG溶液を、緩衝化されたSeahorse培地で10倍の濃度で調製し、校正プレートのポートA、B、およびCに注入した。ECARの読み取り値は、6.5~7分ごとに取得され、ECARの結果は、80分以上の平均読み取り値または各時点での平均読み取り値を表す。図164は、18t15-12sでNK細胞を一晩刺激すると、基礎ECARレベルが上昇したことを示す。グルコースおよびオリゴマイシンの添加は、18t15-12sで一晩刺激されたNK細胞の解糖および解糖能力の増強をそれぞれ示した(図164)。培地のみ、またはIL12、IL18、およびIL-15の混合物で一晩処理したNK細胞を、比較のために使用した(図164)。

【1189】

18t15-12sで刺激した後のNK細胞におけるホスホ-STAT4およびホスホ-STAT5レベルの増加を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56⁺ NK細胞をRosetteSep/ヒトNK細胞試薬(StemCell Technologies)で単離した。NK細胞の純度は70%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、およびCD69-APCFire750特異的な抗体(BioLegend)で染色することによって確認した。細胞をカウントし、0.1mLの完全培地(RPMI 1

640 (Gibco)、2mMのL-グルタミン (Thermo Life Technologies)、ペニシリン (Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン (Thermo Life Technologies)、および10% FBS (Hyclone)を補充)中の96ウェル平底プレートに $0.05 \times 10^6 / \text{mL}$ で再懸濁した。細胞を、hIL-12 ($10 \text{ ng} / \text{mL}$) (Biolegend)もしくはhIL-15 ($50 \text{ ng} / \text{mL}$) (NCI) (単一サイトカイン)、または18t15-12s (100 nM)で、 37°C および5% CO_2 で90分間刺激した。刺激していないNK細胞 (US)を対照として使用した。細胞を収集し、パラホルムアルデヒド (Sigma)で固定して、最終濃度1.6%にした。プレートを暗所で、室温で10分間インキュベートした。FACS緩衝液 (0.5% BSA (EMD Millipore)および0.001%アジ化ナトリウム (Sigma)を含む1X PBS (Hyclone)) ($100 \mu\text{L}$)を添加し、細胞を96ウェル「V」ボトムプレートに移した。細胞を1500RPMで、室温で5分間洗浄した。細胞ペレットを $100 \mu\text{L}$ の冷却メタノールと上下に穏やかにピペティングしながら混合し、細胞を 4°C で30分間インキュベートした。細胞を100mLのFACS緩衝液と混合し、1500RPMで、室温で5分間洗浄した。細胞ペレットを、4mLのpSTAT4 (BD Bioscience)およびpSTAT5抗体 (BD Bioscience)を含む50mLのFACS緩衝液と混合し、その後、暗所で、室温で30分間インキュベートした。細胞を100mLのFACS緩衝液と混合し、1500RPMで、室温で5分間洗浄した。細胞ペレットを50mLのFACS緩衝液と混合し、細胞をフローサイトメトリー (Celesta-BD Bioscience)によって分析した。図165は、NK細胞を18t15-12sとインキュベートすることにより、pSTAT4およびpSTAT5の増加が誘導されたことを示す (プロットされたデータ、正規化された倍率変化)。

【1190】

一連の実験を行い、ヒト血液から精製したNK細胞の酸素消費速度 (OCR) および細胞外酸性化速度 (ECAR) に対する18t15-12sまたはサイトカイン (例えば、IL12、IL18、およびIL-15)の混合物の効果を決定した。OCRおよびECARを、 Seahorse XF96アナライザーによって測定した。これらの実験では、新たにヒトNK細胞を、RosetteSep/ヒトNK細胞試薬 (StemCell Technologies)を使用した陰性選択によりヒト白血病から単離した。新たに精製したNK細胞を、18t15-12s (100 nM)またはrhIL12 ($10 \text{ ng} / \text{mL}$)、rhIL18 ($50 \text{ ng} / \text{mL}$)、および対照としてrhIL-15 ($50 \text{ ng} / \text{mL}$) サイトカインの混合物のいずれかで一晩 (16時間) 刺激した。翌日、細胞を洗浄してカウントし、同数の細胞を緩衝化したSeahorse培地に播種した。グルコース、オリゴマイシン、および2DG溶液を、緩衝化されたSeahorse培地で10倍の濃度で調製し、校正プレートのポートA、B、およびCに注入した。図166は、2体の個別のドナーからのOCR (左) およびECAR (右) のデータを示す。18t15-12sでNK細胞を一晩刺激すると、基礎ECARレベルおよびOCRレベルが上昇したことを示す。グルコースおよびオリゴマイシンの添加は、18t15-12sで一晩刺激されたNK細胞の解糖および解糖能力の増強をそれぞれ示した。培地のみ、またはIL12、IL18、およびIL-15の混合物で一晩処理したNK細胞を、比較のために使用した。

【1191】

実施例64: 2t2および/またはTGFRt15-TGFRsによるインビボでのNK細胞の刺激

C57BL/6マウスにおける免疫刺激に対する2t2構築物の効果を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、C57BL/6マウスを、対照溶液 (PBS)、または0.1、0.4、2、および $10 \text{ mg} / \text{kg}$ の2t2で皮下処理した。処理したマウスを処理の3日後に安楽死させた。脾臓重量を測定し、単一脾細胞懸濁液を調製した。脾細胞懸濁液を、結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1 (NK) 抗体で染色し

10

20

30

40

50

た。CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージ、ならびにリンパ球サブセットのCD25発現をフローサイトメトリーによって分析した。図167Aは、特に0.1~10mg/kgの用量レベルで、脾臓重量に基づいて2t2が脾細胞の増殖に効果的であることを示す。処理後、CD8⁺ T細胞のパーセンテージは、2および10mg/kgで対照処理マウスと比較して2t2処理マウスにおいて高かった（図167B）。NK細胞のパーセンテージはまた、試験した2t2の全ての用量で対照処理マウスと比較して2t2処理マウスにおいて高かった（図167B）。加えて、2t2は、CD4⁺ T細胞によるCD25発現を有意にアップレギュレートしたが、0.4~10mg/kgで処理した後に、CD8⁺ T細胞およびNK細胞ではCD25発現を有意にアップレギュレートしなかった（図167C）。

【1192】

C57BL/6マウスにおける免疫刺激に対するTGFRt15-TGFRs構築物の効果を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、C57BL/6マウスを、対照溶液（PBS）、または0.3、1、3、および10mg/kgのTGFRt15-TGFRsで皮下処理した。処理したマウスを処理の4日後に安楽死させた。脾臓重量を測定し、単一脾細胞懸濁液を調製した。脾細胞懸濁液を、結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1（NK）抗体で染色した。CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって分析した。図168Aは、TGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける脾臓の重量がTGFRt15-TGFRsの投薬量の増加とともに増加したことを示す。加えて、1mg/kg、3mg/kg、および10mg/kgのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける脾臓重量は、対照溶液で処理したマウスと比較して高かった。図168Bは、CD8⁺ T細胞およびNK細胞の両方のパーセンテージが、TGFRt15-TGFRsの投薬量の増加とともに増加したことを示す。具体的には、CD8⁺ T細胞のパーセンテージは、対照処理マウスと比較して、0.3mg/kg、3mg/kg、および10mg/kgのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスで高く、NK細胞のパーセンテージは、対照処理マウスと比較して、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、および10mg/kgのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスで高かった。

【1193】

西洋食を与えたApoE^{-/-}マウスにおける免疫刺激に対するTGFRt15-TGFRs構築物または2t2構築物の効果を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、6週齢の雌B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/Jマウス（Jackson Laboratory）に、21%脂肪、0.15%コレステロール、34.1%スクロース、19.5%カゼイン、および15%デンプンを含む西洋食（TD88137、Envigo Laboratories）を与えた。西洋食餌の8週間後、マウスにTGFRt15-TGFRsまたは2t2を3mg/kgで皮下注射した。処理の3日後、マウスを16時間絶食させ、その後、血液試料を後眼窩静脈叢穿刺によって収集した。血液を10μLの0.5M EDTAと混合し、リンパ球サブセット分析のために血液を20μL採取した。赤血球を、ACK（0.15M NH₄Cl、1.0mM KHCO₃、0.1mM Na₂EDTA、pH7.4）で溶解し、リンパ球を、FACS染色緩衝液（PBS中1%BSA）中、抗マウスCD8aおよび抗マウスNK1.1抗体で、4℃で30分間染色した。細胞を1回洗浄し、FACS Celestaを用いて分析した。Treg染色の場合、ACKで処理した血液リンパ球を、FACS染色緩衝液中、抗マウスCD4および抗マウスCD25抗体で、4℃で30分間染色した。細胞を1回洗浄し、固定/透過処理希釈標準溶液中に再懸濁し、室温で60分間インキュベートした。細胞を1回洗浄し、透過処理緩衝液中に再懸濁した。試料を300~400×gで、室温で5分間遠心分離し、上清を廃棄した。細胞ペレットを残留体積中に再懸濁し、体積を1×透過処理緩衝液で約100μLに調整した。抗Foxp3抗体を細胞に添加し、細胞を室温で30分間インキュベートした。透過処理緩衝液（200μL）を細胞に添加し、細胞を300~400×gで、室温で5分間遠心分離した。細胞をフローサイトメトリー染色緩衝液中

に再懸濁し、フローサイトメーター上で分析した。図169B～169Cは、TGFRt15-TGFRsでの処理により、西洋食を与えたApoE^{-/-}マウスにおけるNK細胞およびCD8⁺ T細胞のパーセンテージが増加したことを示す。図169Aは、2t2で処理するとTreg細胞のパーセンテージも増加したことを示す。

【1194】

実施例65：インビボでの免疫細胞の増殖の誘導

C57BL/6マウスにおける免疫細胞刺激に対する2t2構築物の効果を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、C57BL/6マウスを、対照溶液(PBS)、または0.1、0.4、2、および10mg/kgの2t2で皮下処理した。処理したマウスを処理の3日後に安楽死させた。脾臓重量を測定し、単一脾細胞懸濁液を調製した。脾細胞懸濁液を、結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1(NK)抗体で染色した。CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、およびNK細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって分析した。図170Aは、特に0.1～10mg/kgで、脾臓重量に基づいて2t2が脾細胞の増殖に効果的であることを示す。CD8⁺ T細胞のパーセンテージは、2および10mg/kgで対照処理マウスと比較して高かった(図170B)。加えて、NK細胞のパーセンテージは、試験した2t2の全ての用量で対照処理マウスと比較して高かった(図170B)。これらの結果は、2t2での処理が、C57BL/6におけるCD8⁺ T細胞およびNK細胞の増殖を誘導したことを示す。

【1195】

C57BL/6マウスにおける免疫刺激に対するTGFRt15-TGFRs構築物の効果を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、C57BL/6マウスを、対照溶液(PBS)、または0.1、0.3、1、3、および10mg/kgのTGFRt15-TGFRsで皮下処理した。処理したマウスを処理の4日後に安楽死させた。脾臓重量を測定し、脾臓細胞懸濁液を調製した。脾細胞懸濁液を、結合抗CD4、抗CD8、および抗NK1.1(NK)抗体で染色した。細胞を増殖マーカーKi67についてさらに染色した。図171Aは、TGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける脾臓重量がTGFRt15-TGFRsの投薬量の増加とともに増加したことを示す。加えて、1mg/kg、3mg/kg、および10mg/kgのTGFRt15-TGFRsで処理したマウスにおける脾臓の重量は、対照溶液のみで処理したマウスと比較して高かった。CD8⁺ T細胞およびNK細胞の両方のパーセンテージが、TGFRt15-TGFRsの投薬量の増加とともに増加した(図171B)。最後に、TGFRt15-TGFRsは、試験したTGFRt15-TGFRsの全ての用量で、CD8⁺ T細胞およびNK細胞の両方での細胞増殖マーカーKi67の発現を有意にアップレギュレートした。これらの結果は、TGFRt15-TGFRsでの処理が、C57BL/6におけるCD8⁺ T細胞およびNK細胞の両方の増殖を誘導したことを示す。

【1196】

西洋食を与えたApoE^{-/-}マウスにおける免疫刺激に対するTGFRt15-TGFRs構築物または2t2構築物の効果を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、6週齢の雌B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/Jマウス(Jackson Laboratory)に、21%脂肪、0.15%コレステロール、34.1%スクロース、19.5%カゼイン、および15%デンプンを含む西洋食(TD88137、Envigo Laboratories)を与えた。西洋食餌の8週間後、マウスにTGFRt15-TGFRsまたは2t2を3mg/kgで皮下注射した。処理の3日後、マウスを16時間絶食させ、その後、血液試料を後眼窩静脈叢穿刺によって収集した。血液を10μLの0.5M EDTAと混合し、リンパ球サブセット分析のために血液を20μL採取した。赤血球を、ACK(0.15M NH₄Cl、1.0mM KHCO₃、0.1mM Na₂EDTA、pH7.4)で溶解し、リンパ球を、FACS染色緩衝液(PBS中1%BSA)中、抗マウスCD8aおよび抗マウスNK1.1抗体で、4℃で30分間染色した。細胞を1回洗浄し、Fixation Buffer(BioLegendカタログ番号420801)中に室温で20分間再懸濁した。細胞を350×gで5分

10

20

30

40

50

間遠心分離し、固定した細胞をIntracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (BioLegendカタログ番号421002)中に再懸濁し、その後、 $350\times g$ で5分間遠心分離した。その後、細胞を抗Ki67抗体で、室温で20分間染色した。細胞をIntracellular Staining Permeabilization Wash Bufferで2回洗浄し、 $350\times g$ で5分間遠心分離した。その後、細胞をFACS染色緩衝液中に再懸濁した。リンパ球サブセットを、BD FACS Celestaを用いて分析した。図172Aに記載されるように、 $\text{ApoE}^{-/-}$ マウスを TGFRt15-TGFRs で処理することにより、NK細胞および CD8^{+} T細胞の増殖 (Ki67陽性染色) が誘導された。加えて、図172Bは、 $\text{ApoE}^{-/-}$ マウスを2t2で処理することにより、NK細胞および CD8^{+} T細胞の増殖 (Ki67陽性染色) が誘導されたことを示す。

10

【1197】

7t15-21s、 TGFRt15-TGFRs 、および2t2で処理した後のNSGマウスにおける7t15-21s+抗TF抗体を増殖したNK細胞の効果を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、 CD56^{+} NK細胞をRosetteSep/ヒトNK細胞試薬 (StemCell Technologies) で単離した。NK細胞の純度は90%超であり、 CD56-BV421 、 CD16-BV510 、 CD25-PE 、および CD69-APCFire750 抗体 (BioLegend) で染色することによって確認した。細胞をカウントし、2mLの完全培地 (RPMI 1640 (Gibco)、2mMのL-グルタミン (Thermo Life Technologies)、ペニシリン (Thermo Life Technologies)、ストレプトマイシン (Thermo Life Technologies)、および10%FBS (Hyclone) を補充) 中の24ウェル平底プレートに $2\times 10^6/\text{mL}$ で再懸濁した。細胞を、7t15-21s (100nM) および抗TF抗体 (50nM) で15日間刺激した。2日ごとに、細胞を、 $2\times 10^6/\text{mL}$ で、100nMの7t15-21sおよび50nMの抗TF抗体を含む新たな培地で再懸濁した。培養物の体積が増加するにつれて、細胞をより高い体積のフラスコに移した。倍率増殖にアクセスするためにトリパンプルーを使用して細胞をカウントした。7t15-21s+抗TF抗体で増殖させたNK細胞を、温かいHBSS緩衝液 (Hyclone) で1000 RPMで、室温で10分間3回洗浄した。7t15-21s+抗TF抗体で増殖させたNK細胞を、 $10\times 10^6/0.2\text{mL}$ HBSS緩衝液に再懸濁し、NSGマウス (NOD scidガンママウス) (Jackson Laboratories) の尾静脈に静脈内注射した。移したNK細胞を、7t15-21s (10ng/用量、腹腔内)、 TGFRt15-TGFRs (10ng/用量、腹腔内)、または2t2 (10ng/用量、腹腔内) のうちのいずれかで最大21日間48時間毎にサポートした。ヒト7t15-21s+抗TF抗体で増殖させたNK細胞の生着および持続性を、フローサイトメトリー (Celesta-BD Bioscience) によるhCD45、mCD45、hCD56、hCD3、およびhCD16抗体の血液染色で毎週測定した (データは、1群当たり3匹のマウスを表す)。図173は、養子導入した7t15-21s+抗TF抗体で増殖させたNK細胞を有するマウスを、対照処理マウスと比較して養子導入したNK細胞の7t15-21s-、 TGFRt15-TGFRs- 、または2t2によって誘導された増殖および持続性で処理したことを示す。

20

30

40

【1198】

実施例66：一本鎖構築物または多鎖構築物での処理後のNK媒介性細胞傷害性

NK細胞を TGFRt15-TGFRs で処理することによりNK細胞の細胞傷害性が増強されるかを決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、ヒトDaudiリンパ腫細胞をCellTrace Violet (CTV) で標識し、腫瘍標的細胞として使用した。マウスNKエフェクター細胞を、 3mg/kg での TGFRt15-TGFRs 皮下処理の4日後のC57BL/6雌マウス脾臓の磁気細胞選別法 (Miltenyi Biotec) を使用したNK1.1陽性選択で単離した。ヒトNKエフェクタ

50

一細胞を、RosetteSep／ヒトNK細胞試薬（Stemcell Technologies）を用いて、ヒト血液バフィーコート由来の末梢血単核細胞から単離した。標的細胞（ヒトDaudi Bリンパ腫細胞）を、50nMのTGFRt15-TGFRsの存在下またはTGFRt15-TGFRsの不在下（対照）でエフェクター細胞（マウスNKエフェクター細胞またはヒトNKエフェクター細胞のいずれか）と混合し、マウスNK細胞の場合は44時間、ヒトNK細胞の場合は20時間、37℃でインキュベートした。フローサイトメトリーを使用したヨウ化プロピジウム陽性のCTV標識細胞の分析により、標的細胞（Daudi）の生存率を評価した。Daudi阻害のパーセンテージを、式（1－実験試料中の生存腫瘍細胞数／NK細胞を含まない試料中の生存腫瘍細胞数）×100を使用して計算した。図174は、マウス（図174A）およびヒト（図174B）NK細胞が、TGFRt15-TGFRs活性化の不在下よりも、TGFRt15-TGFRsによるNK細胞活性化後にDaudi B細胞に対する有意に強い細胞傷害性を有したことを示す。

【1199】

TGFRt15-TGFRsで処理した後のマウスおよびヒトNK細胞の抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、ヒトDaudi Bリンパ腫細胞をCellTrace Violet（CTV）で標識し、腫瘍標的細胞として使用した。マウスNKエフェクター細胞を、3mg/kgでのTGFRt15-TGFRs皮下処理の4日後のC57BL/6雌マウス脾臓の磁気細胞選別法（Miltenyi Biotec）を使用したNK1.1陽性選択で単離した。ヒトNKエフェクター細胞を、RosetteSep／ヒトNK細胞試薬（Stemcell Technologies）を用いて、ヒト血液バフィーコート由来の末梢血単核細胞から単離した。標的細胞（Daudi B細胞）を、抗CD20抗体（10nMリツキシマブ、Genentech）の存在下および50nMのTGFRt15-TGFRsの存在下、またはTGFRt15-TGFRsの不在下（対照）で、エフェクター細胞（マウスNKエフェクター細胞またはヒトNKエフェクター細胞のいずれか）と混合し、マウスNK細胞の場合は44時間、ヒトNK細胞の場合は20時間、37℃でインキュベートした。Daudi B細胞は、抗CD20抗体のCD20標的を発現する。フローサイトメトリーを使用したヨウ化プロピジウム陽性のCTV標識細胞の分析により、インキュベーション後の標的細胞の生存率を評価した。Daudi阻害のパーセンテージを、式（1－実験試料中の生存腫瘍細胞数／NK細胞を含まない試料中の生存腫瘍細胞数）×100を使用して計算した。図175は、マウスNK細胞（図175A）およびヒトNK細胞（図175B）が、TGFRt15-TGFRs活性化の不在下よりも、TGFRt15-TGFRsによるNK細胞の活性化後にDaudi B細胞に対する強いADCC活性を有したことを示す。

【1200】

老化B16F10黒色腫細胞に対するTGFRt15-TGFRsで活性化したマウスNK細胞の細胞傷害性を決定するために一連の実験を行った。これらの実験では、C57BL/6マウスに10mg/kgのTGFRt15-TGFRsを4日間注入した後、脾臓NK細胞を単離することにより、マウスNK細胞をインビボで活性化した。その後、NK細胞を、100nMの2t2の存在下で7日間、インビトロで増殖させた。B16F10老化標的細胞（B16F10-SNC）を、CellTrace Violet（CTV）で標識し、異なるエフェクター：標的（E：T）比で活性化マウスNKエフェクター細胞と16時間インキュベートした。細胞をトリプシン処理し、洗浄し、ヨウ化プロピジウム（PI）溶液を含む完全培地に再懸濁した。老化細胞標的に対するTGFRt15-TGFRs/2t2で活性化されたNK細胞の細胞傷害性は、CTV標識細胞のPI染色に基づくフローサイトメトリーによってアクセスされた。所見は、TGFRt15-TGFRsによるNK細胞のインビボでの活性化と、それに続く2t2によるインビボでの増殖および活性化により、NK細胞による老化黒色腫腫瘍細胞の死滅が増加したことを示す（図176）。

【1201】

実施例67：がん、糖尿病、およびアテローム性動脈硬化症の治療

黒色腫マウスモデルにおける化学療法と組み合わせたTGF α 15-TGF α s+抗TRP1抗体(TA99)の抗腫瘍活性を評価するために一連の実験を行った。これらの実験では、C57BL/6マウスに 0.5×10^6 個のB16F10黒色腫細胞を皮下注射した。マウスを、1日目、4日目、および7日目に化学療法ドセタキセル(10mg/kg)(DTX)の3回投与で処理、その後、9日目に組み合わせ免疫療法TGF α 15-TGF α s(3mg/kg)+抗TRP1抗体TA99(200 μ g)の単回投与で処理した。図177Aは、処理レジメンの概略図を示す。腫瘍成長をキャリパー測定によって監視し、腫瘍体積を式 $(L \times W^2) / 2$ を使用して計算し、式中、Lは最大腫瘍直径であり、Wは垂直腫瘍直径である。図177Bは、DTX+TGF α 15-TGF α s+TA99での処理が、生理食塩水対照群およびDTX処理群と比較して腫瘍成長を有意に抑制したことを示す(N=10、****p<0.001、複数のt検定分析)。

10

【1202】

B16F10腫瘍モデルにおける免疫細胞サブセットを評価するために、末梢血分析を行った。これらの実験では、C57BL/6マウスにB16F10細胞を注射し、DTX、DTX+TGF α 15-TGF α s+TA99、または生理食塩水で処理した。DTX+TGF α 15-TGF α s+TA99群の免疫療法後2、5、および8日目、およびDTX群および生理食塩水群の腫瘍注射後11日目に、B16F10腫瘍を有するマウスの顎下静脈から採血した。RBCをACK溶解緩衝液中に溶解させ、リンパ球を洗浄し、抗NK1.1、抗CD8、および抗CD4抗体で染色した。細胞をフローサイトメトリー(Celesta-BD Bioscience)によって分析した。図177C~177Eは、DTX+TGF α 15-TGF α s+TA99処理が、生理食塩水処理群およびDTX処理群と比較して、腫瘍内のNK細胞およびCD8⁺T細胞のパーセンテージの増加を誘導したことを示す。

20

【1203】

17日目に、全RNAを、Trizolを使用して、生理食塩水、DTX、またはDTX+TGF α 15-TGF α s+TA99で処理したマウスの腫瘍から抽出した。全RNA(1 μ g)を、Quantitect Reverse Transcription Kit(Qiagen)を使用したcDNA合成に使用した。リアルタイムPCRを、老化細胞マーカー(F)p21(G)DPP4および(H)IL6用のFAM標識事前設計プライマーを使用して、CFX96 Detection System(Bio-Rad)で実行した。ハウスキーピング遺伝子18SリボソームRNAを、発現レベルの変動を正規化するための内部対照として使用した。18S rRNAに対する各標的mRNAの発現を、Ctに基づいて $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ として計算し、式中、 $\Delta Ct = Ct_{\text{標的}} - Ct_{18S}$ である。データを、生理食塩水対照と比較した倍率変化として表す。図177F~177Hは、DTX処理が老化腫瘍細胞の増加を誘導し、その後、TGF α 15-TGF α s+TA99免疫療法での処理後に減少したことを示す。

30

【1204】

2t2によるApoE^{-/-}マウスの西洋食誘発性高血糖の改善を調査するために一連の実験を行った。これらの実験では、6週齢の雌B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/Jマウス(Jackson Laboratory)に、21%脂肪、0.15%コレステロール、34.1%スクロース、19.5%カゼイン、および15%デンプンを含む西洋食(TD88137, Envigo Laboratories)を与えた。西洋食餌の8週間後、マウスにTGF α 15-TGF α sまたは2t2を3mg/kgで皮下注射した。処理の3日後、マウスを16時間絶食させ、その後、血液試料を後眼窩静脈叢穿刺によって収集した。血糖値を、一滴の新鮮な血液を使用して血糖値計(OneTouch UltraMini)およびGenUltimated試験条片で検出した。図178Aに示されるように、2t2処理は、西洋食によって誘発された高血糖を軽減した(p<0.04)。血漿インスリンレベルおよびレジスチンレベルを、Eve Techno

40

50

Logies製のMouse Rat Metabolic Arrayを用いて分析した。HOMA-IRを、以下の式：恒常性モデル評価-インスリン抵抗性＝グルコース（mg/dL）×インスリン（mU/mL）／405を使用して計算した。図178Bに示されるように、2t2およびTGFRt15-TGFRs処理は、未処理群と比較してインスリン抵抗性を低下させた。2t2（ $p < 0.02$ ）およびTGFRt15-TGFRs（ $p < 0.05$ ）は両方とも、図178Cに示されるように、未処理群と比較してレジスチンレベルを有意に低下させ、これは、2t2およびTGFRt15-TGFRsによって誘導されたインスリン抵抗性の低下に関連している可能性がある（図F3B）。

【1205】

実施例68：NK細胞のサイトカイン誘導性メモリー様NK細胞への分化の誘導

18t15-12sで刺激した後のNK細胞のサイトカイン誘導性メモリー様NK細胞（CIMK-NK細胞）への分化を評価するために一連の実験を行った。これらの実験では、新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56⁺ NK細胞をRosette Sep／ヒトNK細胞試薬（StemCell Technologies）で単離した。NK細胞の純度は90%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、およびCD69-APCFire750抗体（BioLegend）で染色することによって確認した。細胞をカウントし、2mLの完全培地（RPMI 1640（Gibco）、2mMのL-グルタミン（Thermo Life Technologies）、ペニシリン（Thermo Life Technologies）、ストレプトマイシン（Thermo Life Technologies）、および10%FBS（Hyclone）を補充）中の24ウェル平底プレートに 2×10^6 /mLで再懸濁した。細胞を、刺激しない（「スパイクなし」）か、または18t15-12s（100nM）、もしくはrhIL15（50ng/mL）（Milttenyi）、rhIL18（50ng/mL）（Invivogen）、およびrhIL-12（10ng/mL）（Peprotech）を含む単一サイトカイン混合物（「単一サイトカイン」）で、37℃および5%CO₂で16時間刺激した。翌日、細胞を収集し、温かい完全培地で2回、1000RPMで、室温で10分間洗浄した。細胞を、rhIL-15（1ng/mL）を含む2mLの完全培地中の24ウェル平底プレートに 2×10^6 /mLで再懸濁した。2日毎に、培地の半分を、rhIL-15を含む新鮮な完全培地と交換した。

【1206】

7日目のNK細胞のメモリー表現型の変化を評価するために、細胞を、細胞表面CD56、CD16、CD27、CD62L、NKp30、およびNKp44（BioLegend）に対する抗体で染色した。表面染色後、細胞を、FACS緩衝液（1X PBS（Hyclone）、0.5%BSA（EMD Millipore）および0.001%アジ化ナトリウム（Sigma）を含む）中で洗浄した（1500RPM、室温で5分間）。2回洗浄した後、細胞をフローサイトメトリー（Celesta-BD Bioscience）によって分析した。図179は、NK細胞を18t15-12sとインキュベートすることにより、CD27、CD62L、およびNKp44を発現するCD16⁺CD56⁺ NK細胞のパーセンテージが増加し、CD16⁺CD56⁺ NK細胞中のNKp30のレベル（MFI）が増加したことを示す。

【1207】

実施例69．CD44メモリーT細胞のアップレギュレーション

C57BL／6マウスをTGFRt15-TGFRsまたは2t2で皮下処理した。処理したマウスを安楽死させ、単一脾細胞懸濁液を処理の4日後（TGFRt15-TGFRs）または3日後（2t2）に調製した。調製した脾細胞を蛍光色素結合抗CD4、抗CD8、および抗CD44抗体で染色し、CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞中のCD44^高 T細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって分析した。結果は、TGFRt15-TGFRsおよび2t2がCD4⁺およびCD8⁺ T細胞でのメモリーマーカーCD44の発現をアップレギュレートしたことを示す（図180）。これらの所見は、TGFRt15-TGFRsおよび2t2がマウスT細胞のメモリーT細胞への分化

10

20

30

40

50

を誘導することができたことを示す。

【1208】

実施例70：質感および／または外観および／または毛髪の改善

毛髪の再成長に対する2t2の効果調べるために、C57BL6/Jマウス(Jackson Laboratory)の背側の毛を最初にバリカンで短くし、続いて脱毛クリーム(Nair)を剃毛した領域に30秒間塗布してから、きれいに拭いた。4時間後、2t2(3mg/kg、単回投与)、低用量組換えIL-2(25000IU、連続5日、1用量/日)、またはPBSを皮下投与した。マウスを、毛髪の再成長に関連する皮膚の色素沈着について観察し、画像を撮影し、ImageJソフトウェアを使用して分析した。図181Aは、PBS、2t2、またはIL-2で処理したマウスの脱毛から10日後の皮膚の色素沈着を示す。図181Bは、ImageJソフトウェアを使用して分析した、処理の10日後のマウスの各群の色素沈着率を示す。結果は、2t2またはIL-2でマウスを処理すると、PBSで処理したマウスと比較して、脱毛後の毛髪の再成長が促進したことを示した。

10

【1209】

C57BL6/Jマウス(Jackson Laboratory)の背側の毛を最初にバリカンで短くした後に、脱毛クリーム(Nair)を剃毛した領域にちょうど30秒間塗布してから、きれいに拭いた。4時間後、2t2(3mg/kg、単回投与)、低用量組換えIL-2(25000IU、連続5日、1用量/日)、またはPBSを皮下投与した。マウスを、毛髪の再成長に関連する皮膚の色素沈着について観察し、画像を撮影し、ImageJソフトウェアを使用して分析した。図182は、PBS、2t2、またはIL-2で処理したマウスの脱毛から14日後の皮膚の色素沈着を示す。結果は、2t2またはIL-2でマウスを処理すると、PBSで処理したマウスと比較して、脱毛後の毛髪の再成長が促進したことを示した。

20

【1210】

実施例71：一本鎖または多鎖キメラポリペプチドでの処理後の組織因子凝固アッセイ

一本鎖または多鎖キメラポリペプチドでの処理後の血液凝固を評価するために一連の実験を行った。血液凝固カスケード経路を開始するために、組織因子(TF)を第VIIa因子(FVIIa)に結合して、TF/FVIIa複合体を形成する。その後、TF/FVIIa複合体を第X因子(FX)に結合し、FXをFXaに変換する。

30

【1211】

第VIIa因子(FVIIa)活性アッセイ

血液凝固を測定するための1つのアッセイは、第VIIa因子(FVIIa)活性の測定を含む。このタイプのアッセイは、組織因子およびカルシウムの存在を必要とする。TF/FVIIa複合体活性を、小さい基質または天然タンパク質基質、例えば、第X因子(FX)を用いて測定することができる。FXを基質として使用する場合、リン脂質もTF/FVIIa活性に必要とされる。このアッセイでは、FVIIa活性を、FVIIa特異的発色性基質S-2288(Diapharma, West Chester, OH)を用いて決定する。S-2288基質の色の変化を分光光度法で測定することができ、これは、FVIIa(TF/FVIIa複合体等)のタンパク質分解活性に比例する。

40

【1212】

これらの実験では、以下の群：組織因子ドメインの219アミノ酸細胞外ドメイン(TF₂₁₉)、野生型組織因子ドメインを有する多鎖キメラポリペプチド、および変異体組織因子ドメインを有する多鎖キメラポリペプチドのFVIIa活性を比較した。変異体組織因子分子を含むキメラポリペプチドを、アミノ酸部位：Lys20、Ile22、Asp58、Arg135、およびPhe140でのTFドメインへの変異により構築した。

【1213】

FVIIaの活性を評価するために、FVIIa、およびTF₂₁₉またはTF₂₁₉含有多鎖キメラポリペプチドを、96ウェルELISAプレートの全てのウェル中に全体積70μL中等モル濃度(10nM)で混合した。37℃で10分間インキュベートした後

50

、10 μ Lの8mM S-2288基質を添加して、反応を開始した。その後、37℃で20分間インキュベートし続けた。最後に、色の変化を、吸光度を405nmで読み取ることによって監視した。様々なTF/VIIa複合体のOD値を表1および表2に示す。表1は、TF₂₁₉、21t15-21s野生型(WT)、および21t15-21s変異体(Mut)の比較を示す。表2は、TF₂₁₉、21t15-TGFRs野生型(WT)、および21t15-TGFRs変異体(Mut)の比較を示す。これらのデータは、発色性S-2288を基質として使用した場合、TF₂₁₉含有多鎖キメラポリペプチド(例えば、21t15-21s-WT、21t15-21s-Mut、21t15-TGFRS-WT、および21t15-TGFRS-Mut)がTF₂₁₉よりも低いFVIIa活性を有することを示す。注目すべきことに、TF₂₁₉変異を含む多鎖キメラポリペプチドは、野生型TF₂₁₉を含む多鎖キメラポリペプチドと比較して、はるかに低いFVIIa活性を示した。

【1214】

(表1) FVIIa 活性

分子	405nmでのOD値
TF ₂₁₉	0.307
21t15/21S-WT	0.136
21t15/21S-Mut	0.095

WT：野生型TF₂₁₉、Mut：TF₂₁₉含有変異。

【1215】

(表2) FVIIa 活性

分子	405nmでのOD値
TF ₂₁₉	0.345
21t15/TGFRS-WT	0.227
21t15/TGFRS-Mut	0.100

WT：野生型TF₂₁₉、Mut：TF₂₁₉含有変異。

【1216】

第X因子(FX) 活性化アッセイ

血液凝固を測定するための追加のアッセイは、第X因子(FX)の活性化の測定を含む。簡潔には、TF/VIIaは、カルシウムおよびリン脂質の存在下で、血液凝固第X因子(FX)を第Xa因子(FXa)に活性化する。TFの膜貫通ドメインを含むTF₂₄₃は、FXをFXaに活性化する際に膜貫通ドメインを含まないTF₂₁₉よりもはるかに高い活性を有する。FXのTF/VIIa依存性活性化を、FXa特異的発色性基質S-2765(Diapharma, West Chester, OH)を使用してFXa活性を測定することによって決定する。S-2765の色の変化を分光光度法で監視することができ、これは、FXaのタンパク質分解活性に比例する。

【1217】

これらの実験では、多鎖キメラポリペプチド(18t15-12s、マウス(m)21t15、21t15-TGFRs、および21t15-7s)によるFX活性化を、陽性対照(Innovin)またはTF₂₁₉と比較した。TF₂₁₉(またはTF₂₁₉含有多鎖キメラポリペプチド)/FVIIa複合体を、96ウェルELISAプレートの丸底ウェル中に50 μ Lの体積中等モル濃度(各0.1nM)で混合し、その後、10 μ Lの180nM FXを添加した。37℃で15分間インキュベートしている間にFXをFXaに変換し、その後、8 μ Lの0.5M EDTA(カルシウムをキレート化し、ひいて

はTF/VIIaによるFX活性化を終了させる)を各ウェルに添加して、FX活性化を停止した。次に、10 μ Lの3.2mM S-2765基質を反応混合物に添加した。直ちにプレート吸光度を405nmで測定し、0時点での吸光度として記録した。その後、プレートを37 $^{\circ}$ Cで10~20分間インキュベートした。色の変化を、インキュベートした後に吸光度を405nmで読み取ることによって監視した。発色性基質S-2765を使用してFXa活性によって測定されたFX活性化の結果を図183に示す。この実験では、脂質化組換えヒトTF₂₄₃を含む市販のプロトロンビン試薬であるInnovinを、FX活性化の陽性対照として使用した。Innovinを精製水で再構成して、約10nMのTF₂₄₃にした。次に、等体積の0.2nMのFVIIaを0.2nMのInnovinと混合することにより、0.1nMのTF/VIIa複合体を作製した。Innovinが非常に強力なFX活性化活性を示した一方で、TF₂₁₉およびTF₂₁₉含有多鎖キメラポリペプチドは非常に低いFX活性化活性を有し、TF₂₁₉がインビボで天然基質FXを活性化するためにTF/FVIIa複合体では活性でないことを確認した。

【1218】

プロトロンビン時間試験

血液凝固を測定するための第3のアッセイは、血液凝固活性を測定するプロトロンビン時間(PT)試験である。ここでは、PT試験を、市販の正常ヒト血漿(Ci-Trol Coagulation Control, Level I)を使用して行った。標準PT試験のために、凝固反応を、カルシウムの存在下で、脂質化組換えヒトTF₂₄₃であるInnovinの添加によって開始した。凝固時間を、STart PTアナライザー(Diagnostica Stago, Parsippany, N. J.)によって監視および報告した。PTアッセイを、PTアッセイ緩衝液(50mMトリス-HCl、pH7.5、14.6mM CaCl₂、0.1%BSA)中に希釈した0.2mLの様々なInnovin希釈物を37 $^{\circ}$ Cで予熱した0.1mLの正常ヒト血漿を含むキュベットに注入することによって開始した。PTアッセイでは、PT時間(凝固時間)が短いほどTF依存性凝固活性が高いことを示し、PT(凝固時間)が長いほどTF依存性凝固活性が低いことを意味する。

【1219】

図184に見られるように、異なる量のInnovin(例えば、10nMの脂質化組換えヒトTF₂₄₃と同等の精製水で再構成したInnovinを100%のInnovinとみなす)のPTアッセイへの添加は、用量反応関係を示し、TF₂₄₃濃度が低いほどPT時間が長くなった(凝固活性が低くなった)。例えば、0.001%のInnovinのPT時間は110秒を超え、これは緩衝液のみの場合とほぼ同じであった。

【1220】

別の実験では、PT試験を、TF₂₁₉、ならびに18t15-12s、7t15-21s、21t15-TGFRs-WT、および21t15-TGFRs-Mutを含む多鎖キメラポリペプチドに対して行った。図185は、TF₂₁₉およびTF₂₁₉含有多鎖キメラポリペプチド(100nMの濃度)が長時間のPT時間を有し、非常に低い凝固活性または凝固活性なしを示す。

【1221】

多鎖キメラポリペプチドのサイトカイン成分に対する受容体を有する他の細胞(32D β またはヒトPBMC)の存在下で多鎖キメラポリペプチドをインキュベートすることがPTアッセイにおける凝固時間に影響を及ぼすかを評価するための研究も実施した。IL-15受容体を発現する細胞(32D β 細胞)またはIL-15受容体およびIL-21受容体を発現する細胞(PBMC)が、IL-15含有多鎖キメラポリペプチドを細胞FVIIa受容体として模倣天然TFに結合するかを試験するために、TF₂₁₉含有多鎖キメラポリペプチド(各分子100nMの濃度)をPTアッセイ緩衝液中に希釈し、32D β 細胞(2 $\times$ 10⁵細胞/mL)またはPBMC(1 $\times$ 10⁵細胞/mL)と室温で20~30分間プレインキュベートした。その後、PTアッセイを上述のように実施した。図186および図187は、100nMの最終濃度で32D β 細胞(図186)またはPB

MC (図187) と混合したTF₂₁₉ およびTF₂₁₉ 含有多鎖キメラポリペプチドが、0.001~0.01%のInnovinと同様の長時間のPT時間を有したことを示す(0.1pM~1.0pMのTF₂₄₃と同等)。相対的TF₂₄₃活性のパーセンテージで表すと、TF₂₁₉ 含有多鎖キメラポリペプチドは、Innovinと比較して100,000~1,000,000倍低いTF依存性凝固活性を有した。これは、分子が32DβまたはPBMC等のインタクトな細胞膜表面に結合している間でさえも、TF₂₁₉ 含有多鎖キメラポリペプチドが非常に低いTF依存性凝固活性を有したまたはTF依存性凝固活性を有しなかったことを示した。

【1222】

実施例72：7t15-21s137L (ロングバージョン) の特徴付け

10

7t15構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は、以下の通りである(配列番号210)。

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCT
CCAGCGCCTACTCC

(ヒトIL7)

GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGA
GCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT
GAAGGAGATCGGCTCCAACCTGCCCTCAACAACGAGTTCAAC
TTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCA
TGTTCTCTGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTCT
GAAGATGAACTCCACC GGCGACTTTCGACCTGCACCTGCTG
AAGGTGTCCGAGGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCG
GACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGGC
CCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAG
GAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGAAGAGGC
TGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGAT
GGGCACCAAGGAGCAT

20

(ヒト組織因子219)

AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTT
GGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACC
CAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGAGATCAGCACCC
AAGTCCGGCGACTGGAAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCG
ACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGT
GAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCC
GGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTAT
ACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAA
TTTAGGACAGCCCCACCATCCAAGCTTTGAGCAAGTTGGC
ACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAG
TGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGGATGTGTT
CGGC AAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCC
TCTTCTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACG
AGTTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTT
CAGCGTGCAAGCTGTGATCCCTCCTCCGGACCGTGAAATAGG
AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTG CATGGGCCAAGAAA
AGGGCGAGTTCCGGGAG

30

(ヒトIL-15)

AACTGGGTGAACGTCAATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAG
ATTTAATTCAAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACAC
AGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATG

40

50

AAATGTTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGA
GCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAAT
CATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTG
ACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGA
AGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGT
CCAGATGTTTCATCAATACCTCC

【1223】

7 t 15 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである（配列番号209）。

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSAYS

（ヒトIL7）

DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLD SMKEIGSNCLNNEFN
FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK
EQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTK EH

（ヒト組織因子219）

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQIST
KSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPA
GNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQVG
TKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKS
SSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF SVQAVIPSR TVNR
KSTDSPVECMGQEKGEFRE

（ヒトIL-15）

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM
KCFLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNV
TESGCKECEEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

【1224】

21 s 137 L 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は、以下の通りである（配列番号331）。

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCT
CCAGCGCCTACTCC

（ヒトIL-21）

CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCA
TCGACATCGTTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCT
GGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCGGAGGACGTGGAGACC
AACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCC
AGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT
CAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCC
ACAAACGCCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCC
CCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTT
CCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCAT
CAGCACCTGTCTCTCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

（ヒトIL-15R α sushiドメイン）

ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACA
TCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTA
TATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACACGC
AGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGG
CTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGATCCGG

10

20

30

40

50

((G4S) 3リンカー)

GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAG
GATCT

(ヒトCD137L)

CGCGAGGGTCCCCGAGCTTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCC
TCTTGGACCTGCGGCAGGGGCATGTTTTCGCGCAGCTGGTGGC
CCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCTTGAGCTGGTAC
AGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCTTGACGGGGGGCC
TGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAA
GGCTGGAGTCTACTATGTCTTTCTTTCAACTAGAGCTGCGG
CGCGTGGTGGCCGGCGAGGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTG
CGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGC
CGCCCTGGCTTTGACCGTGACCTGCCACCCGCCCTCCTCC
GAGGCTCGGAACTCGGCCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGC
TGCACCTGAGTGCCGGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCA
CACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCCTGGCAGCTTACCCAG
GGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAA
TCCCAGCCGGACTCCCTTACCCGAGGTCTGGAA

【1225】

21s137L融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は、以下の通りである（配列番号332）。

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(ヒトIL-21)

QGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET
NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPS
TNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIH
QHLSSSRTHGSEDS

(ヒトIL-15R α sushiドメイン)

ITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTS
SLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIR

((G4S) 3リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(ヒトCD137L)

REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY
SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR
RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASS
EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ
GATVVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

【1226】

7t15-21s137L中のCD137L部分がCD137（4.1BB）に結合するためにインタクトであるかを評価するために以下の実験を実施した。1日目に、96ウェルプレートをR5（コーティング緩衝液）中100 μ L（2.5 μ g/mL）のGAH IgG Fc（G-102-C、R&D Systems）で一晩コーティングした。2日目に、プレートを3回洗浄し、PBS中の1%BSA300 μ Lで37 $^{\circ}$ Cで2時間ブロックした。10ng/mLの4.1BB/Fc（838-4B、R&D Systems）を100 μ L/ウェルで、室温で2時間添加した。3回洗浄した後、7t15-21s137L（ロングバージョン）もしくは7t15-21s137L（ショートバージョン）を10nMから、または組換えヒト4.1BBLを180ng/mLから、1/3希釈で添加し、その後、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。3日目に、プレートを3回洗浄し、5

10

20

30

40

50

00 ng/mL のビオチン化ヤギ抗ヒト 4.1 BBL (BAF2295、R&D Systems) を 100 μ L / ウェルで適用し、その後、室温で 2 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、0.25 μ g/mL の HRP-SA (Jackson ImmunoResearch) と 100 μ L / ウェルで 30 分間インキュベートした。その後、プレートを 3 回洗浄し、100 μ L の ABTS と室温で 2 分間インキュベートした。結果を 405 nm で読み取った。図 188 に示されるように、7t15-21s137L (ロングバージョン) および 7t15-21s137L (ショートバージョン) はいずれも、組換えヒト 4.1 BBL リガンド (rhCD137L、薄灰色の星) と比較して、4.1 BB/Fc (濃色のひし形および灰色の四角) と相互作用することができた。7t15-21s137L (ロングバージョン) (濃色のひし形) は、7t15-21s137L (ショートバージョン) (灰色の四角) と比較して 4.1 BB/Fc とより良好に相互作用した。

【1227】

7t15-21s137L (ロングバージョン) 中の成分 IL7、IL21、IL15、および 4.1 BBL が ELISA を使用して個々の抗体によって検出されるためにインタクトであるかを評価するために以下の実験を実施した。96 ウェルプレートを R5 (コーティングバッファー) 中の 100 μ L (4 μ g/mL) の抗 TF (ヒト IgG1) でコーティングし、RT で 2 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、PBS 中の 100 μ L の 1% BSA でブロックした。精製した 7t15-21s137L (ロングバージョン) を 10 nM から 1/3 希釈で添加し、その後、室温で 60 分間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、500 ng/mL のビオチン化抗 IL7 (506602、R&D Systems)、500 ng/mL のビオチン化抗 IL21 (13-7218-81、R&D Systems)、50 ng/mL のビオチン化抗 IL15 (BAM247、R&D Systems)、または 500 ng/mL のビオチン化ヤギ抗ヒト 4.1 BBL (BAF2295、R&D Systems) を各ウェルに添加し、室温で 60 分間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、0.25 μ g/mL の HRP-SA (Jackson ImmunoResearch) と 100 μ L / ウェルで、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを 4 回洗浄し、100 μ L の ABTS と室温で 2 分間インキュベートした。吸光度結果を 405 nm で読み取った。図 189A~189D に示されるように、7t15-21s137L (ロングバージョン) 中の IL7、IL21、IL15、4.1 BBL を含む成分を個々の抗体によって検出した。

【1228】

7t15-21s137L (ロングバージョン) および 7t15-21s137L (ショートバージョン) における IL15 の活性を評価するために以下の実験を実施した。IL2R $\alpha\beta\gamma$ 発現 CTL2 細胞の増殖を促進する 7t15-21s137L (ロングバージョン) および 7t15-21s137L (ショートバージョン) の能力を、組換え IL15 の能力と比較した。IL15 依存性 CTL2 細胞を IMDM-10% FBS で 5 回洗浄し、ウェルに 2×10^4 細胞 / ウェルで播種した。連続希釈した 7t15-21s137L (ロングバージョン)、7t15-21s137L (ショートバージョン)、または IL15 を細胞に添加した。細胞を CO₂ インキュベーター内で、37°C で 3 日間インキュベートした。3 日目に 20 μ L の PrestoBlue (A13261、ThermoFisher) を各ウェルに添加し、CO₂ インキュベーター内で、37°C でさらに 4 時間インキュベートすることにより、細胞増殖を検出した。570~610 nm での生吸光度をマイクロタイタープレートリーダーで読み取った。図 190 に示されるように、7t15-21s137L (ロングバージョン)、7t15-21s137L (ショートバージョン)、および IL15 は全て、CTL2 細胞増殖を促進した。7t15-21s137L (ロングバージョン)、7t15-21s137L (ショートバージョン)、および IL15 の EC₅₀ は、それぞれ、51.19 pM、55.75 pM、および 4.947 pM である。

【1229】

実施例 73：2t2によるTreg細胞の誘導

健康なドナー（ドナー163）の末梢血単核細胞（PBMC）は、Ficoll Plus（GE17144003）によって5mLの全血バフィーコートから単離された。その後、PBMCをACKで溶解して、赤血球を除去した。細胞をIMDM-10%FBSで洗浄し、カウントした。1.8×10⁶細胞（100μL／チューブ）をフローチューブに播種し、50μLの下降する2t2またはIL2（15000、1500、150、15、1.5、0.15、または0pM）および50μLの前染色抗体（抗CD8-BV605および抗CD127-AF647）でインキュベートした。細胞を水浴中で37℃で30分間インキュベートした。200μLの予熱したBD Phosflow Fix Buffer I（カタログ番号557870、Becton Dickinson Biosciences）を水浴中で、37℃で10分間添加して、刺激を停止した。細胞（4.5×10⁵細胞／100μL）を、V字型96ウェルプレートに移し、スピンドウンした後、100μLの-20℃で予冷したBD Phosflow Perm Buffer III（カタログ番号BD Biosciences）で氷上で30分間透過処理した。その後、細胞を、200μLのFACS緩衝液で2回徹底的に洗浄し、蛍光抗体のパネル（抗CD25-PE、CD4-PerCP-Cy5.5、CD56-BV421、CD45RA-PE-Cy7、およびpSTAT5a-AF488）で染色して、異なるリンパ球亜集団を区別し、pSTAT5aの状態を評価した。細胞をスピンドウンし、FACS Celesta分析のために200μLのFACS緩衝液に再懸濁した。図191Aに示されるように、2t2の6pMはCD4⁺CD25^高Treg細胞におけるStat5aのリン酸化を誘導するのに十分であったが、43.11pMのIL-2がリンパ球の同じ集団におけるStat5aのリン酸化を誘導するために必要であった。対照的に、CD4⁺CD25⁻TconおよびCD8⁺Tcon細胞におけるStat5aのリン酸化を誘導する際に、IL-2と比較して、2t2は活性が低かった（図191B）または同等に活性であった（図191C）。これらの結果は、ヒトPBMC中のTregを活性化する際にIL2と比較して、2t2が優れており、かつ2t2は、ヒト血液リンパ球pStat5a応答のIL2と比較して、Treg選択性の増加を示すことを示唆する。

【1230】**実施例 74．一本鎖キメラポリペプチドを使用した毛髪の成長の改善**

7週齢のC57BL6/Jマウスの背側の毛を剃り、市販の脱毛クリームを使用して脱毛した。マウスに、同じ日に2t2の単回投与または低用量の市販の組換えIL-2を皮下注射し、その後さらに4日間毎日投与した。未処理のマウスを対照として使用した。10日目に、マウスを殺処分し、剃毛した領域の皮膚切片を調製した。脱毛の10日後にC57BL6/Jマウスの皮膚切片の代表的なH&E染色を、図192A～192Eに示す。図192Aは、毛を剃った後に脱毛を行った対照マウスのみを示し、図192Bは、脱毛の後に低用量のIL-2（1mg/kg）を投与したマウスを示し、図192C～192Eは、脱毛の後に0.3mg/kg（図192C）、1mg/kg（図192D）、および3mg/kg（図192E）の2t2を投与したマウスを示す。黒い矢印は、後で真皮に伸び、発毛を促進する、成長期の毛包を示す。図194は、各処理群の10視野あたりにカウントされた成長期の毛包の総数を示す。要約すると、データは、2t2分子が脱毛のみと比較して、成長期の毛包の数の増加をもたらしたことを示す。この効果も用量依存であった。

【1231】**実施例 75：免疫細胞のメモリー様免疫細胞への分化**

新鮮なヒト白血球を血液バンクから入手し、CD56⁺NK細胞をRosette Sep／ヒトNK細胞試薬（StemCell Technologies）で単離した。NK細胞の純度は70%超であり、CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750（BioLegend）で染色することにより確認した。細胞をカウントし、2mMのL-グルタミン（Thermo Life T

ech n o l o g i e s)、抗生物質（ペニシリン、10,000ユニット/mL、10,000 μ g/mL; Thermo Life Technologies)、および10% FBS (Hyclone)を補充したRPMI 1640培地 (Gibco)中の 2×10^6 細胞/mLの密度で再懸濁した。細胞(1mL)を24ウェル平底プレートに移し、処理しないか、または培地を用いて、7t15-21s+抗組織因子(TF)-抗体(IgG1)(50nM)で14日間増殖させるかのいずれかにであった。細胞を、約 1×10^6 細胞/mLの細胞密度を保つために新鮮+7t15-21s抗TF抗体(IgG1)(50nM)で補充した。

【1232】

処理群への非拡張NK細胞は、完全なDNAメチル化レベルの陽性対照として使用した(データを示さず)。NK細胞をペレット化し(1×10^6)、QIAamp UCP DNA Microキット(Qiagen)を使用してゲノムDNA(nDNA)を単離した。500ngの精製nDNAを、製造業者のプロトコルに従ってEZ DNAメチル化直接キット(Zymo Research)を使用して、亜硫酸水素ナトリウム処理に供した。亜硫酸塩処理により、DNAにメチル化依存性の変化が生じ、脱メチル化されたシトシンがウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変化しない。亜硫酸塩で処理したnDNA(10~50ng)を、順方向プライマーIFNG127F(5'-ATGGTATAGGTGGGTATAATGG-3')およびビオチン化リバースプライマーIFNG355R-ビオ(ビオチン-5'-CATATACTACACCTCCTCTA ACTAC-3')(GENEWIZ)を用いてPyromark PCRキット(Qiagen)を使用してT細胞中のDNAメチル化によって高度に調整されることが知られている、2つのCpG部位(CpG-186およびCpG-54、転写開始部位TSSに対する位置)を含むIFN γ プロモーターの228bp領域をテンプレートとしてPCR増幅した。PCR条件は、95°Cで15分、95°Cで30秒、56°Cで30秒、72°Cで60秒、続いて72°Cで10分の48サイクルであった。PCR増幅産物の完全性および品質は、1.2%TAEアガロースゲルで視覚化された。これら2つのCpG部位のDNAメチル化状態は、単一のCpG部位でのDNAメチル化を定量的に測定するための究極の判断基準技術であるピロシーケンスによって決定される。ピロシーケンス反応は、それぞれ、CpG部位186および54に特異的なDNAシーケンシングプライマーC186-IFNG135F(5'-GGTGGGTATAATGGG-3')(配列番号333)およびC54-IFNG261F(5'-ATTATTTTATTTTAAATAATTTGTG-3')(配列番号334)を使用して、Johns Hopkins Universityの遺伝資源コア施設で行われた。市販の非メチル化およびメチル化DNA(Zymo Research)を、DNAメチル化の対照として使用した。2つのCpG部位(186および54)のメチル化パーセンテージは、各処理のためにプールされた。DNAメチル化のパーセント差は、非曝露NK細胞で観察された2つのCpG部位でのDNAメチル化のレベルと比較して計算された。

【1233】

これら2つのIFN γ CpG部位のDNAメチル化状態の分析は、非曝露NK細胞と比較して、7t15-21s+抗TF抗体によって支持されるNK細胞では、より高レベルのDNA脱メチル化を示した(図194)。これらの7t15-21s+抗TF抗体で支持したNK細胞は、非曝露NK細胞と比較して、DNAメチル化(すなわち、脱メチル化)に47.70% $\pm$ 11.76の差を示した。これらの2つのIFN γ CpG部位のDNAメチル化レベルは、7t15-21s+抗TF抗体による処理後のIFN γ の発現の増加と相関した。これらのデータは、7t15-21s+抗TF抗体の組み合わせレジメンによるNK細胞の長期曝露(培養で14日間の増殖)が、2つの低メチル化IFN γ CpG部位(186および54)のDNA脱メチル化を誘導することができ、かつ7t15-21s+抗TF抗体(IgG1)が、NK細胞の自然免疫メモリーNK細胞への相互変換をもたらすCpG部位のDNA脱メチル化を介してIFN γ の遺伝子発現をエピジェネティックに再プログラムすることを示唆する。

10

20

30

40

50

【1234】

他の実施形態

本発明がその発明を実施するための形態と併せて記載されているが、前述の記述は、例証するものであり、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定するようには意図されていないことを理解されたい。他の態様、利点、および改変は、下記の特許請求の範囲内にある。

【1235】

例示的な実施形態

実施形態A1．一本鎖キメラポリペプチドであって、

(i) 第1の標的結合ドメイン、

(ii) 可溶性組織因子ドメイン、および

(iii) 第2の標的結合ドメイン

を含む、一本鎖キメラポリペプチド。

【1236】

実施形態A2．第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態A1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1237】

実施形態A3．一本鎖キメラポリペプチドが、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1238】

実施形態A4．可溶性組織因子と第2の標的結合ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態A1～A3のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1239】

実施形態A5．一本鎖キメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A1～A3のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1240】

実施形態A6．第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態A1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1241】

実施形態A7．一本鎖キメラポリペプチドが、第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1242】

実施形態A8．第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態A6またはA7に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1243】

実施形態A9．一本鎖キメラポリペプチドが、第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A6またはA7に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1244】

実施形態A10．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態A1～A9のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1245】

実施形態A11．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態A10に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1246】

実施形態A12．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含む、実施形態 A 1 1 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 4 7】

実施形態 A 1 3 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態 A 1 ~ A 9 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 4 8】

実施形態 A 1 4 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、抗原結合ドメインである、実施形態 A 1 ~ A 1 3 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 4 9】

実施形態 A 1 5 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態 A 1 4 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 5 0】

実施形態 A 1 6 . 抗原結合ドメインが、s c F v または単ドメイン抗体を含む、実施形態 A 1 3 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 5 1】

実施形態 A 1 7 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、C D 1 6 a、C D 2 8、C D 3、C D 3 3、C D 2 0、C D 1 9、C D 2 2、C D 1 2 3、I L - 1 R、I L - 1、V E G F、I L - 6 R、I L - 4、I L - 1 0、P D L - 1、T I G I T、P D - 1、T I M 3、C T L A 4、M I C A、M I C B、I L - 6、I L - 8、T N F α 、C D 2 6、C D 3 6、U L B P 2、C D 3 0、C D 2 0 0、I G F - 1 R、M U C 4 A C、M U C 5 A C、T r o p - 2、C M E T、E G F R、H E R 1、H E R 2、H E R 3、P S M A、C E A、B 7 H 3、E P C A M、B C M A、P - カドヘリン、C E A C A M 5、U L 1 6 結合タンパク質、H L A - D R、D L L 4、T Y R O 3、A X L、M E R、C D 1 2 2、C D 1 5 5、P D G F - D D、T G F - β 受容体 I I (T G F - β R I I) リガンド、T G F - β R I I リガンド、D N A M 1 リガンド、N K p 4 6 リガンド、N K p 4 4 リガンド、N K G 2 D リガンド、N K p 3 0 リガンド、s c M H C I リガンド、s c M H C I I リガンド、s c T C R リガンド、I L - 1 受容体、I L - 2 受容体、I L - 3 受容体、I L - 7 受容体、I L - 8 受容体、I L - 1 0 受容体、I L - 1 2 受容体、I L - 1 5 受容体、I L - 1 7 受容体、I L - 1 8 受容体、I L - 2 1 受容体、P D G F - D 受容体、幹細胞因子 (S C F) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ 3 リガンド (F L T 3 L) 受容体、M I C A 受容体、M I C B 受容体、U L P 1 6 結合タンパク質受容体、C D 1 5 5 受容体、C D 1 2 2 受容体、および C D 2 8 受容体からなる群から選択される標的に結合する、実施形態 A 1 ~ A 1 6 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 5 2】

実施形態 A 1 8 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態 A 1 ~ A 1 6 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 5 3】

実施形態 A 1 9 . 可溶性インターロイキン、サイトカイン、またはリガンドタンパク質が、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 7、I L - 8、I L - 1 0、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 2 1、P D G F - D、および S C F、F L T 3 L、M I C A、M I C B、および U L P 1 6 結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態 A 1 8 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 5 4】

実施形態 A 2 0 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態 A 1 ~ A 1 6 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1 2 5 5】

10

20

30

40

50

実施形態 A 2 1 . 可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体が、可溶性 T G F - β 受容体 I I (T G F - β R I I)、可溶性 T G F - β R I I I、可溶性 N K G 2 D、可溶性 N K p 3 0、可溶性 N K p 4 4、可溶性 N K p 4 6、可溶性 D N A M 1、s c M H C I、s c M H C I I、s c T C R、可溶性 C D 1 5 5、または可溶性 C D 2 8 である、実施形態 A 2 0 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 2 5 6 】

実施形態 A 2 2 . 可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態 A 1 ~ A 2 1 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 2 5 7 】

実施形態 A 2 3 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 A 2 2 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 2 5 8 】

実施形態 A 2 4 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 A 2 3 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 2 5 9 】

実施形態 A 2 5 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 A 2 4 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 2 6 0 】

実施形態 A 2 6 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 4 0 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上を含まない、実施形態 A 2 2 ~ A 2 5 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 2 6 1 】

実施形態 A 2 7 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 4 0 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 A 2 6 に記載の一本鎖キメラポリペ

10

20

30

40

50

プチド。

【1262】

実施形態A28．可溶性組織因子ドメインが、第VIIa因子に結合することができない、実施形態A1～A27のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1263】

実施形態A29．可溶性組織因子ドメインが、不活性第X因子を第Xa因子に変換しない、実施形態A1～A28のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1264】

実施形態A30．多鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態A1～A29のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

10

【1265】

実施形態A31．一本鎖キメラポリペプチドが、一本鎖キメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態A1～A30のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1266】

実施形態A32．一本鎖キメラポリペプチドが、そのN末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態A31に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1267】

実施形態A33．1つ以上の追加の標的結合ドメインが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態A32に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

20

【1268】

実施形態A34．一本鎖キメラポリペプチドが、少なくとも1つの追加の標的結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A33に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1269】

実施形態A35．一本鎖キメラポリペプチドが、そのC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態A31に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1270】

実施形態A36．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態A35に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

30

【1271】

実施形態A37．一本鎖キメラポリペプチドが、少なくとも1つの追加の標的結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A35に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1272】

実施形態A38．一本鎖キメラポリペプチドが、そのN末端およびC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態A31に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

40

【1273】

実施形態A39．N末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態A38に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1274】

実施形態A40．一本鎖キメラポリペプチドが、N末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A38に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

50

【1275】

実施形態A41. C末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態A38に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1276】

実施形態A42. 一本鎖キメラポリペプチドが、C末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態A38に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1277】

実施形態A43. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態A31～A42のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1278】

実施形態A44. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態A43に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1279】

実施形態A45. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態A44に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1280】

実施形態A46. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態A43に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1281】

実施形態A47. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態A46に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1282】

実施形態A48. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じアミノ酸配列を含む、実施形態A47に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1283】

実施形態A49. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態A31～A42のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1284】

実施形態A50. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、抗原結合ドメインである、実施形態A31～A49のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1285】

実施形態A51. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態A50に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1286】

実施形態A52. 抗原結合ドメインが、scFvまたは単一ドメイン抗体を含む、実施形態A51に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1287】

実施形態A53. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または

10

20

30

40

50

両方、ならびに1つ以上の標的結合ドメインが、CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II(TGF- β RII)リガンド、TGF- β RIIリガンド、DNAM1リガンド、Nkp46リガンド、Nkp44リガンド、NKG2Dリガンド、Nkp30リガンド、scMHC Iリガンド、scMHC IIリガンド、scTCRリガンド、IL-1受容体、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-7受容体、IL-8受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、PDGF-D受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、CD122受容体、およびCD28受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態A31~A52のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1288】

実施形態A54. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態A31~A52のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1289】

実施形態A55. 可溶性インターロイキン、サイトカイン、またはリガンドタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-D、およびSCF、FLT3L、MICA、MICB、およびULP16結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態A54に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1290】

実施形態A56. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態A31~A52のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1291】

実施形態A57. 可溶性受容体が、可溶性TGF- β 受容体II(TGF- β RII)、可溶性TGF- β RIII、可溶性NKG2D、可溶性Nkp30、可溶性Nkp44、可溶性Nkp46、可溶性DNAM1、scMHC I、scMHC II、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3、または可溶性CD28である、実施形態A56に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1292】

実施形態A58. 一本鎖キメラポリペプチドが、そのN末端にシグナル配列をさらに含む、実施形態A1~A57のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1293】

実施形態A59. 一本鎖キメラポリペプチドが、一本鎖キメラポリペプチドのN末端またはC末端に配置されたペプチドタグをさらに含む、実施形態A1~A58のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1294】

実施形態A60. 実施形態A1~A59に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかを含む、組成物。

10

20

30

40

50

【1295】

実施形態A61．組成物が、医薬組成物である、実施形態A60に記載の組成物。

【1296】

実施形態A62．実施形態A60またはA61に記載の組成物の少なくとも1つの用量を含む、キット。

【1297】

実施形態A63．実施形態A1～A59のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかをコードする、核酸。

【1298】

実施形態A64．実施形態A63に記載の核酸を含む、ベクター。

10

【1299】

実施形態A65．ベクターが、発現ベクターである、実施形態A64に記載のベクター。

【1300】

実施形態A66．実施形態A63に記載の核酸または実施形態A64またはA65に記載のベクターを含む、細胞。

【1301】

実施形態A67．一本鎖キメラポリペプチドを産生する方法であって、
一本鎖キメラポリペプチドの産生をもたらすのに十分な条件下で、実施形態A66に記載の細胞を培養培地中で培養することと、
一本鎖キメラポリペプチドを細胞および／または培養培地から回収することと
を含む、方法。

20

【1302】

実施形態A68．実施形態A67に記載の方法によって産生された一本鎖キメラポリペプチド。

【1303】

実施形態A69．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態A26に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1304】

実施形態A70．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態A69に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

30

【1305】

実施形態A71．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態A70に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1306】

実施形態A72．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と100%同一の配列を含む、実施形態A71に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1307】

実施形態A73．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態A26に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1308】

実施形態A74．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態A73に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

40

【1309】

実施形態A75．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態A74に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1310】

実施形態A76．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と100%同一の配列を含む、実施形態A75に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1311】

実施形態B1．一本鎖キメラポリペプチドであって、

50

- (i) 第1の標的結合ドメイン、
- (ii) 可溶性組織因子ドメイン、および
- (iii) 第2の標的結合ドメイン

を含み、

第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々、IL-2受容体に特異的に結合するか、または

第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々、IL-15受容体に特異的に結合する、一本鎖キメラポリペプチド。

【1312】

実施形態B2．第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態B1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1313】

実施形態B3．一本鎖キメラポリペプチドが、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1314】

実施形態B4．可溶性組織因子と第2の標的結合ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態B1～B3のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1315】

実施形態B5．一本鎖キメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B1～B3のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1316】

実施形態B6．第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態B1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1317】

実施形態B7．一本鎖キメラポリペプチドが、第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B1に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1318】

実施形態B8．第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態B6またはB7に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1319】

実施形態B9．一本鎖キメラポリペプチドが、第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B6またはB7に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1320】

実施形態B10．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンタンパク質である、実施形態B1～B9のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1321】

実施形態B11．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、可溶性IL-2タンパク質である、実施形態B10に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1322】

実施形態B12．可溶性IL-2タンパク質が、可溶性ヒトIL-2タンパク質である、実施形態B11に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1323】

実施形態B13．可溶性IL-2タンパク質が、配列番号78を含む、実施形態B12に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1324】

10

20

30

40

50

実施形態 B 1 4 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、可溶性 I L - 1 5 タンパク質である、実施形態 B 1 0 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 2 5 】

実施形態 B 1 5 . 可溶性 I L - 1 5 タンパク質が、可溶性ヒト I L - 1 5 タンパク質である、実施形態 B 1 4 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 2 6 】

実施形態 B 1 6 . 可溶性ヒト I L - 1 5 タンパク質が、配列番号 8 2 を含む、実施形態 B 1 5 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 2 7 】

実施形態 B 1 7 . 可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態 B 1 ~ B 1 6 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 2 8 】

実施形態 B 1 8 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 B 1 7 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 2 9 】

実施形態 B 1 9 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 B 1 8 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 3 0 】

実施形態 B 2 0 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 B 1 9 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 3 1 】

実施形態 B 2 1 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 4 0 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 B 1 7 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【 1 3 3 2 】

実施形態 B 2 2 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にア

10

20

30

40

50

ルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸140位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態B21に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1333】

実施形態B23．可溶性組織因子ドメインが、第VIIa因子に結合することができない、実施形態B1～B22のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1334】

実施形態B24．可溶性組織因子ドメインが、不活性第X因子を第Xa因子に変換しない、実施形態B1～B23のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1335】

実施形態B25．一本鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態B1～B24のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1336】

実施形態B26．一本鎖キメラポリペプチドが、そのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態B1～B25のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1337】

実施形態B27．一本鎖キメラポリペプチドが、そのN末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態B26に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1338】

実施形態B28．1つ以上の追加の標的結合ドメインが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態B27に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1339】

実施形態B29．一本鎖キメラポリペプチドが、少なくとも1つの追加の標的結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B28に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1340】

実施形態B30．一本鎖キメラポリペプチドが、そのC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態B26に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1341】

実施形態B31．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態B30に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1342】

実施形態B32．一本鎖キメラポリペプチドが、少なくとも1つの追加の標的結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B30に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1343】

実施形態B33．一本鎖キメラポリペプチドが、そのN末端およびC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態B26に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1344】

実施形態B34．N末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態B33に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1345】

実施形態B35．一本鎖キメラポリペプチドが、N末端における1つ以上の追加の抗原

10

20

30

40

50

結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B33に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1346】

実施形態B36．C末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つが、第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態B33に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1347】

実施形態B37．一本鎖キメラポリペプチドが、C末端における1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの1つと第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態B33に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1348】

実施形態B38．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインの各々が、IL-2受容体またはIL-15受容体に特異的に結合する、実施形態B26～B37のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1349】

実施形態B39．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインの各々が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態B38に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1350】

実施形態B40．1つ以上の追加の標的結合ドメインが、抗原結合ドメインである、実施形態B26～B37のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1351】

実施形態B41．抗原結合ドメインが、scFvまたは単ドメイン抗体を含む、実施形態B40に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1352】

実施形態B42．1つ以上の追加の標的結合ドメインが、CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II(TGF- β RII)リガンド、TGF- β RIIRリガンド、DNAM1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHCIリガンド、scMHCIIRリガンド、scTCRリガンド、IL-1受容体、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-7受容体、IL-8受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、PDGF-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、CD122受容体、およびCD28受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態B26～B37、B40、およびB41のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1353】

実施形態B43．1つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態B6～B37、B40、およびB41のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1354】

実施形態B44．可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFからなる群から選択される、実施形態B43に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1355】

実施形態B45．1つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態B6～B37、B40、およびB41のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1356】

実施形態B46．可溶性受容体が、可溶性TGF- β 受容体II(TGF- β RII)および可溶性TGF- β RIIIである、実施形態B45に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1357】

実施形態B47．一本鎖キメラポリペプチドが、そのN末端にシグナル配列をさらに含む、実施形態B1～B46のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1358】

実施形態B48．一本鎖キメラポリペプチドが、一本鎖キメラポリペプチドのN末端またはC末端に配置されたペプチドタグをさらに含む、実施形態B1～B47のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1359】

実施形態B49．実施形態B1～B48に記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかを含む、組成物。

【1360】

実施形態B50．組成物が、医薬組成物である、実施形態B49に記載の組成物。

【1361】

実施形態B51．実施形態B49またはB50に記載の組成物の少なくとも1つの用量を含む、キット。

【1362】

実施形態B52．実施形態B1～B48のいずれか1つに記載の一本鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかをコードする、核酸。

【1363】

実施形態B53．実施形態B52に記載の核酸を含む、ベクター。

【1364】

実施形態B54．ベクターが、発現ベクターである、実施形態B53に記載のベクター。

【1365】

実施形態B55．実施形態B52に記載の核酸または実施形態B53またはB54に記載のベクターを含む、細胞。

【1366】

実施形態B56．一本鎖キメラポリペプチドを産生する方法であって、
一本鎖キメラポリペプチドの産生をもたらすのに十分な条件下で、実施形態B55に記載の細胞を培養培地中で培養することと、
一本鎖キメラポリペプチドを細胞および／または培養培地から回収することとを含む、方法。

【1367】

実施形態B57．実施形態B56に記載の方法によって産生された一本鎖キメラポリペプチド。

【1368】

実施形態B58．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態B21に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1369】

実施形態 B 5 9 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 B 5 8 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1370】

実施形態 B 6 0 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 B 5 9 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1371】

実施形態 B 6 1 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と 1 0 0 % 同一の配列を含む、実施形態 B 6 0 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1372】

実施形態 B 6 2 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 B 2 1 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1373】

実施形態 B 6 3 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 B 6 2 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1374】

実施形態 B 6 4 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 B 6 3 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1375】

実施形態 B 6 5 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と 1 0 0 % 同一の配列を含む、実施形態 B 6 4 に記載の一本鎖キメラポリペプチド。

【1376】

実施形態 C 1 .

(a) 第 1 のキメラポリペプチドであって、

(i) 第 1 の標的結合ドメイン、

(i i) 可溶性組織因子ドメイン、および

(i i i) 一对の親和性ドメインの第 1 のドメイン

を含む、第 1 のキメラポリペプチドと、

(b) 第 2 のキメラポリペプチドであって、

(i) 一对の親和性ドメインの第 2 のドメイン、および

(i i) 第 2 の標的結合ドメイン

を含む、第 2 のキメラポリペプチドと

を含み、

第 1 のキメラポリペプチドと第 2 のキメラポリペプチドが、一对の親和性ドメインの第 1 のドメインと第 2 のドメインとの結合を介して会合している、多鎖キメラポリペプチド。

【1377】

実施形態 C 2 . 第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 C 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1378】

実施形態 C 3 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 C 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1379】

実施形態 C 4 . 可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1380】

実施形態 C 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1381】

実施形態C6．一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインが、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態C1～C5のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1382】

実施形態C7．第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態C1～C5のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1383】

実施形態C8．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態C1～C7のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1384】

実施形態C9．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態C8に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1385】

実施形態C10．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、実施形態C9に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1386】

実施形態C11．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態C1～C7のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1387】

実施形態C12．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、抗原結合ドメインである、実施形態C1～C11のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1388】

実施形態C13．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態C12に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1389】

実施形態C14．抗原結合ドメインが、scFvまたは単ドメイン抗体を含む、実施形態C12またはC13に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1390】

実施形態C15．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PD-L1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIリガンド、DNAM1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHC Iリガンド、scMHC IIリガンド、scTCRリガンド、IL-1受容体、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-7受容体、IL-8受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、PDGF-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、CD122受容体、およびCD28受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態C1～C14のいずれか1つ

40

50

に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1391】

実施形態C16．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態C1～C14のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1392】

実施形態C17．可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-D、SCF、FLT3L、MICA、MICB、およびULP16結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態C16に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1393】

実施形態C18．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態C1～C14のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1394】

実施形態C19．可溶性受容体が、可溶性TGF- β 受容体II(TGF- β RII)、可溶性TGF- β RIII、可溶性NKG2D、可溶性NKP30、可溶性NKP44、可溶性NKP46、可溶性DNAM1、scMHC I、scMHC II、scTCR、可溶性CD155、または可溶性CD28である、実施形態C18に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1395】

実施形態C20．第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含み、1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態C1～C19のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1396】

実施形態C21．第1のキメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間にリンカー配列、および／または1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態C20に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1397】

実施形態C22．第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態C1～C19のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1398】

実施形態C23．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態C22に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1399】

実施形態C24．第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態C22に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1400】

実施形態C25．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態C22に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1401】

実施形態C26．第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインの

50

うちの少なくとも1つと第1の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態C22に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1402】

実施形態C27. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に配置されており、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態C22に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1403】

実施形態C28. N末端に配置された1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つの追加の標的結合ドメインが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態C27に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1404】

実施形態C29. 第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチド内の少なくとも1つの追加の標的結合ドメインと第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態C27に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1405】

実施形態C30. C末端に配置された1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つの追加の標的結合ドメインが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態C27に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1406】

実施形態C31. 第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチド内の少なくとも1つの追加の標的結合ドメインと第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態C27に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1407】

実施形態C32. 可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、可溶性組織因子ドメインおよび／または一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態C27に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1408】

実施形態C33. 第1のキメラポリペプチドが、(i) 可溶性組織因子ドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間、および／または(ii) 一対の親和性ドメインの第1のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態C27に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1409】

実施形態C34. 第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態C1～C33のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1410】

実施形態C35. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインに直接隣接している、実施形態C34に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1411】

50

実施形態 C 3 6 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと一対の親和性ドメインの第 2 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 C 3 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 1 2 】

実施形態 C 3 7 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 2 のキメラポリペプチド内の第 2 の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態 C 3 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 1 3 】

実施形態 C 3 8 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 C 3 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【 1 4 1 4 】

実施形態 C 3 9 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態 C 2 0 ~ C 3 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 1 5 】

実施形態 C 4 0 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態 C 3 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【 1 4 1 6 】

実施形態 C 4 1 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態 C 4 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 1 7 】

実施形態 C 4 2 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態 C 3 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 1 8 】

実施形態 C 4 3 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態 C 4 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【 1 4 1 9 】

実施形態 C 4 4 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じアミノ酸配列を含む、実施形態 C 4 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 2 0 】

実施形態 C 4 5 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが異なる抗原に特異的に結合する、実施形態 C 2 0 ~ C 3 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【 1 4 2 1 】

実施形態 C 4 6 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 1 つ以上が、抗原結合ドメインである、実施形態 C 2 0 ~ C 4 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 2 2 】

実施形態 C 4 7 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態 C 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 4 2 3 】

実施形態 C 4 8 . 抗原結合ドメインが、s c F v を含む、実施形態 C 4 7 に記載の多鎖

50

キメラポリペプチド。

【1424】

実施形態C49. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIリガンド、DNAM1リガンド、NKp46リガンド、NKp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKp30リガンド、scMHC Iリガンド、scMHC IIリガンド、scTCRリガンド、IL-1受容体、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-7受容体、IL-8受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、PDGFR-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、CD122受容体、およびCD3受容体、およびCD28受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態C20~C48のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

【1425】

実施形態C50. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態C20~C48のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1426】

実施形態C51. 可溶性インターロイキン、サイトカイン、またはリガンドタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR-DD、およびSCF、FLT3L、MICA、MICB、およびULP16結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態C50に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1427】

実施形態C52. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態C20~C48のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1428】

実施形態C53. 可溶性受容体が、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHC I、scMHC II、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3、または可溶性CD28である、実施形態C52に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1429】

実施形態C54. 第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチドのN末端またはC末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態C1~C53のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1430】

実施形態C55. 第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチドのN末端ま

50

たはC末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態C 1～C 53のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1431】

実施形態C 56．可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態C 1～C 55のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1432】

実施形態C 57．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号93と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態C 56に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1433】

実施形態C 58．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号93と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態C 57に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1434】

実施形態C 59．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号93と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態C 58に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1435】

実施形態C 60．可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸20位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸22位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸45位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸58位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸94位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸135位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸140位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態C 56～C 59のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1436】

実施形態C 61．可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸20位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸22位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸45位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸58位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸94位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸135位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸140位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態C 60に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1437】

実施形態C 62．可溶性組織因子ドメインが、第VIIa因子に結合することができな

10

20

30

40

50

い、実施形態 C 1 ～ C 6 1 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 3 8】

実施形態 C 6 3 . 可溶性組織因子ドメインが、不活性第 X 因子を第 X a 因子に変換しない、実施形態 C 1 ～ C 6 2 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 3 9】

実施形態 C 6 4 . 多鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態 C 1 ～ C 6 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 4 0】

実施形態 C 6 5 . 一对の親和性ドメインが、ヒト I L - 1 5 受容体アルファ鎖 (I L 1 5 R α) 由来の s u s h i ドメインと可溶性 I L - 1 5 である、実施形態 C 1 ～ C 6 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 4 1】

実施形態 C 6 6 . 可溶性 I L - 1 5 が、D 8 N または D 8 A アミノ酸置換を有する、実施形態 C 6 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 4 2】

実施形態 C 6 7 . ヒト I L - 1 5 R α が、成熟全長 I L - 1 5 R α である、実施形態 C 6 5 または C 6 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 4 3】

実施形態 C 6 8 . 一对の親和性ドメインが、バルナーゼとバルンスター、P K A と A K A P、変異 R N a s e I 断片に基づくアダプター／ドッキングタグモジュール、ならびにタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、および S N A P 2 5 の相互作用に基づく S N A R E モジュールからなる群から選択される、実施形態 C 1 ～ C 6 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 4 4】

実施形態 C 6 9 . 第 1 のキメラポリペプチドおよび／または第 2 のキメラポリペプチドが、その N 末端にシグナル配列をさらに含む、実施形態 C 1 ～ C 6 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 4 4 5】

実施形態 C 7 0 . 実施形態 C 1 ～ C 6 9 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかを含む、組成物。

【1 4 4 6】

実施形態 C 7 1 . 組成物が、医薬組成物である、実施形態 C 7 0 に記載の組成物。

【1 4 4 7】

実施形態 C 7 2 . 実施形態 C 7 0 または C 7 1 に記載の組成物の少なくとも 1 つの用量を含む、キット。

【1 4 4 8】

実施形態 C 7 3 . 実施形態 C 1 ～ C 6 9 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかをコードする、核酸。

【1 4 4 9】

実施形態 C 7 4 . 実施形態 C 7 3 に記載の核酸を含む、ベクター。

【1 4 5 0】

実施形態 C 7 5 . ベクターが、発現ベクターである、実施形態 C 7 4 に記載のベクター。

【1 4 5 1】

実施形態 C 7 6 . 実施形態 C 7 3 に記載の核酸または実施形態 C 7 4 または C 7 5 に記載のベクターを含む、細胞。

【1 4 5 2】

実施形態 C 7 7 . 多鎖キメラポリペプチドを産生する方法であって、
多鎖キメラポリペプチドの産生をもたらすのに十分な条件下で、実施形態 C 7 6 に記載の細胞を培養培地中で培養することと、
多鎖キメラポリペプチドを細胞および／または培養培地から回収することと

10

20

30

40

50

を含む、方法。

【1453】

実施形態C78．実施形態C77に記載の方法によって産生された多鎖キメラポリペプチド。

【1454】

実施形態C79．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態A56に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1455】

実施形態C80．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態C79に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1456】

実施形態C81．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態C80に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1457】

実施形態C82．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号97と100%同一の配列を含む、実施形態C81に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1458】

実施形態C83．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態C56に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1459】

実施形態C84．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態C83に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1460】

実施形態C85．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態C84に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1461】

実施形態C86．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号98と100%同一の配列を含む、実施形態C85に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1462】

実施形態D1．

(a) 第1のキメラポリペプチドであって、

(i) 第1の標的結合ドメイン、

(ii) 可溶性組織因子ドメイン、および

(iii) 一对の親和性ドメインの第1のドメイン

を含む、第1のキメラポリペプチドと、

(b) 第2のキメラポリペプチドであって、

(i) 一对の親和性ドメインの第2のドメイン、および

(ii) 第2の標的結合ドメイン

を含む、第2のキメラポリペプチドと

を含み、

第1のキメラポリペプチドと第2のキメラポリペプチドが、一对の親和性ドメインの第1のドメインと第2のドメインとの結合を介して会合しており、

第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立して、IL-18受容体またはIL-12受容体に特異的に結合する、多鎖キメラポリペプチド。

【1463】

実施形態D2．第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態D1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1464】

実施形態D3．第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態

10

20

30

40

50

D 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1465】

実施形態 D 4 . 可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 D 1 ~ D 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1466】

実施形態 D 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 D 1 ~ D 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1467】

実施形態 D 6 . 一对の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインが、第 2 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 D 1 ~ D 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1468】

実施形態 D 7 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 D 1 ~ D 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1469】

実施形態 D 8 . 可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態 D 1 ~ D 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1470】

実施形態 D 9 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 80 % 同一の配列を含む、実施形態 D 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1471】

実施形態 D 10 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、実施形態 D 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1472】

実施形態 D 11 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、実施形態 D 10 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1473】

実施形態 D 12 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 D 8 ~ D 11 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1474】

実施形態 D 13 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

10

20

30

40

50

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 D12 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1475】

実施形態 D14．可溶性組織因子ドメインが、第VIIa 因子に結合することができない、実施形態 D1～D13 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1476】

実施形態 D15．可溶性組織因子ドメインが、不活性第 X 因子を第 Xa 因子に変換しない、実施形態 D1～D14 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1477】

実施形態 D16．多鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態 D1～D15 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1478】

実施形態 D17．第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 D1～D16 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1479】

実施形態 D18．第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 D1～D17 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1480】

実施形態 D19．第 1 のキメラポリペプチドおよび／または第 2 のキメラポリペプチドが、その N 末端にシグナル配列をさらに含む、実施形態 D1～D18 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1481】

実施形態 D20．シグナル配列が、配列番号 117 を含む、実施形態 D19 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1482】

実施形態 D21．シグナル配列が、配列番号 117 である、実施形態 D20 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1483】

実施形態 D22．一対の親和性ドメインが、ヒト IL-15 受容体アルファ鎖 (IL-15R α) 由来の sushid ドメインと可溶性 IL-15 である、実施形態 D1～D21 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1484】

実施形態 D23．可溶性 IL-15 が、D8N または D8A アミノ酸置換を有する、実施形態 D22 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1485】

実施形態 D24．可溶性 IL-15 が、配列番号 82 と 80 % 同一の配列を含む、実施形態 D22 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1486】

実施形態D25．可溶性IL-15が、配列番号82と90%同一の配列を含む、実施形態D24に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1487】

実施形態D26．可溶性IL-15が、配列番号82と95%同一の配列を含む、実施形態D25に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1488】

実施形態D27．可溶性IL-15が、配列番号82を含む、実施形態D26に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1489】

実施形態D28．IL-15R α のsushiドメインが、ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインを含む、実施形態D22～D27のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1490】

実施形態D29．ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、配列番号113と80%同一の配列を含む、実施形態D28に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1491】

実施形態D30．ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、配列番号113と90%同一の配列を含む、実施形態D29に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1492】

実施形態D31．ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、配列番号113と95%同一の配列を含む、実施形態D30に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1493】

実施形態D32．ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、配列番号113を含む、実施形態D31に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1494】

実施形態D33．ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、成熟全長IL-15R α である、実施形態D28に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1495】

実施形態D34．一対の親和性ドメインが、バルナーゼとバルンスター、PKAとAKAP、変異RNase I断片に基づくアダプター／ドッキングタグモジュール、ならびにタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、およびSNAP25の相互作用に基づくSNAREモジュールからなる群から選択される、実施形態D1～D21のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1496】

実施形態D35．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、アゴニスト抗原結合ドメインである、実施形態D1～D34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1497】

実施形態D36．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々、アゴニスト抗原結合ドメインである、実施形態D35に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1498】

実施形態D37．抗原結合ドメインが、scFvまたは単一ドメイン抗体を含む、実施形態D35またはD36に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1499】

実施形態D38．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性IL-15または可溶性IL-18である、実施形態D1～D34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1500】

実施形態D39．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立し

10

20

30

40

50

て、可溶性 I L - 1 5 または可溶性 I L - 1 8 である、実施形態 D 3 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1501】

実施形態 D 4 0 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの両方が、I L - 1 8 受容体または I L - 1 2 受容体に特異的に結合する、実施形態 D 1 ~ D 3 9 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1502】

実施形態 D 4 1 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態 B 4 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1503】

実施形態 D 4 2 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、実施形態 D 4 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1504】

実施形態 D 4 3 . 第 1 の標的結合ドメインが I L - 1 2 受容体に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインが I L - 1 8 受容体に特異的に結合する、実施形態 D 1 ~ D 3 9 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1505】

実施形態 D 4 4 . 第 1 の標的結合ドメインが I L - 1 8 受容体に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインが I L - 1 2 受容体に特異的に結合する、実施形態 D 1 ~ D 3 9 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1506】

実施形態 D 4 5 . 第 1 の標的結合ドメインが、可溶性 I L - 1 8 を含む、実施形態 D 4 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1507】

実施形態 D 4 6 . 可溶性 I L - 1 8 が、可溶性ヒト I L - 1 8 である、実施形態 D 4 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1508】

実施形態 D 4 7 . 可溶性ヒト I L - 1 8 が、配列番号 1 0 9 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 D 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1509】

実施形態 D 4 8 . 可溶性ヒト I L - 1 8 が、配列番号 1 0 9 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 D 4 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1510】

実施形態 D 4 9 . 可溶性ヒト I L - 1 8 が、配列番号 1 0 9 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 D 4 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1511】

実施形態 D 5 0 . 可溶性ヒト I L - 1 8 が、配列番号 1 0 9 の配列を含む、実施形態 D 4 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1512】

実施形態 D 5 1 . 第 2 の標的結合ドメインが、可溶性 I L - 1 2 を含む、実施形態 D 4 4 ~ D 5 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1513】

実施形態 D 5 2 . 可溶性 I L - 1 8 が、可溶性ヒト I L - 1 2 である、実施形態 D 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1514】

実施形態 D 5 3 . 可溶性ヒト I L - 1 5 が、可溶性ヒト I L - 1 2 β (p 4 0) 配列および可溶性ヒト I L - 1 2 α (p 3 5) 配列を含む、実施形態 D 5 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1515】

実施形態 D 5 4 . 可溶性ヒト I L - 1 5 が、可溶性 I L - 1 2 β (p 4 0) 配列と可溶

10

20

30

40

50

性ヒトIL-12 α (p 35) 配列との間にリンカー配列をさらに含む、実施形態D 53に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1516】

実施形態D 55. リンカー配列が、配列番号102を含む、実施形態D 54に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1517】

実施形態D 56. 可溶性ヒトIL-12 β (p 40) 配列が、配列番号81と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態D 53～D 55のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1518】

実施形態D 57. 可溶性ヒトIL-12 β (p 40) 配列が、配列番号81と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態D 56に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1519】

実施形態D 58. 可溶性ヒトIL-12 β (p 40) 配列が、配列番号81と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態D 57に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1520】

実施形態D 59. 可溶性ヒトIL-12 β (p 40) 配列が、配列番号81を含む、実施形態D 58に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1521】

実施形態D 60. 可溶性ヒトIL-12 α (p 35) 配列が、配列番号80と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態D 53～D 59のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1522】

実施形態D 61. 可溶性ヒトIL-12 α (p 35) 配列が、配列番号80と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態D 60に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1523】

実施形態D 62. 可溶性ヒトIL-12 α (p 35) 配列が、配列番号80と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態D 61に記載のミュール鎖キメラポリペプチド。

【1524】

実施形態D 63. 可溶性ヒトIL-12 α (p 35) 配列が、配列番号80を含む、実施形態D 62に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1525】

実施形態D 64. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号174と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態D 1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1526】

実施形態D 65. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号174と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態D 64に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1527】

実施形態D 66. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号174と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態D 65に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1528】

実施形態D 67. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号174を含む、実施形態D 66に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1529】

実施形態D 68. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号176を含む、実施形態D 67に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1530】

実施形態D 69. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号178と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態D 1およびD 64～D 68のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1531】

実施形態D70. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号178と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態D69に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1532】

実施形態D71. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号178と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態D70に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1533】

実施形態D72. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号178を含む、実施形態D71に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1534】

実施形態D73. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号180を含む、実施形態D72に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1535】

実施形態D74. 第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含み、1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態D1～D63のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1536】

実施形態D75. 第1のキメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間にリンカー配列、および／または1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態D74に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1537】

実施形態D76. 第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態D1～D63のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1538】

実施形態D77. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態D76に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1539】

実施形態D78. 第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態D76に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1540】

実施形態D79. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態D76に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1541】

実施形態D80. 第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと第1の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態D76に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1542】

実施形態D81. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に配置されており、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態D76に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1543】

10

20

30

40

50

実施形態 D 8 2 . N 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 D 8 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 4 4 】

実施形態 D 8 3 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 D 8 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 4 5 】

実施形態 D 8 4 . C 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 D 8 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 4 6 】

実施形態 D 8 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 D 8 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 4 7 】

実施形態 D 8 6 . 可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、可溶性組織因子ドメインおよび／または一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 D 8 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 4 8 】

実施形態 D 8 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、(i) 可溶性組織因子ドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間、および／または (i i) 一対の親和性ドメインの第 1 のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 D 8 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 4 9 】

実施形態 D 8 8 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 D 1 ～ D 6 3 および D 7 4 ～ D 8 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 0 】

実施形態 D 8 9 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 2 のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第 2 のドメインに直接隣接している、実施形態 D 8 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 1 】

実施形態 D 9 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと一対の親和性ドメインの第 2 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 D 8 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 2 】

実施形態 D 9 1 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 2 のキメラポリペプチド内の第 2 の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態 D 8 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 3 】

10

20

30

40

50

実施形態 D 9 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 B 8 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 4 】

実施形態 D 9 3 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態 D 7 4 ~ D 9 2 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 5 】

実施形態 D 9 4 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態 B 9 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 6 】

実施形態 D 9 5 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態 B 9 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 7 】

実施形態 D 9 6 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが異なる抗原に特異的に結合する、実施形態 D 7 4 ~ D 9 2 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 8 】

実施形態 D 9 7 . 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインが、CD 1 6 a、CD 2 8、CD 3、CD 3 3、CD 2 0、CD 1 9、CD 2 2、CD 1 2 3、IL-1 R、IL-1、VEGF、IL-6 R、IL-4、IL-1 0、PD L-1、TIGIT、PD-1、TIM 3、CTLA 4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD 2 6、CD 3 6、ULBP 2、CD 3 0、CD 2 0 0、IGF-1 R、MUC 4 AC、MUC 5 AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16 結合タンパク質、HLA-DR、DLL 4、TYRO 3、AXL、MER、CD 1 2 2、CD 1 5 5、PDGF-DD、TGF- β 受容体 II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RII リガンド、DNAM1 リガンド、NKP 4 6 リガンド、NKP 4 4 リガンド、NKG2D リガンド、NKP 3 0 リガンド、scMHC I リガンド、scMHC II リガンド、scTCR リガンド、IL-1 受容体、IL-2 受容体、IL-3 受容体、IL-7 受容体、IL-8 受容体、IL-1 0 受容体、IL-1 2 受容体、IL-1 5 受容体、IL-1 7 受容体、IL-1 8 受容体、IL-2 1 受容体、PDGF-DD 受容体、幹細胞因子 (SCF) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ 3 リガンド (FLT 3 L) 受容体、MICA 受容体、MICB 受容体、ULP 1 6 結合タンパク質受容体、CD 1 5 5 受容体、および CD 2 8 受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態 D 7 4 ~ D 9 6 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 5 9 】

実施形態 D 9 8 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態 D 7 4 ~ D 9 6 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 6 0 】

実施形態 D 9 9 . 可溶性インターロイキン、サイトカイン、またはリガンドタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-1 0、IL-1 2、IL-1 5、IL-1 7、IL-1 8、IL-2 1、PDGF-DD、SCF、FLT 3 L、MICA、MICB、および ULP 1 6 結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態 B 9 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 6 1 】

実施形態 D 1 0 0 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンま

10

20

30

40

50

たはサイトカイン受容体である、実施形態 D 7 4 ~ D 9 6 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1562】

実施形態 D 1 0 1 . 可溶性受容体が、可溶性 TGF- β 受容体 I I (TGF- β R I I)、可溶性 TGF- β R I I I、可溶性 NKG2D、可溶性 NKp30、可溶性 NKp44、可溶性 NKp46、可溶性 DNAM1、scMHC I、scMHC I I、scTCR、可溶性 CD155、可溶性 CD122、または可溶性 CD28 である、実施形態 B 1 0 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1563】

実施形態 D 1 0 2 . 実施形態 D 1 ~ D 1 0 1 に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかを含む、組成物。

【1564】

実施形態 D 1 0 3 . 組成物が、医薬組成物である、実施形態 D 1 0 2 に記載の組成物。

【1565】

実施形態 D 1 0 4 . 実施形態 D 1 0 2 または D 1 0 3 に記載の組成物の少なくとも 1 つの用量を含む、キット。

【1566】

実施形態 D 1 0 5 . 実施形態 D 1 ~ D 1 0 1 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかをコードする、核酸。

【1567】

実施形態 D 1 0 6 . 実施形態 D 1 0 5 に記載の核酸を含む、ベクター。

【1568】

実施形態 D 1 0 7 . ベクターが、発現ベクターである、実施形態 D 1 0 6 に記載のベクター。

【1569】

実施形態 D 1 0 8 . 実施形態 D 1 0 5 に記載の核酸または実施形態 D 1 0 6 または D 1 0 7 に記載のベクターを含む、細胞。

【1570】

実施形態 D 1 0 9 . 多鎖キメラポリペプチドを産生する方法であって、
多鎖キメラポリペプチドの産生をもたらすのに十分な条件下で、実施形態 D 1 0 8 に記載の細胞を培養培地中で培養することと、
多鎖キメラポリペプチドを細胞および／または培養培地から回収することとを含む、方法。

【1571】

実施形態 D 1 1 0 . 実施形態 D 1 0 9 に記載の方法によって産生された多鎖キメラポリペプチド。

【1572】

実施形態 D 1 1 1 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 と少なくとも 80 % 同一の配列を含む、実施形態 D 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1573】

実施形態 D 1 1 2 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、実施形態 D 1 1 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1574】

実施形態 D 1 1 3 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、実施形態 D 1 1 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1575】

実施形態 D 1 1 4 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 と 100 % 同一の配列を含む、実施形態 D 1 1 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1576】

実施形態 D 1 1 5 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 と少なくとも 80 %

10

20

30

40

50

同一の配列を含む、実施形態 D 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1577】

実施形態 D 116 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、実施形態 D 115 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1578】

実施形態 D 117 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、実施形態 D 116 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1579】

実施形態 D 118 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 と 100 % 同一の配列を含む、実施形態 D 117 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1580】

実施形態 E 1 .

(a) 第 1 のキメラポリペプチドであって、

(i) 第 1 の標的結合ドメイン、

(ii) 可溶性組織因子ドメイン、および

(iii) 一对の親和性ドメインの第 1 のドメイン

を含む、第 1 のキメラポリペプチドと、

(b) 第 2 のキメラポリペプチドであって、

(i) 一对の親和性ドメインの第 2 のドメイン、および

(ii) 第 2 の標的結合ドメインを含む、第 2 のキメラポリペプチドと

を含み、

第 1 のキメラポリペプチドと第 2 のキメラポリペプチドが、一对の親和性ドメインの第 1 のドメインと第 2 のドメインとの結合を介して会合しており、

第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、IL-2 受容体または腫瘍増殖因子受容体 β II (TGF β RII) リガンドに特異的に結合する、多鎖キメラポリペプチド。

【1581】

実施形態 E 2 . 第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 E 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1582】

実施形態 E 3 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 E 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1583】

実施形態 E 4 . 可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 E 1 ~ E 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1584】

実施形態 E 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 E 1 ~ E 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1585】

実施形態 E 6 . 一对の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインが、第 2 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 E 1 ~ E 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1586】

実施形態 E 7 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 E 1 ~ E 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1587】

10

20

30

40

50

実施形態 E 8 . 可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態 E 1 ~ E 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 8 8 】

実施形態 E 9 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 8 9 】

実施形態 E 1 0 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 9 0 】

実施形態 E 1 1 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【 1 5 9 1 】

実施形態 E 1 2 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

20

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 4 0 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上を含まない、実施形態 E 8 ~ E 1 1 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 9 2 】

実施形態 E 1 3 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

30

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

40

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 4 0 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 E 1 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 9 3 】

実施形態 E 1 4 . 可溶性組織因子ドメインが、第 V I I a 因子に結合することができない、実施形態 E 1 ~ E 1 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 5 9 4 】

実施形態 E 1 5 . 可溶性組織因子ドメインが、不活性第 X 因子を第 X a 因子に変換しな

50

い、実施形態 E 1 ～ E 1 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1595】

実施形態 E 1 6 . 多鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態 E 1 ～ E 1 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1596】

実施形態 E 1 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 E 1 ～ E 1 6 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1597】

実施形態 E 1 8 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 E 1 ～ E 1 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1598】

実施形態 E 1 9 . 第 1 のキメラポリペプチドおよび／または第 2 のキメラポリペプチドが、その N 末端にシグナル配列をさらに含む、実施形態 E 1 ～ E 1 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1599】

実施形態 E 2 0 . シグナル配列が、配列番号 1 1 7 を含む、実施形態 E 1 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1600】

実施形態 E 2 1 . シグナル配列が、配列番号 1 1 7 である、実施形態 E 2 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1601】

実施形態 E 2 2 . 一对の親和性ドメインが、ヒト IL-15 受容体アルファ鎖 (IL-15 R α 由来の sushidメインと可溶性 IL-15 である、実施形態 E 1 ～ E 2 1 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1602】

実施形態 E 2 3 . 可溶性 IL-15 が、D 8 N または D 8 A アミノ酸置換を有する、実施形態 E 2 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1603】

実施形態 E 2 4 . 可溶性 IL-15 が、配列番号 8 2 と 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 2 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1604】

実施形態 E 2 5 . 可溶性 IL-15 が、配列番号 8 2 と 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 2 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1605】

実施形態 E 2 6 . 可溶性 IL-15 が、配列番号 8 2 と 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 E 2 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1606】

実施形態 E 2 7 . 可溶性 IL-15 が、配列番号 8 2 を含む、実施形態 E 2 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1607】

実施形態 E 2 8 . IL-15 R α の sushidメインが、ヒト IL-15 R α 由来の sushidメインを含む、実施形態 E 2 2 ～ E 2 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1608】

実施形態 E 2 9 . ヒト IL-15 R α 由来の sushidメインが、配列番号 1 1 3 と 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 2 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1609】

実施形態 E 3 0 . ヒト IL-15 R α 由来の sushidメインが、配列番号 1 1 3 と

50

90%同一の配列を含む、実施形態E29に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1610】

実施形態E31. ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、配列番号113と95%同一の配列を含む、実施形態E30に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1611】

実施形態E32. ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、配列番号113を含む、実施形態E31に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1612】

実施形態E33. ヒトIL-15R α 由来のsushiドメインが、成熟全長IL-15R α である、実施形態E28に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1613】

実施形態E34. 一対の親和性ドメインが、バルナーゼとバルンスター、PKAとAKAP、変異RNase I断片に基づくアダプター／ドッキングタグモジュール、ならびにタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、およびSNAP25の相互作用に基づくSNAREモジュールからなる群から選択される、実施形態E1～E21のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1614】

実施形態E35. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、抗原結合ドメインである、実施形態E1～E34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1615】

実施形態E36. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、抗原結合ドメインである、実施形態E35に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1616】

実施形態E37. 抗原結合ドメインが、scFvまたは単一ドメイン抗体を含む、実施形態E35またはE36に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1617】

実施形態E38. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性IL-21または可溶性TGF β RIIである、実施形態E1～E34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1618】

実施形態E39. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの両方が、IL-21受容体またはTGF β RIIリガンドに特異的に結合する、実施形態E1～E38のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1619】

実施形態E40. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態E39に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1620】

実施形態E41. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、実施形態E40に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1621】

実施形態E42. 第1の標的結合ドメインがTGF β RIIリガンドに特異的に結合し、第2の標的結合ドメインがIL-21受容体に特異的に結合する、実施形態E1～E38のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1622】

実施形態E43. 第1の標的結合ドメインがIL-21受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインがTGF β RIIリガンドに特異的に結合する、実施形態E1～E38のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1623】

実施形態E44. 第1の標的結合ドメインが、可溶性IL-21を含む、実施形態E4

10

20

30

40

50

3に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1624】

実施形態E45．可溶性IL-21が、可溶性ヒトIL-21である、実施形態E44に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1625】

実施形態E46．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態E45に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1626】

実施形態E47．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態E46に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1627】

実施形態E48．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態E47に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1628】

実施形態E49．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83の配列を含む、実施形態E48に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1629】

実施形態E50．第2の標的結合ドメインが、可溶性TGFβRIIを含む、実施形態E43～E49のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1630】

実施形態E51．可溶性TGFβRIIが、可溶性ヒトTGFβRIIである、実施形態E50に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1631】

実施形態E52．可溶性ヒトTGFβRIIが、第1の可溶性ヒトTGFβRII配列および第2の可溶性ヒトTGFβRII配列を含む、実施形態E51に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1632】

実施形態E53．可溶性ヒトTGFβRIIが、第1の可溶性ヒトTGFβRII配列と第2の可溶性ヒトTGFβRII配列との間にリンカー配列をさらに含む、実施形態E52に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1633】

実施形態E54．リンカー配列が、配列番号102を含む、実施形態E53に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1634】

実施形態E55．第1の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号183と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態E52～E54のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1635】

実施形態E56．第1の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号183と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態E55に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1636】

実施形態E57．第1の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号183と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態E56に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1637】

実施形態E58．第1の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号183を含む、実施形態E57に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1638】

実施形態E59．第2の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号184と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態E52～E58のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1639】

実施形態E60．第2の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号184と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態E59に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1640】

実施形態E61．第2の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号184と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態E60に記載のミューラ鎖キメラポリペプチド。

【1641】

実施形態E62．第2の可溶性ヒトTGFβRII配列が、配列番号184を含む、実施形態E61に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1642】

実施形態E63．第1のキメラポリペプチドが、配列番号189と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態E1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1643】

実施形態E64．第1のキメラポリペプチドが、配列番号189と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態E63に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1644】

実施形態E65．第1のキメラポリペプチドが、配列番号189と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態E64に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1645】

実施形態E66．第1のキメラポリペプチドが、配列番号189を含む、実施形態E65に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1646】

実施形態E67．第1のキメラポリペプチドが、配列番号191を含む、実施形態E66に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1647】

実施形態E68．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態E1およびE63～E67のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1648】

実施形態E69．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態E68に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1649】

実施形態E70．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態E69に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1650】

実施形態E71．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193を含む、実施形態E70に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1651】

実施形態E72．第2のキメラポリペプチドが、配列番号195を含む、実施形態E71に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1652】

実施形態E73．第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含み、1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態E1～E62のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1653】

実施形態E74．第1のキメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間にリンカー配列、および／または1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態E73に記載の多鎖キメラポ

10

20

30

40

50

リペプチド。

【1654】

実施形態 E 7 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端および／または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 E 1 ～ E 6 2 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1655】

実施形態 E 7 6 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 E 7 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1656】

実施形態 E 7 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 E 7 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1657】

実施形態 E 7 8 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態 E 7 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1658】

実施形態 E 7 9 . 第 1 のキメラポリペプチドが、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと第 1 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 E 7 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1659】

実施形態 E 8 0 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端および／または C 末端に配置されており、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられている、実施形態 E 7 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1660】

実施形態 E 8 1 . N 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 E 8 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1661】

実施形態 E 8 2 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 E 8 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1662】

実施形態 E 8 3 . C 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 E 8 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1663】

実施形態 E 8 4 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 E 8 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1664】

実施形態 E 8 5 . 可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、可

10

20

30

40

50

溶性組織因子ドメインおよび／または一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態E80に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1665】

実施形態E86．第1のキメラポリペプチドが、(i)可溶性組織因子ドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間、および／または(ii)一対の親和性ドメインの第1のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられた1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態E80に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1666】

実施形態E87．第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチドのN末端またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態E1～E62およびE73～E86のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1667】

実施形態E88．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインに直接隣接している、実施形態E87に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1668】

実施形態E89．第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチド内の1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第2のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態E87に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1669】

実施形態E90．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態E87に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1670】

実施形態E91．第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチド内の1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態E87に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1671】

実施形態E92．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態E73～E91のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1672】

実施形態E93．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態E92に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1673】

実施形態E94．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態E93に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1674】

実施形態E95．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態E73～E91のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1675】

実施形態E96．1つ以上の追加の抗原結合ドメインが、CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、V

50

EGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR-D、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIRIリガンド、DNAM1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHCIRIリガンド、scMHCIRIRIリガンド、scTCRIRIリガンド、IL-1受容体、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-7受容体、IL-8受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-18受容体、IL-21受容体、PDGFR-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD28受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態E73～E95のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1676】

実施形態E97. 1つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態E73～E95のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1677】

実施形態E98. 可溶性インターロイキン、サイトカイン、またはリガンドタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR-DD、SCF、FLT3L、MICA、MICB、およびULP16結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態E97に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1678】

実施形態E99. 1つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態E73～E95のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1679】

実施形態E100. 可溶性受容体が、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RIIRI、可溶性NKG2D、可溶性NKP30、可溶性NKP44、可溶性NKP46、可溶性DNAM1、scMHCIRI、scMHCIRIRI、scTCRIRI、可溶性CD155、または可溶性CD28である、実施形態E99に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1680】

実施形態E101. 実施形態E1～E100に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかを含む、組成物。

【1681】

実施形態E102. 組成物が、医薬組成物である、実施形態E101に記載の組成物。

【1682】

実施形態E103. 実施形態E101またはE102に記載の組成物の少なくとも1つの用量を含む、キット。

【1683】

実施形態E104. 実施形態E1～E100のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかをコードする、核酸。

【1684】

実施形態E105. 実施形態E104に記載の核酸を含む、ベクター。

【1685】

10

20

30

40

50

実施形態 E 1 0 6 . ベクターが、発現ベクターである、実施形態 E 1 0 5 に記載のベクター。

【1 6 8 6】

実施形態 E 1 0 7 . 実施形態 C 1 0 4 に記載の核酸または実施形態 E 1 0 5 または E 1 0 6 に記載のベクターを含む、細胞。

【1 6 8 7】

実施形態 E 1 0 8 . 多鎖キメラポリペプチドを産生する方法であって、
多鎖キメラポリペプチドの産生をもたらすのに十分な条件下で、実施形態 E 1 0 7 に記載の細胞を培養培地中で培養することと、
多鎖キメラポリペプチドを細胞および／または培養培地から回収することとを含む、方法。

【1 6 8 8】

実施形態 E 1 0 9 . 実施形態 E 1 0 8 に記載の方法によって産生された多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 8 9】

実施形態 E 1 1 0 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 0】

実施形態 E 1 1 1 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 1 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 1】

実施形態 E 1 1 2 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 1 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 2】

実施形態 E 1 1 3 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と 1 0 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 1 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 3】

実施形態 E 1 1 4 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 4】

実施形態 E 1 1 5 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 1 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 5】

実施形態 E 1 1 6 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 1 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 6】

実施形態 E 1 1 7 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と 1 0 0 % 同一の配列を含む、実施形態 E 1 1 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 6 9 7】

実施形態 F 1 .

(c) 第 1 のキメラポリペプチドであって、

(i) 第 1 の標的結合ドメイン、

(i i) 可溶性組織因子ドメイン、および

(i i i) 一対の親和性ドメインの第 1 のドメイン

を含む、第 1 のキメラポリペプチドと、

(d) 第 2 のキメラポリペプチドであって、

(i) 一対の親和性ドメインの第 2 のドメイン、および

(i i) 第 2 の標的結合ドメインを含む、第 2 のキメラポリペプチドと

を含み、

第 1 のキメラポリペプチドと第 2 のキメラポリペプチドが、一対の親和性ドメインの第

10

20

30

40

50

1 のドメインと第 2 のドメインとの結合を介して会合しており、

第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、IL-2 受容体または IL-7 受容体に特異的に結合する、多鎖キメラポリペプチド。

【1698】

実施形態 F 2 . 第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 F 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1699】

実施形態 F 3 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 F 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1700】

実施形態 F 4 . 可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 F 1 ~ F 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1701】

実施形態 F 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 F 1 ~ F 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1702】

実施形態 F 6 . 一対の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインが、第 2 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 F 1 ~ F 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1703】

実施形態 F 7 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 F 1 ~ F 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1704】

実施形態 F 8 . 可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態 F 1 ~ F 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1705】

実施形態 F 9 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 80 % 同一の配列を含む、実施形態 F 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1706】

実施形態 F 10 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、実施形態 F 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1707】

実施形態 F 11 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、実施形態 F 10 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1708】

実施形態 F 12 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 を含む、実施形態 F 11 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1709】

実施形態 F 13 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 と少なくとも 80 % 同一の配列を含む、実施形態 F 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1710】

実施形態 F 14 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、実施形態 F 13 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1711】

実施形態 F 15 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、実施形態 F 14 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1712】

実施形態 F 16 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 97 を含む、実施形態 F 15 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1713】

実施形態 F 17 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 と少なくとも 80 % 同一の配列を含む、実施形態 F 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1714】

実施形態 F 18 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、実施形態 F 17 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1715】

実施形態 F 19 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、実施形態 F 18 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1716】

実施形態 F 20 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 98 を含む、実施形態 F 19 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1717】

実施形態 F 21 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上を含まない、実施形態 F 8 ~ F 11、F 13 ~ F 15、および F 17 ~ F 19 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1718】

実施形態 F 22 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 F 21 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1719】

実施形態 F 2 3 . 可溶性組織因子ドメインが、第 V I I a 因子に結合することができない、実施形態 F 1 ~ F 2 2 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 0 】

実施形態 F 2 4 . 可溶性組織因子ドメインが、不活性第 X 因子を第 X a 因子に変換しない、実施形態 F 1 ~ F 2 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 1 】

実施形態 F 2 5 . 多鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態 F 1 ~ F 2 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 2 】

実施形態 F 2 6 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 F 1 ~ F 2 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 3 】

実施形態 F 2 7 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 F 1 ~ F 2 6 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 4 】

実施形態 F 2 8 . 第 1 のキメラポリペプチドおよび／または第 2 のキメラポリペプチドが、その N 末端にシグナル配列をさらに含む、実施形態 F 1 ~ F 2 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 5 】

実施形態 F 2 9 . シグナル配列が、配列番号 1 1 7 を含む、実施形態 F 2 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 6 】

実施形態 F 3 0 . シグナル配列が、配列番号 3 2 8 である、実施形態 F 2 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 7 】

実施形態 F 3 1 . 一对の親和性ドメインが、ヒト I L - 1 5 受容体アルファ鎖 (I L - 1 5 R α) 由来の s u s h i ドメインと可溶性 I L - 1 5 である、実施形態 F 1 ~ F 3 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 8 】

実施形態 F 3 2 . 可溶性 I L - 1 5 が、D 8 N または D 8 A アミノ酸置換を有する、実施形態 F 3 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 2 9 】

実施形態 F 3 3 . 可溶性 I L - 1 5 が、配列番号 8 2 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 3 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 0 】

実施形態 F 3 4 . 可溶性 I L - 1 5 が、配列番号 8 2 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 3 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 1 】

実施形態 F 3 5 . 可溶性 I L - 1 5 が、配列番号 8 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 F 3 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 2 】

実施形態 F 3 6 . 可溶性 I L - 1 5 が、配列番号 8 2 を含む、実施形態 F 3 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 3 】

実施形態 F 3 7 . I L - 1 5 R α の s u s h i ドメインが、ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインを含む、実施形態 F 3 1 ~ F 3 6 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 4 】

10

20

30

40

50

実施形態 F 3 8 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 と 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 3 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 5 】

実施形態 F 3 9 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 と 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 3 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 6 】

実施形態 F 4 0 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 と 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 F 3 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 7 】

実施形態 F 4 1 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 を含む、実施形態 F 4 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【 1 7 3 8 】

実施形態 F 4 2 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、成熟全長 I L - 1 5 R α である、実施形態 F 3 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 3 9 】

実施形態 F 4 3 . 一対の親和性ドメインが、バルナーゼとバルンスター、P K A と A K A P、変異 R N a s e I 断片に基づくアダプター／ドッキングタグモジュール、ならびにタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、および S N A P 2 5 の相互作用に基づく S N A R E モジュールからなる群から選択される、実施形態 F 1 ~ F 3 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【 1 7 4 0 】

実施形態 F 4 4 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、アゴニスト抗原結合ドメインである、実施形態 F 1 ~ F 4 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 4 1 】

実施形態 F 4 5 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々、アゴニスト抗原結合ドメインである、実施形態 F 4 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 4 2 】

実施形態 F 4 6 . 抗原結合ドメインが、s c F v または単一ドメイン抗体を含む、実施形態 F 4 4 または F 4 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【 1 7 4 3 】

実施形態 F 4 7 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性 I L - 2 1 または可溶性 I L - 7 である、実施形態 F 1 ~ F 4 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 4 4 】

実施形態 F 4 8 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、可溶性 I L - 2 1 または可溶性 I L - 7 である、実施形態 F 4 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 4 5 】

実施形態 F 4 9 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの両方が、I L - 2 1 受容体または I L - 7 受容体に特異的に結合する、実施形態 F 1 ~ F 4 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【 1 7 4 6 】

実施形態 F 5 0 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態 F 4 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 4 7 】

実施形態 F 5 1 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、実施形態 F 5 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 7 4 8 】

実施形態 F 5 2 . 第 1 の標的結合ドメインが I L - 2 1 受容体に特異的に結合し、第 2

50

の標的結合ドメインがIL-7受容体に特異的に結合する、実施形態F1～F48のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1749】

実施形態F53．第1の標的結合ドメインがIL-7受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインがIL-21受容体に特異的に結合する、実施形態F1～F48のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1750】

実施形態F54．第1の標的結合ドメインが、可溶性IL-21を含む、実施形態F53に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1751】

実施形態F55．可溶性IL-21が、可溶性ヒトIL-21である、実施形態F54に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1752】

実施形態F56．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態F55に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1753】

実施形態F57．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態F56に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1754】

実施形態F58．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態F57に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1755】

実施形態F59．可溶性ヒトIL-21が、配列番号83の配列を含む、実施形態F58に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1756】

実施形態F60．第2の標的結合ドメインが、可溶性IL-7を含む、実施形態F53～F59のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1757】

実施形態F61．可溶性IL-7が、可溶性ヒトIL-7である、実施形態D60に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1758】

実施形態F62．可溶性ヒトIL-7が、配列番号79と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態F61に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1759】

実施形態F63．可溶性ヒトIL-7が、配列番号79と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態F62に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1760】

実施形態F64．可溶性ヒトIL-7が、配列番号79と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態F63に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1761】

実施形態F65．可溶性ヒトIL-7が、配列番号79の配列を含む、実施形態F64に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1762】

実施形態F66．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態F1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1763】

実施形態F67．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態F66に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1764】

実施形態F68．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも95%同

10

20

30

40

50

一の配列を含む、実施形態 F 6 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 6 5】

実施形態 F 6 9 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 を含む、実施形態 F 6 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 6 6】

実施形態 F 7 0 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 9 を含む、実施形態 F 6 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 6 7】

実施形態 F 7 1 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 1 1 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 1 および F 6 6 ~ E 7 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1 7 6 8】

実施形態 F 7 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 1 1 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 7 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 6 9】

実施形態 F 7 3 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 1 1 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 F 7 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 7 0】

実施形態 F 7 4 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 1 1 を含む、実施形態 F 7 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1 7 7 1】

実施形態 F 7 5 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 1 3 を含む、実施形態 F 7 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 7 2】

実施形態 F 7 6 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 1 9 9 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 7 3】

実施形態 F 7 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 1 9 9 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 7 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 7 4】

実施形態 F 7 8 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 1 9 9 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 F 7 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1 7 7 5】

実施形態 F 7 9 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 1 9 9 を含む、実施形態 F 6 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 7 6】

実施形態 F 8 0 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 1 を含む、実施形態 F 6 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 7 7】

実施形態 F 8 1 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 1 および F 7 6 ~ E 8 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1 7 7 8】

実施形態 F 8 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 F 8 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 7 9】

実施形態 F 8 3 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 F 8 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 7 8 0】

実施形態 F 8 4 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 を含む、実施形態 F 8

50

3に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1781】

実施形態F85．第2のキメラポリペプチドが、配列番号209を含む、実施形態F84に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1782】

実施形態F86．第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含み、1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態F1～F65のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1783】

実施形態F87．第1のキメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間にリンカー配列、および／または1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態F86に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1784】

実施形態F88．第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態F1～F65のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1785】

実施形態F89．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態F88に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1786】

実施形態F90．第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態F88に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1787】

実施形態F91．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態F88に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1788】

実施形態F92．第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと第1の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態F88に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1789】

実施形態F93．1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に配置されており、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態F88に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1790】

実施形態F94．N末端に配置された1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つの追加の標的結合ドメインが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態F93に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1791】

実施形態F95．第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチド内の少なくとも1つの追加の標的結合ドメインと第1の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態F93に記

10

20

30

40

50

載の多鎖キメラポリペプチド。

【1792】

実施形態 F 9 6 . C 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 F 9 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1793】

実施形態 F 9 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 F 9 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1794】

実施形態 F 9 8 . 可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、可溶性組織因子ドメインおよび／または一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 F 9 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1795】

実施形態 F 9 9 . 第 1 のキメラポリペプチドが、(i) 可溶性組織因子ドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間、および／または (i i) 一対の親和性ドメインの第 1 のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 F 9 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1796】

実施形態 F 1 0 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 F 1 ~ F 6 5 および F 8 6 ~ F 9 9 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1797】

実施形態 F 1 0 1 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 2 のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第 2 のドメインに直接隣接している、実施形態 F 1 0 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1798】

実施形態 F 1 0 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと一対の親和性ドメインの第 2 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 F 1 0 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1799】

実施形態 F 1 0 3 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 2 のキメラポリペプチド内の第 2 の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態 F 1 0 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1800】

実施形態 F 1 0 4 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 F 1 0 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1801】

実施形態 F 1 0 5 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態 F 8 6 ~ F 1 0 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1802】

50

実施形態 F 1 0 6 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態 F 1 0 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 0 3 】

実施形態 F 1 0 7 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 2 つ以上が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態 F 1 0 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 0 4 】

実施形態 F 1 0 8 . 第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、および 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態 F 8 6 ~ F 1 0 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 0 5 】

実施形態 F 1 0 9 . 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインが、CD 1 6 a、CD 2 8、CD 3、CD 3 3、CD 2 0、CD 1 9、CD 2 2、CD 1 2 3、IL-1 R、IL-1、VEGF、IL-6 R、IL-4、IL-1 0、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM 3、CTLA 4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD 2 6、CD 3 6、ULBP 2、CD 3 0、CD 2 0 0、IGF-1 R、MUC 4 AC、MUC 5 AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER 1、HER 2、HER 3、PSMA、CEA、B 7 H 3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM 5、UL 1 6 結合タンパク質、HLA-DR、DLL 4、TYRO 3、AXL、MER、CD 1 2 2、CD 1 5 5、PDGFR- α 、TGF- β 受容体 II (TGF- β R II) リガンド、TGF- β R II リガンド、DNAM 1 リガンド、NKG 2 D リガンド、NKG 2 C リガンド、NKG 2 B リガンド、NKG 2 A リガンド、s c MHC I リガンド、s c MHC I I リガンド、s c TCR リガンド、IL-1 受容体、IL-2 受容体、IL-3 受容体、IL-7 受容体、IL-8 受容体、IL-1 0 受容体、IL-1 2 受容体、IL-1 5 受容体、IL-1 7 受容体、IL-1 8 受容体、IL-2 1 受容体、PDGFR- α 受容体、幹細胞因子 (SCF) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ 3 リガンド (FLT 3 L) 受容体、MICA 受容体、MICB 受容体、ULP 1 6 結合タンパク質受容体、CD 1 5 5 受容体、および CD 2 8 受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態 F 8 6 ~ F 1 0 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 0 6 】

実施形態 F 1 1 0 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態 F 8 6 ~ F 1 0 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 0 7 】

実施形態 F 1 1 1 . 可溶性インターロイキン、サイトカイン、またはリガンドタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-1 0、IL-1 2、IL-1 5、IL-1 7、IL-1 8、IL-2 1、PDGFR- α 、SCF、FLT 3 L、MICA、MICB、および ULP 1 6 結合タンパク質からなる群から選択される、実施形態 F 1 1 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 0 8 】

実施形態 F 1 1 2 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態 F 8 6 ~ F 1 0 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 0 9 】

実施形態 F 1 1 3 . 可溶性受容体が、可溶性 TGF- β 受容体 II (TGF- β R II)、可溶性 TGF- β R II I、可溶性 NKG 2 D、可溶性 NKG 2 C、可溶性 NKG 2 B、可溶性 NKG 2 A、可溶性 DNAM 1、s c MHC I、s c MHC I I、s c TCR、可溶性 CD 1 5 5、可溶性 CD 1 2 2、または可溶性 CD 2 8 である、実施形態 F 1 1 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1810】

実施形態 F 1 1 4 . 実施形態 F 1 ~ F 1 1 3 に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかを含む、組成物。

【1811】

実施形態 F 1 1 5 . 組成物が、医薬組成物である、実施形態 F 1 1 4 に記載の組成物。

【1812】

実施形態 F 1 1 6 . 実施形態 F 1 1 3 または F 1 1 5 に記載の組成物の少なくとも 1 つの用量を含む、キット。

【1813】

実施形態 F 1 1 7 . 実施形態 F 1 ~ F 1 1 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかをコードする、核酸。

10

【1814】

実施形態 F 1 1 8 . 実施形態 F 1 1 7 に記載の核酸を含む、ベクター。

【1815】

実施形態 F 1 1 9 . ベクターが、発現ベクターである、実施形態 F 1 1 8 に記載のベクター。

【1816】

実施形態 F 1 2 0 . 実施形態 F 1 1 7 に記載の核酸または実施形態 F 1 1 8 または F 1 1 9 に記載のベクターを含む、細胞。

【1817】

20

実施形態 F 1 2 1 . 多鎖キメラポリペプチドを産生する方法であって、多鎖キメラポリペプチドの産生をもたらすのに十分な条件下で、実施形態 F 1 2 0 に記載の細胞を培養培地中で培養することと、多鎖キメラポリペプチドを細胞および／または培養培地から回収することとを含む、方法。

【1818】

実施形態 F 1 2 2 . 実施形態 F 1 2 1 に記載の方法によって産生された多鎖キメラポリペプチド。

【1819】

実施形態 G 1 .

30

(e) 第 1 のキメラポリペプチドであって、

(i) 第 1 の標的結合ドメイン、

(ii) 可溶性組織因子ドメイン、および

(iii) 一対の親和性ドメインの第 1 のドメイン

を含む、第 1 のキメラポリペプチドと、

(f) 第 2 のキメラポリペプチドであって、

(i) 一対の親和性ドメインの第 2 のドメイン、および

(ii) 第 2 の標的結合ドメイン

を含む、第 2 のキメラポリペプチドと

を含み、

40

第 1 のキメラポリペプチドと第 2 のキメラポリペプチドが、一対の親和性ドメインの第 1 のドメインと第 2 のドメインとの結合を介して会合しており、

第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、IL-7 受容体、CD16、IL-21 受容体、TGF- β 、または CD137L 受容体に特異的に結合する、多鎖キメラポリペプチド。

【1820】

実施形態 G 2 . 第 1 の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 G 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1821】

実施形態 G 3 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標

50

的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1822】

実施形態 G 4 . 可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 G 1 ~ G 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1823】

実施形態 G 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 1 ~ G 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1824】

実施形態 G 6 . 一对の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインが、第 2 のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態 G 1 ~ G 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1825】

実施形態 G 7 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第 2 のドメインと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 1 ~ G 5 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1826】

実施形態 G 8 . 可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態 G 1 ~ G 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1827】

実施形態 G 9 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 80 % 同一の配列を含む、実施形態 G 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1828】

実施形態 G 10 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 90 % 同一の配列を含む、実施形態 G 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1829】

実施形態 G 11 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 93 と少なくとも 95 % 同一の配列を含む、実施形態 G 10 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1830】

実施形態 G 12 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

40

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上を含まない、実施形態 G 8 ~ G 11 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1831】

実施形態 G 13 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジ

50

ン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 G12 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1832】

実施形態 G14．可溶性組織因子ドメインが、第VIIa 因子に結合することができない、実施形態 G1～G13 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1833】

実施形態 G15．可溶性組織因子ドメインが、不活性第 X 因子を第 Xa 因子に変換しない、実施形態 G1～G14 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1834】

実施形態 G16．多鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態 G1～G15 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1835】

実施形態 G17．第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 G1～G16 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1836】

実施形態 G18．第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド N 末端または C 末端にペプチドタグをさらに含む、実施形態 G1～G17 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1837】

実施形態 G19．第 1 のキメラポリペプチドおよび／または第 2 のキメラポリペプチドが、その N 末端にシグナル配列をさらに含む、実施形態 G1～G18 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1838】

実施形態 G20．シグナル配列が、配列番号 117 を含む、実施形態 G19 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1839】

実施形態 G21．シグナル配列が、配列番号 117 である、実施形態 G20 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1840】

実施形態 G22．一对の親和性ドメインが、ヒト IL-15 受容体アルファ鎖 (IL-15R α) 由来の sushidメインと可溶性 IL-15 である、実施形態 G1～G21 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1841】

実施形態 G23．可溶性 IL-15 が、D8N または D8A アミノ酸置換を有する、実施形態 G22 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1842】

実施形態 G24．可溶性 IL-15 が、配列番号 82 と 80% 同一の配列を含む、実施

10

20

30

40

50

形態 G 2 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 4 3 】

実施形態 G 2 5 . 可溶性 I L - 1 5 が、配列番号 8 2 と 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 4 4 】

実施形態 G 2 6 . 可溶性 I L - 1 5 が、配列番号 8 2 と 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 4 5 】

実施形態 G 2 7 . 可溶性 I L - 1 5 が、配列番号 8 2 を含む、実施形態 G 2 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 4 6 】

実施形態 G 2 8 . I L - 1 5 R α の s u s h i ドメインが、ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインを含む、実施形態 G 2 2 ~ G 2 7 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 4 7 】

実施形態 G 2 9 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 と 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 4 8 】

実施形態 G 3 0 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 と 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 4 9 】

実施形態 G 3 1 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 と 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 3 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 0 】

実施形態 G 3 2 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、配列番号 1 1 3 を含む、実施形態 G 3 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 1 】

実施形態 G 3 3 . ヒト I L - 1 5 R α 由来の s u s h i ドメインが、成熟全長 I L - 1 5 R α である、実施形態 G 2 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 2 】

実施形態 G 3 4 . 一対の親和性ドメインが、バルナーゼとバルンスター、P K A と A K A P、変異 R N a s e I 断片に基づくアダプター／ドッキングタグモジュール、ならびにタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、および S N A P 2 5 の相互作用に基づく S N A R E モジュールからなる群から選択される、実施形態 G 1 ~ G 2 1 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 3 】

実施形態 G 3 5 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、I L - 7 受容体、C D 1 6、または I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 1 ~ G 3 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 4 】

実施形態 G 3 6 . 第 1 の標的結合ドメインが I L - 7 受容体に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインが、C D 1 6 または I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 3 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 5 】

実施形態 G 3 7 . 第 1 の標的結合ドメインが、可溶性 I L - 7 タンパク質を含む、実施形態 G 3 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 6 】

実施形態 G 3 8 . 可溶性 I L - 7 タンパク質が、可溶性ヒト I L - 7 である、実施形態 G 3 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 7 】

10

20

30

40

50

実施形態 G 3 9 . 第 2 の抗原結合ドメインが、C D 1 6 に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、実施形態 G 3 6 ~ G 3 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 8 】

実施形態 G 4 0 . 第 2 の抗原結合ドメインが、C D 1 6 に特異的に結合する s c F v を含む、実施形態 G 3 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 5 9 】

実施形態 G 4 1 . 第 2 の抗原結合ドメインが、I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 3 6 ~ G 3 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 0 】

実施形態 G 4 2 . 第 2 の抗原結合ドメインが、可溶性 I L - 2 1 を含む、実施形態 G 4 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 1 】

実施形態 G 4 3 . 可溶性 I L - 2 1 が、可溶性ヒト I L - 2 1 である、実施形態 G 4 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 2 】

実施形態 G 4 4 . 第 2 のキメラポリペプチドが、I L - 2 1 受容体に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 G 3 6 ~ G 4 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 3 】

実施形態 G 4 5 . 追加の標的結合ドメインが、可溶性 I L - 2 1 を含む、実施形態 G 4 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 4 】

実施形態 G 4 6 . 可溶性 I L - 2 1 が、可溶性ヒト I L - 1 2 である、実施形態 G 4 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 5 】

実施形態 G 4 7 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、T G F - β 、C D 1 6、または I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 1 ~ G 3 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 6 】

実施形態 G 4 8 . 第 1 の標的結合ドメインが T G F - β に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインが、C D 1 6 または I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 4 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 6 7 】

実施形態 G 4 9 . 第 1 の標的結合ドメインが、可溶性 T G F - β 受容体である、実施形態 G 4 8 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 8 6 8 】

実施形態 G 5 0 . 可溶性 T G F - β 受容体が、可溶性 T G F β R I I 受容体である、実施形態 G 4 9 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 8 6 9 】

実施形態 G 5 1 . 第 2 の標的結合ドメインが、C D 1 6 に特異的に結合する、実施形態 G 4 8 ~ G 5 0 のいずれか 1 つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 8 7 0 】

実施形態 G 5 2 . 第 2 の抗原結合ドメインが、C D 1 6 に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、実施形態 G 5 1 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 8 7 1 】

実施形態 G 5 3 . 第 2 の抗原結合ドメインが、C D 1 6 に特異的に結合する s c F v を含む、実施形態 G 5 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 8 7 2 】

実施形態 G 5 4 . 第 2 の標的結合ドメインが、I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 4 8 ~ G 5 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1873】

実施形態G55. 第2の標的結合ドメインが、可溶性IL-21を含む、実施形態G54に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1874】

実施形態G56. 第2の標的結合ドメインが、可溶性ヒトIL-21を含む、実施形態G55に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1875】

実施形態G57. 第2のキメラポリペプチドが、IL-21受容体に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態G48～G53のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1876】

実施形態G58. 追加の標的結合ドメインが、可溶性IL-21を含む、実施形態G57に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1877】

実施形態G59. 可溶性IL-21が、可溶性ヒトIL-21である、実施形態G58に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1878】

実施形態G60. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立して、IL-7受容体に特異的に結合する、実施形態G1～G34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1879】

実施形態G61. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、可溶性IL-7を含む、実施形態G60に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1880】

実施形態G62. 可溶性IL-7が、可溶性ヒトIL-7である、実施形態G61に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1881】

実施形態G63. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立して、TGF- β に特異的に結合する、実施形態G1～G34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1882】

実施形態G64. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G63に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1883】

実施形態G65. 可溶性TGF- β 受容体が、可溶性TGF- β RII受容体である、実施形態G64に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1884】

実施形態G66. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立して、IL-7受容体、IL-21受容体、またはCD137L受容体に特異的に結合する、実施形態G1～G34のいずれか1つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1885】

実施形態G67. 第1の標的結合ドメインがIL-7受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインがIL-21受容体またはCD137L受容体に特異的に結合する、実施形態G66に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1886】

実施形態G68. 第1の標的結合ドメインが、可溶性IL-7である、実施形態G67に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1887】

実施形態G69. 可溶性IL-7が、可溶性ヒトIL-7である、実施形態G68に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【1888】

実施形態G70. 第2の標的結合ドメインが、IL-21受容体に特異的に結合する、実施形態G67～G69のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1889】

実施形態G71. 第2の標的結合ドメインが、可溶性IL-21である、実施形態G70に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1890】

実施形態G72. 可溶性IL-21が、可溶性ヒトIL-21である、実施形態G71に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1891】

実施形態G73. 第2の抗原結合ドメインが、CD137L受容体に特異的に結合する、実施形態G67～G69のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1892】

実施形態G74. 第2の抗原結合ドメインが、可溶性CD137Lである、実施形態G73に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1893】

実施形態G75. 可溶性CD137Lが、可溶性ヒトCD137Lである、実施形態G74に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1894】

実施形態G76. 第2のキメラポリペプチドが、CD137L受容体に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態G67～G72のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1895】

実施形態G77. 追加の標的結合ドメインが、可溶性CD137Lを含む、実施形態G76に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1896】

実施形態G78. 可溶性CD137Lが、可溶性ヒトCD137Lである、実施形態G77に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1897】

実施形態G79. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立して、IL-7受容体またはTGF- β に特異的に結合する、実施形態G1～G34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1898】

実施形態G80. 第1の標的結合ドメインがIL-7受容体に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインがTGF- β に特異的に結合する、実施形態G79に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1899】

実施形態G81. 第1の標的結合ドメインが、可溶性IL-7タンパク質を含む、実施形態G80に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1900】

実施形態G82. 可溶性IL-7タンパク質が、可溶性ヒトIL-7である、実施形態G81に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1901】

実施形態G83. 第2の抗原結合ドメインが、TGF- β に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、実施形態G80～G82のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1902】

実施形態G84. 第2の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G83に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1903】

10

20

30

40

50

実施形態 G 8 5 . 可溶性 T G F - β 受容体が、可溶性 T G F β R I I 受容体である、実施形態 G 8 4 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 9 0 4 】

実施形態 G 8 6 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、T G F - β 、I L - 2 1 受容体、または C D 1 3 7 L 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 1 ~ G 3 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 0 5 】

実施形態 G 8 7 . 第 1 の標的結合ドメインが T G F - β に特異的に結合し、第 2 の標的結合ドメインが I L - 2 1 受容体または C D 1 3 7 L 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 8 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 0 6 】

実施形態 G 8 8 . 第 1 の標的結合ドメインが、可溶性 T G F - β 受容体である、実施形態 G 8 7 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 9 0 7 】

実施形態 G 8 9 . 可溶性 T G F - β 受容体が、可溶性 T G F β R I I 受容体である、実施形態 G 8 8 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 9 0 8 】

実施形態 G 9 0 . 第 2 の標的結合ドメインが、I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 8 7 ~ G 8 9 のいずれか 1 つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 9 0 9 】

実施形態 G 9 1 . 第 2 の標的結合ドメインが、可溶性 I L - 2 1 を含む、実施形態 G 9 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 0 】

実施形態 G 9 2 . 第 2 の標的結合ドメインが、可溶性ヒト I L - 2 1 を含む、実施形態 G 9 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 1 】

実施形態 G 9 3 . 第 2 の標的結合ドメインが、C D 1 3 7 L 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 8 7 ~ G 8 9 のいずれか 1 つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【 1 9 1 2 】

実施形態 G 9 4 . 第 2 の標的結合ドメインが、可溶性 C D 1 3 7 L を含む、実施形態 G 9 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 3 】

実施形態 G 9 5 . 第 2 の標的結合ドメインが、可溶性ヒト C D 1 3 7 L を含む、実施形態 G 9 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 4 】

実施形態 G 9 6 . 第 2 のキメラポリペプチドが、C D 1 3 7 L 受容体に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 G 8 7 ~ G 9 2 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 5 】

実施形態 G 9 7 . 追加の標的結合ドメインが、可溶性 C D 1 3 7 L を含む、実施形態 G 9 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 6 】

実施形態 G 9 8 . 可溶性 C D 1 3 7 L が、可溶性ヒト C D 1 3 7 L である、実施形態 G 9 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 7 】

実施形態 G 9 9 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々独立して、T G F - β または I L - 2 1 受容体に特異的に結合する、実施形態 G 1 ~ G 3 4 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 1 9 1 8 】

実施形態 G 1 0 0 . 第 1 の標的結合ドメインが T G F - β に特異的に結合し、第 2 の標

10

20

30

40

50

的結合ドメインがTGF- β またはIL-21受容体に特異的に結合する、実施形態G99に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1919】

実施形態G101．第1の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G100に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1920】

実施形態G102．可溶性TGF- β 受容体が、可溶性TGF β RII受容体である、実施形態G101に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1921】

実施形態G103．第2の標的結合ドメインが、IL-21受容体に特異的に結合する、実施形態G100～G102のいずれか1つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

10

【1922】

実施形態G104．第2の標的結合ドメインが、可溶性IL-21を含む、実施形態G103に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1923】

実施形態G105．第2の標的結合ドメインが、可溶性ヒトIL-21を含む、実施形態G104に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1924】

実施形態G106．第2の標的結合ドメインが、TGF- β に特異的に結合する、実施形態G100～G102のいずれか1つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

20

【1925】

実施形態G107．第1の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G106に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1926】

実施形態G108．可溶性TGF- β 受容体が、可溶性TGF β RII受容体である、実施形態G107に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1927】

実施形態G109．第2のポリペプチドが、TGF- β に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態G100～G105のいずれか1つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

30

【1928】

実施形態G110．第1の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G109に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1929】

実施形態G111．可溶性TGF- β 受容体が、可溶性TGF β RII受容体である、実施形態G110に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1930】

実施形態G112．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立して、TGF- β またはIL-16に特異的に結合する、実施形態G1～G34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1931】

実施形態G113．第1の標的結合ドメインがTGF- β に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインがTGF- β またはIL-16に特異的に結合する、実施形態G112に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1932】

実施形態G114．第1の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G113に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1933】

実施形態G115．可溶性TGF- β 受容体が、可溶性TGF β RII受容体である、実施形態G114に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

50

【1934】

実施形態G116. 第2の標的結合ドメインが、IL-16に特異的に結合する、実施形態G113～G115のいずれか1つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1935】

実施形態G117. 第2の抗原結合ドメインが、CD16に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、実施形態G116に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1936】

実施形態G118. 第2の抗原結合ドメインが、CD16に特異的に結合するs c F vを含む、実施形態G117に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1937】

実施形態G119. 第2の標的結合ドメインが、TGF- β に特異的に結合する、実施形態G113～G115のいずれか1つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1938】

実施形態G120. 第1の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G119に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1939】

実施形態G121. 可溶性TGF- β 受容体が可溶性TGF β RII受容体である、実施形態G120の多重特異性キメラポリペプチド。

【1940】

実施形態G122. 第2のキメラポリペプチドが、TGF- β に特異的に結合する追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態G113～G118のいずれか1つに記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1941】

実施形態G123. 第1の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G122に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1942】

実施形態G124. 可溶性TGF- β 受容体が、可溶性TGF β RII受容体である、実施形態G123に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1943】

実施形態G125. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々独立して、TGF- β またはCD137L受容体に特異的に結合する、実施形態G1～G34のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1944】

実施形態G126. 第1の標的結合ドメインがTGF- β に特異的に結合し、第2の標的結合ドメインがCD137L受容体に特異的に結合する、実施形態G125に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1945】

実施形態G127. 第1の標的結合ドメインが、可溶性TGF- β 受容体である、実施形態G126に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1946】

実施形態G128. 可溶性TGF- β 受容体が、可溶性TGF β RII受容体である、実施形態G127に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1947】

実施形態G129. 第2の標的結合ドメインが、可溶性CD137Lタンパク質を含む、実施形態G128に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1948】

実施形態G130. 可溶性CD137Lタンパク質が、可溶性ヒトCD137Lである、実施形態G129に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1949】

実施形態G131. 第2のキメラポリペプチドが、TGF- β に特異的に結合する追加

10

20

30

40

50

の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 G 1 2 6 ~ G 1 3 0 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1950】

実施形態 G 1 3 2 . 追加の標的結合ドメインが、可溶性 TGF- β 受容体である、実施形態 G 1 3 1 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1951】

実施形態 G 1 3 3 . 可溶性 TGF- β 受容体が、可溶性 TGF β RII 受容体である、実施形態 G 1 3 2 に記載の多重特異性キメラポリペプチド。

【1952】

実施形態 G 1 3 4 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1953】

実施形態 G 1 3 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 3 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1954】

実施形態 G 1 3 6 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 3 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1955】

実施形態 G 1 3 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 を含む、実施形態 G 1 3 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1956】

実施形態 G 1 3 8 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 9 を含む、実施形態 G 1 3 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1957】

実施形態 G 1 3 9 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 および G 1 3 4 ~ G 1 3 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1958】

実施形態 G 1 4 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 3 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1959】

実施形態 G 1 4 1 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 4 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1960】

実施形態 G 1 4 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 を含む、実施形態 G 1 4 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1961】

実施形態 G 1 4 3 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 4 を含む、実施形態 G 1 4 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1962】

実施形態 G 1 4 4 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1963】

実施形態 G 1 4 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 4 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1964】

実施形態 G 1 4 6 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 4 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1965】

実施形態 G 1 4 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 を含む、実施形態 G

50

1 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 6 6】

実施形態 G 1 4 8 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 8 を含む、実施形態 G 1 4 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 6 7】

実施形態 G 1 4 9 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 および G 1 4 4 ~ G 1 4 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 6 8】

実施形態 G 1 5 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 4 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【1 9 6 9】

実施形態 G 1 5 1 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 5 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 7 0】

実施形態 G 1 5 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 2 を含む、実施形態 G 1 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 7 1】

実施形態 G 1 5 3 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 4 を含む、実施形態 G 1 5 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【1 9 7 2】

実施形態 G 1 5 4 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 7 3】

実施形態 G 1 5 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 5 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 7 4】

実施形態 G 1 5 6 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 5 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 7 5】

実施形態 G 1 5 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 7 を含む、実施形態 G 1 5 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【1 9 7 6】

実施形態 G 1 5 8 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 9 を含む、実施形態 G 1 5 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 7 7】

実施形態 G 1 5 9 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 および G 1 5 4 ~ G 1 5 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 7 8】

実施形態 G 1 6 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 5 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【1 9 7 9】

実施形態 G 1 6 1 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 6 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 8 0】

実施形態 G 1 6 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 0 3 を含む、実施形態 G 1 6 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1 9 8 1】

実施形態 G 1 6 3 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 5 0 を含む、実施形態 G

50

162に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1982】

実施形態G164．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1983】

実施形態G165．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G164に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1984】

実施形態G166．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G165に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1985】

実施形態G167．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236を含む、実施形態G166に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1986】

実施形態G168．第1のキメラポリペプチドが、配列番号238を含む、実施形態G167に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1987】

実施形態G169．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1およびG164～G168のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1988】

実施形態G170．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G169に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1989】

実施形態G171．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G170に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1990】

実施形態G172．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193を含む、実施形態G171に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1991】

実施形態G173．第2のキメラポリペプチドが、配列番号195を含む、実施形態G172に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1992】

実施形態G174．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1993】

実施形態G175．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G174に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1994】

実施形態G176．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G175に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1995】

実施形態G177．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207を含む、実施形態G176に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1996】

実施形態G178．第1のキメラポリペプチドが、配列番号209を含む、実施形態G177に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1997】

実施形態G179．第2のキメラポリペプチドが、配列番号268と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1およびG174～G178のいずれか1つに記載の多鎖

10

20

30

40

50

キメラポリペプチド。

【1998】

実施形態G180．第2のキメラポリペプチドが、配列番号268と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G179に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【1999】

実施形態G181．第2のキメラポリペプチドが、配列番号268と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G180に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2000】

実施形態G182．第2のキメラポリペプチドが、配列番号268を含む、実施形態G181に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2001】

実施形態G183．第2のキメラポリペプチドが、配列番号270を含む、実施形態G182に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2002】

実施形態G184．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2003】

実施形態G185．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G184に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2004】

実施形態G186．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G185に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2005】

実施形態G187．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207を含む、実施形態G186に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2006】

実施形態G188．第1のキメラポリペプチドが、配列番号209を含む、実施形態G187に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2007】

実施形態G189．第2のキメラポリペプチドが、配列番号272と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1およびG184～G188のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2008】

実施形態G190．第2のキメラポリペプチドが、配列番号272と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G189に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2009】

実施形態G191．第2のキメラポリペプチドが、配列番号272と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G190に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2010】

実施形態G192．第2のキメラポリペプチドが、配列番号272を含む、実施形態G191に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2011】

実施形態G193．第2のキメラポリペプチドが、配列番号272を含む、実施形態G192に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2012】

実施形態G194．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2013】

実施形態G195．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G194に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【2014】

実施形態G196．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G195に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2015】

実施形態G197．第1のキメラポリペプチドが、配列番号207を含む、実施形態G196に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2016】

実施形態G198．第1のキメラポリペプチドが、配列番号209を含む、実施形態G197に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2017】

実施形態G199．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1およびG194～G198のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2018】

実施形態G200．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G199に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2019】

実施形態G201．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G200に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2020】

実施形態G202．第2のキメラポリペプチドが、配列番号193を含む、実施形態G201に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2021】

実施形態G203．第2のキメラポリペプチドが、配列番号195を含む、実施形態G202に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2022】

実施形態G204．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2023】

実施形態G205．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G204に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2024】

実施形態G206．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G205に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2025】

実施形態G207．第1のキメラポリペプチドが、配列番号236を含む、実施形態G206に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2026】

実施形態G208．第1のキメラポリペプチドが、配列番号238を含む、実施形態G207に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2027】

実施形態G209．第2のキメラポリペプチドが、配列番号268と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1およびG204～G208のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2028】

実施形態G210．第2のキメラポリペプチドが、配列番号268と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G209に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2029】

実施形態G211．第2のキメラポリペプチドが、配列番号268と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G210に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

20

30

40

50

【2030】

実施形態G212. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号268を含む、実施形態G211に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2031】

実施形態G213. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号270を含む、実施形態G212に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2032】

実施形態G214. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2033】

実施形態G215. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G214に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2034】

実施形態G216. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G215に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2035】

実施形態G217. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236を含む、実施形態G216に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2036】

実施形態G218. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号238を含む、実施形態G217に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2037】

実施形態G219. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号300と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1およびG214～G218のいずれか1つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2038】

実施形態G220. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号300と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G219に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2039】

実施形態G221. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号300と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G220に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2040】

実施形態G222. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号300を含む、実施形態G221に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2041】

実施形態G223. 第2のキメラポリペプチドが、配列番号302を含む、実施形態G222に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2042】

実施形態G224. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態G1に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2043】

実施形態G225. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態G224に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2044】

実施形態G226. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態G225に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2045】

実施形態G227. 第1のキメラポリペプチドが、配列番号236を含む、実施形態G226に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2046】

10

20

30

40

50

実施形態 G 2 2 8 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 8 を含む、実施形態 G 2 2 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 4 7 】

実施形態 G 2 2 9 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 0 8 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 および G 2 2 4 ~ G 2 2 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 4 8 】

実施形態 G 2 3 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 0 8 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 2 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 4 9 】

実施形態 G 2 3 1 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 0 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 3 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 0 】

実施形態 G 2 3 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 0 8 を含む、実施形態 G 2 3 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 1 】

実施形態 G 2 3 3 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 1 0 を含む、実施形態 G 2 3 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 2 】

実施形態 G 2 3 4 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 3 】

実施形態 G 2 3 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 3 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 4 】

実施形態 G 2 3 6 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 3 5 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 5 】

実施形態 G 2 3 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 6 を含む、実施形態 G 2 3 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 6 】

実施形態 G 2 3 8 . 第 1 のキメラポリペプチドが、配列番号 2 3 8 を含む、実施形態 G 2 3 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 7 】

実施形態 G 2 3 9 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 1 6 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 1 および G 2 3 4 ~ G 2 3 8 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 8 】

実施形態 G 2 4 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 1 6 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 3 9 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 5 9 】

実施形態 G 2 4 1 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 1 6 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 4 0 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 6 0 】

実施形態 G 2 4 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 1 6 を含む、実施形態 G 2 4 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 6 1 】

実施形態 G 2 4 3 . 第 2 のキメラポリペプチドが、配列番号 3 1 8 を含む、実施形態 G 2 4 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 6 2 】

10

20

30

40

50

実施形態 G 2 4 4 . 第 1 のキメラポリペプチドが、1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含み、1 つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられている、実施形態 G 1 ～ G 1 3 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 6 3 】

実施形態 G 2 4 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間にリンカー配列、および／または 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 4 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【 2 0 6 4 】

実施形態 G 2 4 6 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端および／または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 G 1 ～ G 1 3 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 6 5 】

実施形態 G 2 4 7 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 G 2 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 6 6 】

実施形態 G 2 4 8 . 第 1 のキメラポリペプチドが、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

20

【 2 0 6 7 】

実施形態 G 2 4 9 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態 G 2 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 6 8 】

実施形態 G 2 5 0 . 第 1 のキメラポリペプチドが、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと第 1 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【 2 0 6 9 】

実施形態 G 2 5 1 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端および／または C 末端に配置されており、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられている、実施形態 G 2 4 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 7 0 】

実施形態 G 2 5 2 . N 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 G 2 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【 2 0 7 1 】

実施形態 G 2 5 3 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【 2 0 7 2 】

実施形態 G 2 5 4 . C 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態

50

G 2 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2073】

実施形態 G 2 5 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2074】

実施形態 G 2 5 6 . 可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、可溶性組織因子ドメインおよび／または一对の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 G 2 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

10

【2075】

実施形態 G 2 5 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、(i) 可溶性組織因子ドメインと、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間、および／または (i i) 一对の親和性ドメインの第 1 のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 5 1 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2076】

20

実施形態 G 2 5 8 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端に追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 G 4 4 ~ G 4 6 、 G 5 7 ~ G 5 9 、 G 7 6 ~ G 7 8 、 G 9 6 ~ G 9 8 、 G 1 0 9 ~ G 1 1 1 、 G 1 2 2 ~ G 1 2 4 、および G 1 3 1 ~ G 1 3 3 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2077】

実施形態 G 2 5 9 . 追加の標的結合ドメインが、第 2 のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第 2 のドメインに直接隣接している、実施形態 G 2 5 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2078】

実施形態 G 2 6 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の追加の標的結合ドメインと一对の親和性ドメインの第 2 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 5 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

30

【2079】

実施形態 G 2 6 1 . 追加の標的結合ドメインが、第 2 のキメラポリペプチド内の第 2 の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態 G 2 5 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2080】

実施形態 G 2 6 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の追加の標的結合ドメインと第 2 の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 G 2 5 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

40

【2081】

実施形態 G 2 6 3 . 実施形態 G 1 ~ G 2 6 2 に記載の多鎖キメラポリペプチドのうちのいずれかを含む、組成物。

【2082】

実施形態 G 2 6 4 . 組成物が、医薬組成物である、実施形態 G 2 6 3 に記載の組成物。

【2083】

実施形態 G 2 6 5 . 実施形態 G 2 6 3 または G 2 6 4 に記載の組成物の少なくとも 1 つの用量を含む、キット。

【2084】

実施形態 G 2 6 6 . 実施形態 G 1 ~ G 2 6 2 のいずれか 1 つに記載の多鎖キメラポリペ

50

プチドのうちのいずれかをコードする、核酸。

【2085】

実施形態 G 2 6 7 . 実施形態 G 2 6 6 に記載の核酸を含む、ベクター。

【2086】

実施形態 G 2 6 8 . ベクターが、発現ベクターである、実施形態 G 2 6 7 に記載のベクター。

【2087】

実施形態 G 2 6 9 . 実施形態 G 3 2 3 に記載の核酸または実施形態 G 2 6 7 または G 2 6 8 に記載のベクターを含む、細胞。

【2088】

実施形態 G 2 7 0 . 多鎖キメラポリペプチドを産生する方法であって、
多鎖キメラポリペプチドの産生をもたらすのに十分な条件下で、実施形態 G 2 6 9 に記載の細胞を培養培地中で培養することと、
多鎖キメラポリペプチドを細胞および／または培養培地から回収することとを含む、方法。

【2089】

実施形態 G 2 7 1 . 実施形態 G 2 7 0 に記載の方法によって産生された多鎖キメラポリペプチド。

【2090】

実施形態 G 2 7 2 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2091】

実施形態 G 2 7 3 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 7 2 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2092】

実施形態 G 2 7 4 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 7 3 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2093】

実施形態 G 2 7 5 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 7 と 1 0 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 7 4 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2094】

実施形態 G 2 7 6 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2095】

実施形態 G 2 7 7 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 7 6 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2096】

実施形態 G 2 7 8 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 7 7 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2097】

実施形態 G 2 7 9 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 8 と 1 0 0 % 同一の配列を含む、実施形態 G 2 7 8 に記載の多鎖キメラポリペプチド。

【2098】

実施形態 H 1 . 加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効量の 1 つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

【2099】

実施形態 H 2 . 老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、対象に、治療有効量

10

20

30

40

50

の1つ以上のNK細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

【2100】

実施形態H3．老化細胞が、老化がん細胞、老化単球、老化リンパ球、老化星状細胞、老化ミクログリア、老化ニューロン、老化組織線維芽細胞、老化皮膚線維芽細胞、老化ケラチノサイト、または他の分化組織特異的な分裂機能細胞である、実施形態H2に記載の方法。

【2101】

実施形態H4．老化癌細胞が、化学療法によって誘導された老化細胞または放射線によって誘導された老化細胞である、実施形態H3に記載の方法。

【2102】

実施形態H5．対象が、加齢関連疾患または状態を有すると特定または診断されている、実施形態H2に記載の方法。

【2103】

実施形態H6．加齢関連疾患または状態が、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、心臓血管疾患、皮膚疾患、早老症疾患、および脆弱性疾患からなる群から選択される、実施形態H1またはH5に記載の方法。

【2104】

実施形態H7．がんが、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃食道癌、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肝臓癌、および肝細胞癌からなる群から選択される、実施形態H6に記載の方法。

【2105】

実施形態H8．自己免疫疾患が1型糖尿病である、実施形態H6に記載の方法。

【2106】

実施形態H9．代謝性疾患が、肥満、リポジストロフィー、および2型真性糖尿病からなる群から選択される、実施形態H6に記載の方法。

【2107】

実施形態H10．神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、および認知症からなる群から選択される、実施形態H6に記載の方法。

【2108】

実施形態H11．心臓血管疾患が、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、および肺動脈高血圧症からなる群から選択される、実施形態H6に記載の方法。

【2109】

実施形態H12．皮膚疾患が、創傷治癒、脱毛症、しわ、老年性黒子、皮膚の菲薄化、色素性乾皮症、および先天性角化異常症からなる群から選択される、実施形態H6に記載の方法。

【2110】

実施形態H13．早老症疾患が、早老症およびハッチンソン・ギルフォード早老症症候群からなる群から選択される、実施形態H6に記載の方法。

【2111】

実施形態H14．脆弱性疾患が、脆弱、ワクチン接種に対する応答、骨粗しょう症、およびサルコペニアからなる群から選択される、実施形態H6に記載の方法。

【2112】

実施形態H15．加齢関連疾患または状態が、加齢関連黄斑変性、骨関節炎、脂肪萎縮、特発性肺線維症、腎移植不全、肝線維症、骨量喪失、サルコペニア、加齢関連肺組織弾性喪失、骨粗しょう症、加齢関連腎機能障害、および化学的に誘導された腎機能障害の群

10

20

30

40

50

から選択される、実施形態 H 1 または H 5 に記載の方法。

【2113】

実施形態 H 1 6 . 加齢関連疾患または状態が、2 型糖尿病またはアテローム性動脈硬化症である、実施形態 H 1 または H 5 に記載の方法。

【2114】

実施形態 H 1 7 . 投与することが、対象における標的組織の老化細胞の数の減少をもたらす、実施形態 H 1 ~ H 1 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【2115】

実施形態 H 1 8 . 標的組織が、脂肪組織、膵臓組織、肝臓組織、肺組織、血管系、骨組織、中枢神経系 (CNS) 組織、眼組織、皮膚組織、筋肉組織、および二次リンパ器官組織からなる群から選択される、実施形態 H 1 7 に記載の方法。

10

【2116】

実施形態 H 1 9 . 投与することが、活性化された NK 細胞における CD 2 5、CD 6 9、M T O R - C 1、S R E B P 1、I F N - γ 、およびグランザイム B の発現レベルの増加をもたらす、実施形態 H 1 ~ H 1 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【2117】

実施形態 H 2 0 . 加齢関連疾患または状態の治療を必要とする対象において加齢関連疾患または状態を治療する方法であって、加齢関連疾患または状態を有すると特定された対象に、治療有効数の活性化された NK 細胞を投与することを含む、方法。

【2118】

20

実施形態 H 2 1 . 老化細胞の死滅または老化細胞の数の減少を必要とする対象において老化細胞を死滅させるまたは老化細胞の数を減少させる方法であって、対象に、治療有効数の活性化された NK 細胞を投与することを含む、方法。

【2119】

実施形態 H 2 2 . 老化細胞が、老化がん細胞、老化単球、老化リンパ球、老化星状細胞、老化ミクログリア、老化ニューロン、老化組織線維芽細胞、老化皮膚線維芽細胞、老化ケラチノサイト、または他の分化組織特異的な分裂機能細胞である、実施形態 H 2 1 に記載の方法。

【2120】

実施形態 H 2 3 . 老化癌細胞が、化学療法によって誘導された老化細胞または放射線によって誘導された老化細胞である、実施形態 H 2 2 に記載の方法。

30

【2121】

実施形態 H 2 4 . 対象が、加齢関連疾患または状態を有すると特定または診断されている、実施形態 H 2 1 に記載の方法。

【2122】

実施形態 H 2 5 . 加齢関連疾患または状態が、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、心臓血管疾患、皮膚疾患、早老症疾患、および脆弱性疾患からなる群から選択される、実施形態 H 2 0 または H 2 4 に記載の方法。

【2123】

実施形態 H 2 6 . がんが、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B 細胞新生物、多発性骨髄腫、B 細胞リンパ腫、B 細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性リンパ性白血病 (ALL)、骨髄異形成症候群 (MDS)、皮膚 T 細胞リンパ腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃食道癌、膵臓癌、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肝臓癌、および肝細胞癌からなる群から選択される、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

40

【2124】

実施形態 H 2 7 . 自己免疫疾患が 1 型糖尿病である、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

【2125】

50

実施形態 H 2 8 . 代謝性疾患が、肥満、リポジストロフィー、および 2 型真性糖尿病からなる群から選択される、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

【 2 1 2 6 】

実施形態 H 2 9 . 神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、および認知症からなる群から選択される、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

【 2 1 2 7 】

実施形態 H 3 0 . 心臓血管疾患が、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、および肺動脈高血圧症からなる群から選択される、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

【 2 1 2 8 】

実施形態 H 3 1 . 皮膚疾患が、創傷治癒、脱毛症、しわ、老年性黒子、皮膚の菲薄化、色素性乾皮症、および先天性角化異常症からなる群から選択される、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

10

【 2 1 2 9 】

実施形態 H 3 2 . 早老症疾患が、早老症およびハッチンソン・ギルフォード早老症症候群からなる群から選択される、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

【 2 1 3 0 】

実施形態 H 3 3 . 脆弱性疾患が、脆弱、ワクチン接種に対する応答、骨粗しょう症、およびサルコペニアからなる群から選択される、実施形態 H 2 5 に記載の方法。

【 2 1 3 1 】

実施形態 H 3 4 . 加齢関連疾患または状態が、加齢関連黄斑変性、骨関節炎、脂肪萎縮、特発性肺線維症、腎移植不全、肝線維症、骨量喪失、サルコペニア、加齢関連肺組織弾性喪失、骨粗しょう症、加齢関連腎機能障害、および化学的に誘導された腎機能障害からなる群から選択される、実施形態 H 2 0 または H 2 4 に記載の方法。

20

【 2 1 3 2 】

実施形態 H 3 5 .

休止 NK 細胞を得ることと、

1 つ以上の NK 細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止 NK 細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化された NK 細胞の生成をもたらす、接触させることと

をさらに含む、実施形態 H 2 0 ~ H 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 2 1 3 3 】

実施形態 H 3 6 . 休止 NK 細胞が、対象から得られた自己 NK 細胞である、実施形態 H 3 5 に記載の方法。

【 2 1 3 4 】

実施形態 H 3 7 . 休止 NK 細胞が、同種異系の休止 NK 細胞である、実施形態 H 3 5 に記載の方法。

【 2 1 3 5 】

実施形態 H 3 8 . 休止 NK 細胞が、人工 NK 細胞である、実施形態 H 3 5 に記載の方法。

【 2 1 3 6 】

実施形態 H 3 9 . 休止 NK 細胞が、ハプロタイプ一致の休止 NK 細胞である、実施形態 H 3 5 に記載の方法。

40

【 2 1 3 7 】

実施形態 H 4 0 . 休止 NK 細胞が、キメラ抗原受容体または組換え T 細胞受容体を有する遺伝子操作された NK 細胞である、実施形態 H 3 5 ~ H 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 3 8 】

実施形態 H 4 1 . 活性化された NK 細胞が対象に投与される前に、活性化された NK 細胞を単離することをさらに含む、実施形態 H 3 5 ~ H 4 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 3 9 】

実施形態 H 4 2 . 皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とす

50

る対象においてある期間にわたって皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、対象に、治療有効量の1つ以上のナチュラルキラー（NK）細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

【2140】

実施形態H43．皮膚および／または毛髪の質感および／または外観の改善を必要とする対象においてある期間にわたって皮膚および／または毛髪の質感および／または外観を改善する方法であって、対象に、治療有効数の活性化されたNK細胞を投与することを含む、方法。

【2141】

実施形態H44．

休止NK細胞を得ることと、

1つ以上のNK細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止NK細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化NK細胞の生成をもたらす、接触させることと

をさらに含む、実施形態H43に記載の方法。

【2142】

実施形態H45．休止NK細胞が、対象から得られた自己NK細胞である、実施形態H44に記載の方法。

【2143】

実施形態H46．休止NK細胞が、同種異系の休止NK細胞である、実施形態H44に記載の方法。

【2144】

実施形態H47．休止NK細胞が、人工NK細胞である、実施形態H44に記載の方法。

【2145】

実施形態H48．休止NK細胞が、ハプロタイプ一致の休止NK細胞である、実施形態H44に記載の方法。

【2146】

実施形態H49．休止NK細胞が、キメラ抗原受容体または組換えT細胞受容体を有する遺伝子操作されたNK細胞である、実施形態H44～H48のいずれか1つに記載の方法。

【2147】

実施形態H50．活性化されたNK細胞が対象に投与される前に、活性化されたNK細胞を単離することをさらに含む、実施形態H44～H49のいずれか1つに記載の方法。

【2148】

実施形態H51．前記期間にわたって対象の皮膚の質感および／または外観の改善を提供する、実施形態H42～H50のいずれか1つに記載の方法。

【2149】

実施形態H52．前記期間にわたって対象の皮膚のしわの形成速度の減少をもたらす、実施形態H51に記載の方法。

【2150】

実施形態H53．前記期間にわたって対象の皮膚の着色の改善をもたらす、実施形態H51またはH52に記載の方法。

【2151】

実施形態H54．前記期間にわたって対象の皮膚の質感の改善をもたらす、実施形態H51～H53のいずれか1つに記載の方法。

【2152】

実施形態H55．前記期間にわたって対象の毛髪の質感および／または外観の改善を提供する、実施形態H42～H50のいずれか1つに記載の方法。

【2153】

実施形態H56．前記期間にわたって対象の白髪の形成速度の減少をもたらす、実施形

10

20

30

40

50

態 H 5 5 に記載の方法。

【 2 1 5 4 】

実施形態 H 5 7 . 前記期間にわたって対象の白髪の数減少をもたらす、実施形態 H 5 5 または H 5 6 に記載の方法。

【 2 1 5 5 】

実施形態 H 5 8 . 経時的に対象の毛髪脱落速度の減少をもたらす、実施形態 H 5 5 ~ H 5 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 5 6 】

実施形態 H 5 9 . 前記期間にわたって対象の毛髪の質感の改善をもたらす、実施形態 H 5 5 ~ H 5 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 5 7 】

実施形態 H 6 0 . 前記期間が、約 1 カ月間 ~ 約 1 0 年間である、実施形態 H 4 2 ~ H 5 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 5 8 】

実施形態 H 6 1 . 前記期間にわたって対象の皮膚の老化皮膚線維芽細胞の数減少をもたらす、実施形態 H 4 2 ~ H 6 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 5 9 】

実施形態 H 6 2 . 肥満の治療の支援を必要とする対象においてある期間にわたって肥満の治療を支援する方法であって、対象に、治療有効量の 1 つ以上のナチュラルキラー (N K) 細胞活性化物質を投与することを含む、方法。

【 2 1 6 0 】

実施形態 H 6 3 . 肥満の治療の支援を必要とする対象においてある期間にわたって肥満の治療を支援する方法であって、対象に、治療有効数の活性化された N K 細胞を投与することを含む、方法。

【 2 1 6 1 】

実施形態 H 6 4 .

休止 N K 細胞を得ることと、

1 つ以上の N K 細胞活性化物質を含む液体培養培地中でインビトロで休止 N K 細胞を接触させることであって、対象にその後投与される活性化 N K 細胞の生成をもたらす、接触させることと

をさらに含む、実施形態 H 6 3 に記載の方法。

【 2 1 6 2 】

実施形態 H 6 5 . 休止 N K 細胞が、対象から得られた自己 N K 細胞である、実施形態 H 6 4 に記載の方法。

【 2 1 6 3 】

実施形態 H 6 6 . 休止 N K 細胞が、同種異系の休止 N K 細胞である、実施形態 H 6 4 に記載の方法。

【 2 1 6 4 】

実施形態 H 6 7 . 休止 N K 細胞が、人工 N K 細胞である、実施形態 H 6 4 に記載の方法。

【 2 1 6 5 】

実施形態 H 6 8 . 休止 N K 細胞が、ハプロタイプ一致の休止 N K 細胞である、実施形態 H 6 4 に記載の方法。

【 2 1 6 6 】

実施形態 H 6 9 . 休止 N K 細胞が、キメラ抗原受容体または組換え T 細胞受容体を有する遺伝子操作された N K 細胞である、実施形態 H 6 4 ~ H 6 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 6 7 】

実施形態 H 7 0 . 活性化された N K 細胞が対象に投与される前に、活性化された N K 細胞を単離することをさらに含む、実施形態 H 6 4 ~ H 6 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 6 8 】

実施形態 H 7 1 . 前記期間にわたって対象の質量の減少をもたらす、実施形態 H 6 2 ~ H 7 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 6 9 】

実施形態 H 7 2 . 前記期間にわたって対象の肥満度指数 (B M I) の減少をもたらす、実施形態 H 6 2 ~ H 7 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 7 0 】

実施形態 H 7 3 . 対象における前糖尿病から 2 型糖尿病への進行速度の減少をもたらす、実施形態 H 6 2 ~ H 7 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 7 1 】

実施形態 H 7 4 . 対象における空腹時血糖値の減少をもたらす、実施形態 H 6 2 ~ H 7 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 7 2 】

実施形態 H 7 5 . 対象におけるインスリン感受性の増加をもたらす、実施形態 H 6 2 ~ H 7 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 7 3 】

実施形態 H 7 6 . 対象におけるアテローム性動脈硬化症の重症度の減少をもたらす、実施形態 H 6 2 ~ H 7 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 7 4 】

実施形態 H 7 7 . 前記期間が、約 2 週間 ~ 約 1 0 年間である、実施形態 H 6 2 ~ H 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 7 5 】

実施形態 H 7 8 . 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、 I L - 2 受容体、 I L - 7 受容体、 I L - 1 2 受容体、 I L - 1 5 受容体、 I L - 1 8 受容体、 I L - 2 1 受容体、 I L - 3 3 受容体、 C D 1 6 、 C D 6 9 、 C D 2 5 、 C D 3 6 、 C D 5 9 、 C D 3 5 2 、 N K p 8 0 、 D N A M - 1 、 2 B 4 、 N K p 3 0 、 N K p 4 4 、 N K p 4 6 、 N K G 2 D 、 K I R 2 D S 1 、 K I R 2 D s 2 / 3 、 K I R 2 D L 4 、 K I R 2 D S 4 、 K I R 2 D S 5 、 および K I R 3 D S 1 のうちの 1 つ以上の活性化をもたらす、実施形態 H 1 ~ H 1 9 、 H 3 5 ~ H 4 2 、 H 4 4 ~ H 6 2 、 および H 6 4 ~ H 7 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 1 7 6 】

実施形態 H 7 9 . I L - 2 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、可溶性 I L - 2 または I L - 2 受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 7 7 】

実施形態 H 8 0 . I L - 7 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、可溶性 I L - 7 または I L - 7 受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 7 8 】

実施形態 H 8 1 . I L - 1 2 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、可溶性 I L - 1 2 または I L - 1 2 受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 7 9 】

実施形態 H 8 2 . I L - 1 5 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、可溶性 I L - 1 5 または I L - 1 5 受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 0 】

実施形態 H 8 3 . I L - 2 1 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、可溶性 I L - 2 1 または I L - 2 1 受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 1 】

10

20

30

40

50

実施形態 H 8 4 . I L - 3 3 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、可溶性 I L - 3 3 または I L - 3 3 受容体に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 2 】

実施形態 H 8 5 . C D 1 6 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、C D 1 6 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 3 】

実施形態 H 8 6 . C D 6 9 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、C D 6 9 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 4 】

実施形態 H 8 7 . C D 2 5、C D 3 6、C D 5 9 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、C D 2 5、C D 6、C D 5 9 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 5 】

実施形態 H 8 8 . C D 3 5 2 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、C D 3 5 2 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 6 】

実施形態 H 8 9 . N K p 8 0 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、N K p 8 0 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 7 】

実施形態 H 9 0 . D N A M - 1 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、D N A M - 1 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 8 】

実施形態 H 9 1 . 2 B 4 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、2 B 4 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 8 9 】

実施形態 H 9 2 . N K p 3 0 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、N K p 3 0 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 9 0 】

実施形態 H 9 3 . N K p 4 4 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、N K p 4 4 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 9 1 】

実施形態 H 9 4 . N K p 4 6 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、N K p 4 6 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 9 2 】

実施形態 H 9 5 . N K G 2 D 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、N K G 2 D に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【 2 1 9 3 】

実施形態 H 9 6 . K I R 2 D S 1 受容体の活性化をもたらす 1 つ以上の N K 細胞活性化物質のうちの少なくとも 1 つが、K I R 2 D S 1 に特異的に結合するアゴニスト抗体であ

10

20

30

40

50

る、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【2194】

実施形態 H 9 7 . K I R 2 D S 2 / 3 受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、K I R 2 D S 2 / 3 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【2195】

実施形態 H 9 8 . K I R 2 D L 4 受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、K I R 2 D L 4 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【2196】

実施形態 H 9 9 . K I R 2 D S 4 受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、K I R 2 D S 4 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【2197】

実施形態 H 1 0 0 . K I R 2 D S 5 受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、K I R 2 D S 5 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【2198】

実施形態 H 1 0 1 . K I R 3 D S 1 受容体の活性化をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、K I R 3 D S 1 に特異的に結合するアゴニスト抗体である、実施形態 H 7 8 に記載の方法。

【2199】

実施形態 H 1 0 2 . 1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、P D - 1、T G F - β 受容体、T I G I T、C D 1、T I M - 3、S i g l e c - 7、I R P 6 0、T a c t i l e、I L 1 R 8、N K G 2 A / K L R D 1、K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2 / 3、K I R 2 D L 5、K I R 3 D L 1、K I R 3 D L 2、I L T 2 / L I R - 1、および L A G - 2 のうちの1つ以上の活性化の減少をもたらす、実施形態 H 1 ~ H 1 9、H 3 5 ~ H 4 2、H 4 4 ~ H 6 2、および H 6 4 ~ H 1 0 1 のいずれか1つに記載の方法。

【2200】

実施形態 H 1 0 3 . P D - 1 の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、P D - 1 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性 P D - 1、可溶性 P D - L 1、または P D - L 1 に特異的に結合する抗体である、実施形態 H 1 0 2 に記載の方法。

【2201】

実施形態 H 1 0 4 . T G F - β 受容体の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、可溶性 T G F - β 受容体、T G F - β に特異的に結合する抗体、または T G F - β 受容体に特異的に結合するアンタゴニスト抗体である、実施形態 H 1 0 2 に記載の方法。

【2202】

実施形態 H 1 0 5 . T I G I T の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、T I G I T に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性 T I G I T、または T I G I T のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態 H 1 0 2 に記載の方法。

【2203】

実施形態 H 1 0 6 . C D 1 の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、C D 1 に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性 C D 1、または C D 1 のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態 H 1 0 2 に記載の方法。

【2204】

10

20

30

40

50

実施形態H107. TIM-3の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、TIM-3に特異的に結合するアンタゴニスト抗体、可溶性TIM-3、またはTIM-3のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2205】

実施形態H108. Siglec-7の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、Siglec-7に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはSiglec-7のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2206】

実施形態H109. IRP60の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、IRP60に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはIRP60のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2207】

実施形態H110. Tactileの活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、Tactileに特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはTactileのリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2208】

実施形態H111. IL1R8の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、IL1R8に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはIL1R8のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2209】

実施形態H112. NKG2A/KLRD1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、NKG2A/KLRD1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはNKG2A/KLRD1のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2210】

実施形態H113. KIR2DL1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、KIR2DL1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはKIR2DL1のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2211】

実施形態H114. KIR2DL2/3の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、KIR2DL2/3に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはKIR2DL2/3のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2212】

実施形態H115. KIR2DL5の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、KIR2DL5に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはKIR2DL5のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2213】

実施形態H116. KIR3DL1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、KIR3DL1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはKIR3DL1のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H102に記載の方法。

【2214】

実施形態H117. KIR3DL2の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、KIR3DL2に特異的に結合するアンタゴニスト抗

10

20

30

40

50

体またはK I R 3 D L 2のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H 1 0 2に記載の方法。

【2 2 1 5】

実施形態H 1 1 8．I L T 2／L I R－1の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、I L T 2／L I R－1に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはI L T 2／L I R－1のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H 1 0 2に記載の方法。

【2 2 1 6】

実施形態H 1 1 9．L A G－2の活性化の減少をもたらす1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、L A G－2に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはL A G－2のリガンドに特異的に結合する抗体である、実施形態H 1 0 2に記載の方法。

【2 2 1 7】

実施形態H 1 2 0．1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、
（i）第1の標的結合ドメイン、
（i i）可溶性組織因子ドメイン、および
（i i i）第2の標的結合ドメイン
を含む一本鎖キメラポリペプチドである、実施形態H 1～H 1 9、H 3 5～H 4 2、H 4 4～H 6 2、およびH 6 4～H 7 7のいずれか1つに記載の方法。

【2 2 1 8】

実施形態H 1 2 1．第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態H 1 2 0に記載の方法。

【2 2 1 9】

実施形態H 1 2 2．一本鎖キメラポリペプチドが、第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H 1 2 0に記載の方法。

【2 2 2 0】

実施形態H 1 2 3．可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態H 1 2 0～H 1 2 2のいずれか1つに記載の方法。

【2 2 2 1】

実施形態H 1 2 4．一本鎖キメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H 1 2 0～H 1 2 2のいずれか1つに記載の方法。

【2 2 2 2】

実施形態H 1 2 5．第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態H 1 2 0に記載の方法。

【2 2 2 3】

実施形態H 1 2 6．一本鎖キメラポリペプチドが、第1の標的結合ドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H 1 2 0に記載の方法。

【2 2 2 4】

実施形態H 1 2 7．第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、互いに直接隣接している、実施形態H 1 2 5またはH 1 2 6に記載の方法。

【2 2 2 5】

実施形態H 1 2 8．一本鎖キメラポリペプチドが、第2の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H 1 2 5またはH 1 2 6に記載の方法。

【2 2 2 6】

実施形態H 1 2 9．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態H 1 2 0～H 1 2 8のいずれか1つに記載の方法。

【2 2 2 7】

実施形態H 1 3 0．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態H 1 2 9に記載の方法。

10

20

30

40

50

【2228】

実施形態H131. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、実施形態H130に記載の方法。

【2229】

実施形態H132. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態H120～H128のいずれか1つに記載の方法。

【2230】

実施形態H133. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、抗原結合ドメインである、実施形態H120～H132のいずれか1つに記載の方法。

【2231】

実施形態H134. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態H133に記載の方法。

【2232】

実施形態H135. 抗原結合ドメインが、s c F v または単一ドメイン抗体を含む、実施形態H134に記載の方法。

【2233】

実施形態H136. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIリガンド、DNAM-1リガンド、NKp46リガンド、NKp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、s c MHC I リガンド、s c MHC II リガンド、s c TCR リガンド、PDGF-DD受容体、幹細胞因子 (SCF) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド (FLT3L) 受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体からなる群から選択される標的に結合する、実施形態H120～H135のいずれか1つに記載の方法。

【2234】

実施形態H137. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態H120～H128のいずれか1つに記載の方法。

【2235】

実施形態H138. 可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFからなる群から選択される、実施形態H137に記載の方法。

【2236】

実施形態H139. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態H120～H128のいずれか1つに記載の方法。

【2237】

実施形態H140. インターロイキンまたはサイトカイン受容体が、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RII、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である、実施形態H139に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 2 2 3 8 】

実施形態 H 1 4 1 . 可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態 H 1 2 0 ~ H 1 4 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 2 3 9 】

実施形態 H 1 4 2 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 8 0 % 同一の配列を含む、実施形態 H 1 4 1 に記載の方法。

【 2 2 4 0 】

実施形態 H 1 4 3 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 0 % 同一の配列を含む、実施形態 H 1 4 2 に記載の方法。

【 2 2 4 1 】

実施形態 H 1 4 4 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、実施形態 H 1 4 3 に記載の方法。

【 2 2 4 2 】

実施形態 H 1 4 5 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 4 0 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上を含まない、実施形態 H 1 4 1 ~ H 1 4 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 2 4 3 】

実施形態 H 1 4 6 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 0 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 2 2 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 4 5 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 5 8 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 9 4 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 3 5 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 1 4 0 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 H 1 4 5 に記載の方法。

【 2 2 4 4 】

実施形態 H 1 4 7 . 可溶性組織因子ドメインが、第 V I I a 因子に結合することができない、実施形態 H 1 2 0 ~ H 1 4 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 2 4 5 】

実施形態 H 1 4 8 . 可溶性組織因子ドメインが、不活性第 X 因子を第 X a 因子に変換し

10

20

30

40

50

ない、実施形態 H 1 2 0 ～ H 1 4 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 2 4 6 】

実施形態 H 1 4 9 . 一本鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態 H 1 2 0 ～ H 1 4 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 2 4 7 】

実施形態 H 1 5 0 . 一本鎖キメラポリペプチドが、その N 末端および／または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 H 1 2 0 ～ H 1 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 2 4 8 】

実施形態 H 1 5 1 . 一本鎖キメラポリペプチドが、その N 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態 H 1 5 0 に記載の方法。

10

【 2 2 4 9 】

実施形態 H 1 5 2 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインが、第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態 H 1 5 1 に記載の方法。

【 2 2 5 0 】

実施形態 H 1 5 3 . 一本鎖キメラポリペプチドが、少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインのうちの 1 つと第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 1 5 2 に記載の方法。

【 2 2 5 1 】

実施形態 H 1 5 4 . 一本鎖キメラポリペプチドが、その C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態 H 1 5 0 に記載の方法。

20

【 2 2 5 2 】

実施形態 H 1 5 5 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの 1 つが、第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態 H 1 5 4 に記載の方法。

【 2 2 5 3 】

実施形態 H 1 5 6 . 一本鎖キメラポリペプチドが、少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインのうちの 1 つと第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 1 5 4 に記載の方法。

30

【 2 2 5 4 】

実施形態 H 1 5 7 . 一本鎖キメラポリペプチドが、その N 末端および C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインを含む、実施形態 H 1 5 0 に記載の方法。

【 2 2 5 5 】

実施形態 H 1 5 8 . N 末端における 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの 1 つが、第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態 H 1 5 7 に記載の方法。

【 2 2 5 6 】

実施形態 H 1 5 9 . 一本鎖キメラポリペプチドが、N 末端における 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの 1 つと第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 1 5 7 に記載の方法。

40

【 2 2 5 7 】

実施形態 H 1 6 0 . C 末端における 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの 1 つが、第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインに直接隣接している、実施形態 H 1 5 7 に記載の方法。

【 2 2 5 8 】

実施形態 H 1 6 1 . 一本鎖キメラポリペプチドが、C 末端における 1 つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの 1 つと第 1 の標的結合ドメイン、第 2 の標的結合ドメイン、または可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 1 5 7 に記載

50

の方法。

【2259】

実施形態H162. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態H150～H161のいずれか1つに記載の方法。

【2260】

実施形態H163. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態H162に記載の方法。

【2261】

実施形態H164. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態H163に記載の方法。

【2262】

実施形態H165. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態H162に記載の方法。

【2263】

実施形態H166. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態H165に記載の方法。

【2264】

実施形態H167. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じアミノ酸配列を含む、実施形態H166に記載の方法。

【2265】

実施形態H168. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態H150～H161のいずれか1つに記載の方法。

【2266】

実施形態H169. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、抗原結合ドメインである、実施形態H150～H168のいずれか1つに記載の方法。

【2267】

実施形態H170. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態H169に記載の方法。

【2268】

実施形態H171. 抗原結合ドメインが、scFvまたは単一ドメイン抗体を含む、実施形態H170に記載の方法。

【2269】

実施形態H172. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR- α 、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIリガ

10

20

30

40

50

ンド、DNAM-1リガンド、NKp46リガンド、NKp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHCIリガンド、scMHCIIRリガンド、scTCRリガンド、PDGFR- α 受容体、幹細胞因子（SCF）受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド（FLT3L）受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態H150～H171のいずれか1つに記載の方法。

【2270】

実施形態H173．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態H150～H161のいずれか1つに記載の方法。

10

【2271】

実施形態H174．可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR- α 、およびSCFからなる群から選択される、実施形態H173に記載の方法。

【2272】

実施形態H175．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態H150～H161のいずれか1つに記載の方法。

20

【2273】

実施形態H176．可溶性受容体が、可溶性TGF- β 受容体II（TGF- β RII）、可溶性TGF- β RIII、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である、実施形態H175に記載の方法。

【2274】

実施形態H177．1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、多鎖キメラポリペプチドであり、多鎖キメラポリペプチドが、

(c) 第1のキメラポリペプチドであって、

(i) 第1の標的結合ドメイン、

(ii) 可溶性組織因子ドメイン、および

(iii) 一对の親和性ドメインの第1のドメイン

を含む、第1のキメラポリペプチドと、

(d) 第2のキメラポリペプチドであって、

(i) 一对の親和性ドメインの第2のドメイン、および

(ii) 第2の標的結合ドメイン

を含む、第2のキメラポリペプチドと

を含み、

第1のキメラポリペプチドと第2のキメラポリペプチドが、一对の親和性ドメインの第1のドメインと第2のドメインとの結合を介して会合している、多鎖キメラポリペプチドである、実施形態H1～H19、H35～H42、H44～H62、およびH64～H77のいずれか1つに記載の方法。

30

40

【2275】

実施形態H178．第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインが、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態H177に記載の方法。

【2276】

実施形態H179．第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインと可溶性組織因子ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H177に記載の方法。

【2277】

実施形態H180．可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメイン

50

が、第1のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態H177～H179のいずれか1つに記載の方法。

【2278】

実施形態H181．第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H177～H179のいずれか1つに記載の方法。

【2279】

実施形態H182．一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインが、第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態H177～H181のいずれか1つに記載の方法。

【2280】

実施形態H183．第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H177～H181のいずれか1つに記載の方法。

【2281】

実施形態H184．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態H177～H183のいずれか1つに記載の方法。

【2282】

実施形態H185．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態H184に記載の方法。

【2283】

実施形態H186．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、実施形態H185に記載の方法。

【2284】

実施形態H187．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態H177～H183のいずれか1つに記載の方法。

【2285】

実施形態H188．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、抗原結合ドメインである、実施形態H177～H187のいずれか1つに記載の方法。

【2286】

実施形態H189．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態H188に記載の方法。

【2287】

実施形態H190．抗原結合ドメインが、scFvまたは単一ドメイン抗体を含む、実施形態H188またはH189に記載の方法。

【2288】

実施形態H191．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIRIリガンド、DNAM-1リガンド、Nkp46リガンド、Nkp44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHCIIリガンド、scMHCIIIRIリガンド、scTCRリガンド、PDGF-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD1

10

20

30

40

50

55 受容体、およびCD122受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態H177～H190のいずれか1つに記載の方法。

【2289】

実施形態H192. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態H177～H183のいずれか1つに記載の方法。

【2290】

実施形態H193. 可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、およびSCFからなる群から選択される、実施形態H192に記載の方法。

10

【2291】

実施形態H194. 第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態H177～H183のいずれか1つに記載の方法。

【2292】

実施形態H195. 可溶性受容体が、可溶性TGF-β受容体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性TNFα受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である、実施形態H194に記載の方法。

【2293】

実施形態H196. 第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含み、1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、可溶性組織因子ドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間に位置付けられている、実施形態H177～H195のいずれか1つに記載の方法。

20

【2294】

実施形態H197. 第1のキメラポリペプチドが、可溶性組織因子ドメインと1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つとの間にリンカー配列、および／または1つ以上の追加の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H196に記載の方法。

【2295】

実施形態H198. 第1のキメラポリペプチドが、第1のキメラポリペプチドのN末端および／またはC末端に1つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態H177～H195のいずれか1つに記載の方法。

30

【2296】

実施形態H199. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の一对の親和性ドメインの第1のドメインに直接隣接している、実施形態H198に記載の方法。

【2297】

実施形態H200. 第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H198に記載の方法。

40

【2298】

実施形態H201. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第1のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態H198に記載の方法。

【2299】

実施形態H202. 第1のキメラポリペプチドが、1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと第1の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H198に記載の方法。

【2300】

50

実施形態 H 2 0 3 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチドの N 末端および／または C 末端に配置されており、1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 1 のキメラポリペプチド内の可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられている、実施形態 H 1 9 8 に記載の方法。

【 2 3 0 1 】

実施形態 H 2 0 4 . N 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 H 2 0 3 に記載の方法。

【 2 3 0 2 】

実施形態 H 2 0 5 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 2 0 3 に記載の方法。

【 2 3 0 3 】

実施形態 H 2 0 6 . C 末端に配置された 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインが、第 1 のキメラポリペプチド内の第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 H 2 0 3 に記載の方法。

【 2 3 0 4 】

実施形態 H 2 0 7 . 第 1 のキメラポリペプチドが、第 1 のキメラポリペプチド内の少なくとも 1 つの追加の標的結合ドメインと第 1 の標的結合ドメインまたは一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 2 0 3 に記載の方法。

【 2 3 0 5 】

実施形態 H 2 0 8 . 可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、可溶性組織因子ドメインおよび／または一対の親和性ドメインの第 1 のドメインに直接隣接している、実施形態 H 2 0 3 に記載の方法。

【 2 3 0 6 】

実施形態 H 2 0 9 . 第 1 のキメラポリペプチドが、(i) 可溶性組織因子ドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間、および／または (i i) 一対の親和性ドメインの第 1 のドメインと、可溶性組織因子ドメインと一対の親和性ドメインの第 1 のドメインとの間に位置付けられた 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つとの間に配置されたリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 2 0 3 に記載の方法。

【 2 3 0 7 】

実施形態 H 2 1 0 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチドの N 末端または C 末端に 1 つ以上の追加の標的結合ドメインをさらに含む、実施形態 H 1 7 7 ～ H 2 0 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 3 0 8 】

実施形態 H 2 1 1 . 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、第 2 のキメラポリペプチド内の一対の親和性ドメインの第 2 のドメインに直接隣接している、実施形態 H 2 1 0 に記載の方法。

【 2 3 0 9 】

実施形態 H 2 1 2 . 第 2 のキメラポリペプチドが、第 2 のキメラポリペプチド内の 1 つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも 1 つと一対の親和性ドメインの第 2 のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態 H 2 1 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【2310】

実施形態H213. 1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つが、第2のキメラポリペプチド内の第2の標的結合ドメインに直接隣接している、実施形態H210に記載の方法。

【2311】

実施形態H214. 第2のキメラポリペプチドが、第2のキメラポリペプチド内の1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの少なくとも1つと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H210に記載の方法。

【2312】

実施形態H215. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態H196～H214のいずれか1つに記載の方法。

10

【2313】

実施形態H216. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態H215に記載の方法。

【2314】

実施形態H217. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの2つ以上が、同じアミノ酸配列を含む、実施形態H216に記載の方法。

20

【2315】

実施形態H218. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態H215に記載の方法。

【2316】

実施形態H219. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態H218に記載の方法。

【2317】

実施形態H220. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、同じアミノ酸配列を含む、実施形態H219に記載の方法。

30

【2318】

実施形態H221. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態H196～H214のいずれか1つに記載の方法。

【2319】

実施形態H222. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、抗原結合ドメインである、実施形態H196～H221のいずれか1つに記載の方法。

40

【2320】

実施形態H223. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態H222に記載の方法。

【2321】

実施形態H224. 抗原結合ドメインが、s c F vを含む、実施形態H223に記載の方法。

【2322】

実施形態H225. 第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、CD16a、CD33、CD20、CD19

50

、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-カドヘリン、CEACAM5、UL16結合タンパク質、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGFR-DD、TGF- β 受容体II (TGF- β RII) リガンド、TGF- β RIIリガンド、DNAM-1リガンド、NKP46リガンド、NKP44リガンド、NKG2Dリガンド、NKP30リガンド、scMHC Iリガンド、scMHC IIリガンド、scTCRリガンド、PDGFR-DD受容体、幹細胞因子(SCF)受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)受容体、MICA受容体、MICB受容体、ULP16結合タンパク質受容体、CD155受容体、およびCD122受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態H196~H224のいずれか1つに記載の方法。

10

【2323】

実施形態H226．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態H196~H214のいずれか1つに記載の方法。

【2324】

実施形態H227．可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGFR-DD、およびSCFからなる群から選択される、実施形態H226に記載の方法。

20

【2325】

実施形態H228．第1の標的結合ドメイン、第2の標的結合ドメイン、および1つ以上の追加の標的結合ドメインのうちの1つ以上が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態H196~H214のいずれか1つに記載の方法。

【2326】

実施形態H229．可溶性受容体が、可溶性TGF- β 受容体II (TGF- β RII)、可溶性TGF- β RII、可溶性TNF α 受容体、可溶性IL-4受容体、または可溶性IL-10受容体である、実施形態H228に記載の方法。

30

【2327】

実施形態H230．可溶性組織因子ドメインが、可溶性ヒト組織因子ドメインである、実施形態H196~H229のいずれか1つに記載の方法。

【2328】

実施形態H231．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号93と少なくとも80%同一の配列を含む、実施形態H230に記載の方法。

【2329】

実施形態H232．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号93と少なくとも90%同一の配列を含む、実施形態H231に記載の方法。

40

【2330】

実施形態H233．可溶性ヒト組織因子ドメインが、配列番号93と少なくとも95%同一の配列を含む、実施形態H232に記載の方法。

【2331】

実施形態H234．可溶性ヒト組織因子ドメインが、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸20位に対応するアミノ酸の位置にリジン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸22位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、
成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸45位に対応するアミノ酸の位置にトリ

50

プトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちの 1 つ以上を含まない、実施形態 H 230 ~ H 233 のいずれか 1 つに記載の方法。

【2332】

実施形態 H 235 . 可溶性ヒト組織因子ドメインが、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 20 位に対応するアミノ酸の位置にリジン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 22 位に対応するアミノ酸の位置にイソロイシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 45 位に対応するアミノ酸の位置にトリプトファン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 58 位に対応するアミノ酸の位置にアスパラギン酸、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 94 位に対応するアミノ酸の位置にチロシン、

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 135 位に対応するアミノ酸の位置にアルギニン、および

成熟野生型ヒト組織因子タンパク質のアミノ酸 140 位に対応するアミノ酸の位置にフェニルアラニンのうちのいずれも含まない、実施形態 H 234 に記載の方法。

【2333】

実施形態 H 236 . 可溶性組織因子ドメインが、第 V I I a 因子に結合することができない、実施形態 H 196 ~ H 235 のいずれか 1 つに記載の方法。

【2334】

実施形態 H 237 . 可溶性組織因子ドメインが、不活性第 X 因子を第 X a 因子に変換しない、実施形態 H 196 ~ H 236 のいずれか 1 つに記載の方法。

【2335】

実施形態 H 238 . 多鎖キメラポリペプチドが、哺乳動物における血液凝固を刺激しない、実施形態 H 196 ~ H 237 のいずれか 1 つに記載の方法。

【2336】

実施形態 H 239 . 一対の親和性ドメインが、ヒト I L - 15 受容体アルファ鎖 (I L - 15 R α) 由来の s u s h i ドメインと可溶性 I L - 15 である、実施形態 H 196 ~ H 238 のいずれか 1 つに記載の方法。

【2337】

実施形態 H 240 . 可溶性 I L - 15 が、D 8 N または D 8 A アミノ酸置換を有する、実施形態 H 239 に記載の方法。

【2338】

実施形態 H 241 . ヒト I L - 15 R α が、成熟全長 I L - 15 R α である、実施形態 H 239 または H 240 に記載の方法。

【2339】

実施形態 H 242 . 一対の親和性ドメインが、バルナーゼとバルンスター、P K A と A K A P、変異 R N a s e I 断片に基づくアダプター／ドッキングタグモジュール、ならびにタンパク質シンタキシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、および S N A P 25 の相互作用に基づく S N A R E モジュールからなる群から選択される、実施形態 H 19

10

20

30

40

50

6～H 2 3 8のいずれか1つに記載の方法。

【2 3 4 0】

実施形態H 2 4 3．1つ以上のNK細胞活性化物質のうちの少なくとも1つが、多鎖キメラポリペプチドであり、多鎖キメラポリペプチドが、

(a) 第1および第2のキメラポリペプチドであって、各々が、

(i) 第1の標的結合ドメイン、

(ii) Fcドメイン、および

(iii) 一对の親和性ドメインの第1のドメイン

を含む、第1および第2のキメラポリペプチドと、

(b) 第3および第4のキメラポリペプチドであって、各々が、

(i) 一对の親和性ドメインの第2のドメイン、および

(ii) 第2の標的結合ドメイン

を含む、第3および第4キメラポリペプチドと

を含み、

第1および第2のキメラポリペプチドと第3および第4のキメラポリペプチドが、一对の親和性ドメインの第1のドメインと第2のドメインとの結合を介して会合しており、かつ第1および第2のキメラポリペプチドが、それらのFcドメインを介して会合している、実施形態H 1～H 1 9、H 3 5～H 4 2、H 4 4～H 6 2、およびH 6 4～H 7 7のいずれか1つに記載の方法。

【2 3 4 1】

実施形態H 2 4 4．第1の標的結合ドメインとFcドメインが、第1および第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態H 2 4 3に記載の方法。

【2 3 4 2】

実施形態H 2 4 5．第1および第2のキメラポリペプチドが、第1および第2のキメラポリペプチド内の第1の標的結合ドメインとFcドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H 2 4 3に記載の方法。

【2 3 4 3】

実施形態H 2 4 6．Fcドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインが、第1および第2のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態H 2 4 3～H 2 4 5のいずれか1つに記載の方法。

【2 3 4 4】

実施形態H 2 4 7．第1のキメラポリペプチドが、第1および第2のキメラポリペプチド内のFcドメインと一对の親和性ドメインの第1のドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H 2 4 3～H 2 4 5のいずれか1つに記載の方法。

【2 3 4 5】

実施形態H 2 4 8．一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインが、第3および第4のキメラポリペプチド内で互いに直接隣接している、実施形態H 2 4 3～H 2 4 7のいずれか1つに記載の方法。

【2 3 4 6】

実施形態H 2 4 9．第3および第4のキメラポリペプチドが、第3および第4のキメラポリペプチド内的一对の親和性ドメインの第2のドメインと第2の標的結合ドメインとの間にリンカー配列をさらに含む、実施形態H 2 4 3～H 2 4 7のいずれか1つに記載の方法。

【2 3 4 7】

実施形態H 2 5 0．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じ抗原に特異的に結合する、実施形態H 2 4 3～H 2 4 9のいずれか1つに記載の方法。

【2 3 4 8】

実施形態H 2 5 1．第1の標的結合ドメインおよび第2の標的結合ドメインが、同じエピトープに特異的に結合する、実施形態H 2 5 0に記載の方法。

【2 3 4 9】

10

20

30

40

50

実施形態 H 2 5 2 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、実施形態 H 2 5 1 に記載の方法。

【 2 3 5 0 】

実施形態 H 2 5 3 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する、実施形態 H 2 4 3 ~ H 2 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 3 5 1 】

実施形態 H 2 5 4 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、抗原結合ドメインである、実施形態 H 2 4 3 ~ H 2 5 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 3 5 2 】

実施形態 H 2 5 5 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインが各々、抗原結合ドメインである、実施形態 H 2 5 4 に記載の方法。

【 2 3 5 3 】

実施形態 H 2 5 6 . 抗原結合ドメインが、s c F v または単ドメイン抗体を含む、実施形態 H 2 5 4 または H 2 5 5 に記載の方法。

【 2 3 5 4 】

実施形態 H 2 5 7 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、CD 1 6 a、CD 3 3、CD 2 0、CD 1 9、CD 2 2、CD 1 2 3、P D L - 1、T I G I T、P D - 1、T I M 3、C T L A 4、M I C A、M I C B、I L - 6、I L - 8、T N F α 、CD 2 6、CD 3 6、U L B P 2、CD 3 0、CD 2 0 0、I G F - 1 R、M U C 4 A C、M U C 5 A C、T r o p - 2、C M E T、E G F R、H E R 1、H E R 2、H E R 3、P S M A、C E A、B 7 H 3、E P C A M、B C M A、P - カドヘリン、C E A C A M 5、U L 1 6 結合タンパク質、H L A - D R、D L L 4、T Y R O 3、A X L、M E R、CD 1 2 2、CD 1 5 5、P D G F - D D、T G F - β 受容体 I I (T G F - β R I I) リガンド、T G F - β R I I I リガンド、D N A M - 1 リガンド、N K p 4 6 リガンド、N K p 4 4 リガンド、N K G 2 D リガンド、N K p 3 0 リガンド、s c M H C I リガンド、s c M H C I I リガンド、s c T C R リガンド、P D G F - D D 受容体、幹細胞因子 (S C F) 受容体、幹細胞様チロシンキナーゼ 3 リガンド (F L T 3 L) 受容体、M I C A 受容体、M I C B 受容体、U L P 1 6 結合タンパク質受容体、CD 1 5 5 受容体、および CD 1 2 2 受容体からなる群から選択される標的に特異的に結合する、実施形態 H 2 4 3 ~ H 2 5 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 3 5 5 】

実施形態 H 2 5 8 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質である、実施形態 H 2 4 3 ~ H 2 5 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 3 5 6 】

実施形態 H 2 5 9 . 可溶性インターロイキンまたはサイトカインタンパク質が、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 7、I L - 8、I L - 1 0、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 2 1、P D G F - D D、および S C F からなる群から選択される、実施形態 H 2 5 8 に記載の方法。

【 2 3 5 7 】

実施形態 H 2 6 0 . 第 1 の標的結合ドメインおよび第 2 の標的結合ドメインの一方または両方が、可溶性インターロイキンまたはサイトカイン受容体である、実施形態 H 2 4 3 ~ H 2 5 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 2 3 5 8 】

実施形態 H 2 6 1 . 可溶性受容体が、可溶性 T G F - β 受容体 I I (T G F - β R I I)、可溶性 T G F - β R I I I、可溶性 T N F α 受容体、可溶性 I L - 4 受容体、または可溶性 I L - 1 0 受容体である、実施形態 H 2 6 0 に記載の方法。

10

20

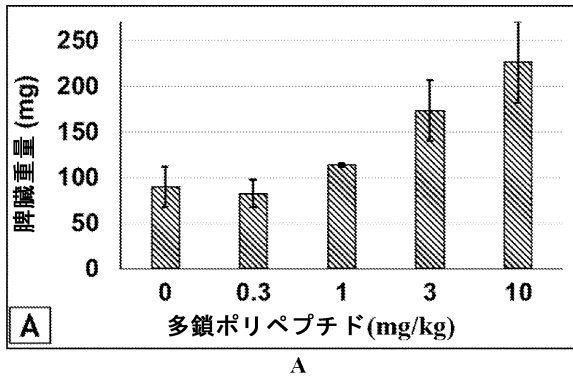
30

40

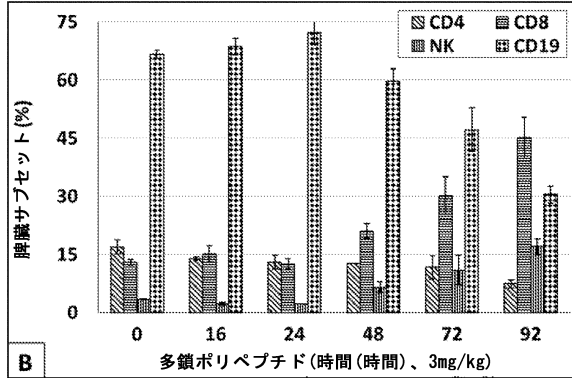
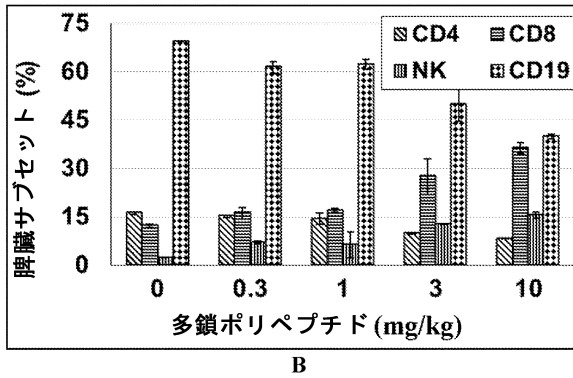
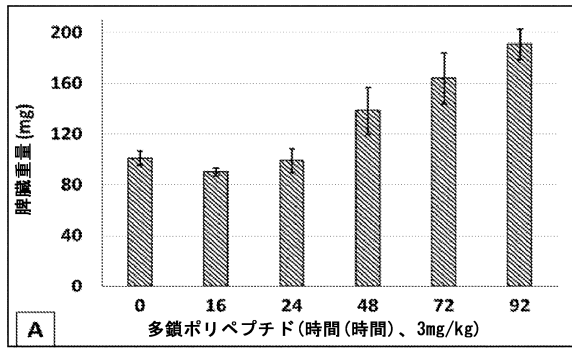
50

【図面】

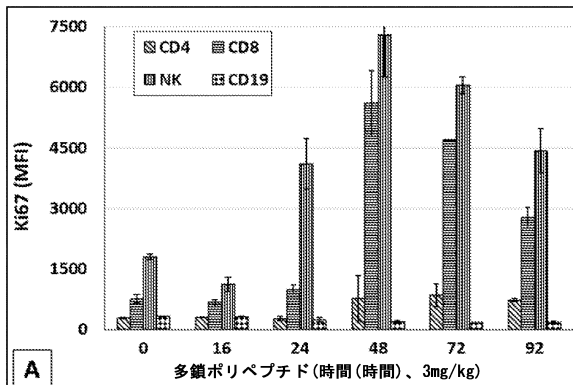
【図 1】



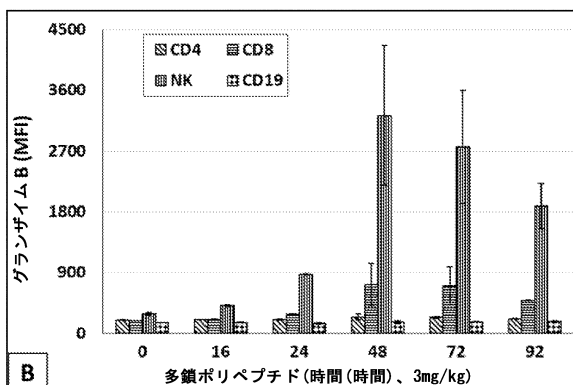
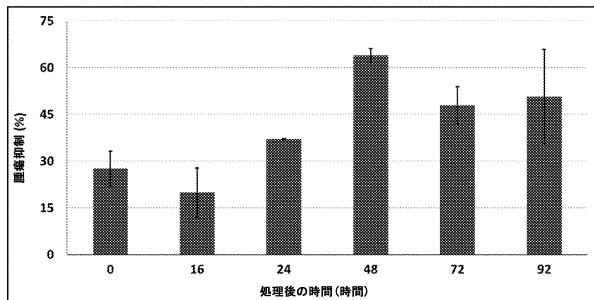
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

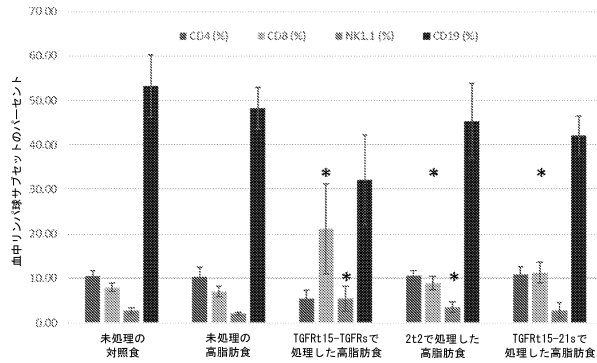
20

30

40

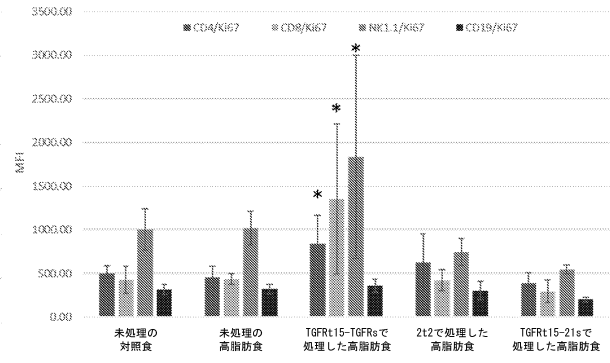
50

【図 5 A】



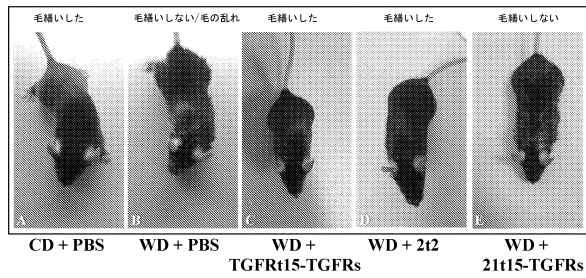
* 高脂肪食未処理群からは統計的に有意である

【図 5 B】

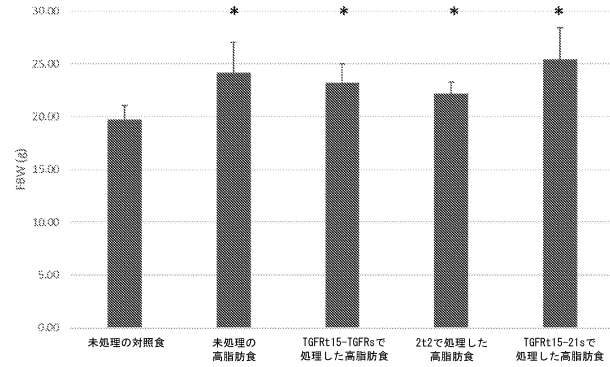


* 高脂肪食未処理群からは統計的に有意である

【図 6】



【図 7】



* 対照正常食群からは統計的に有意である

10

20

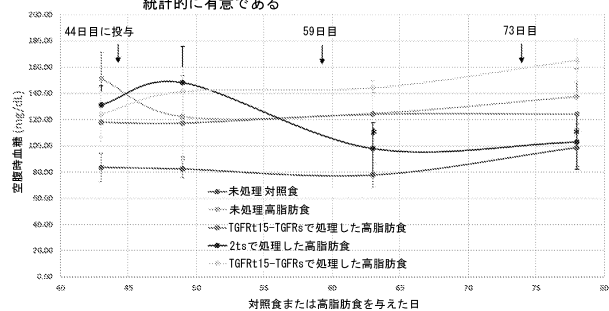
30

40

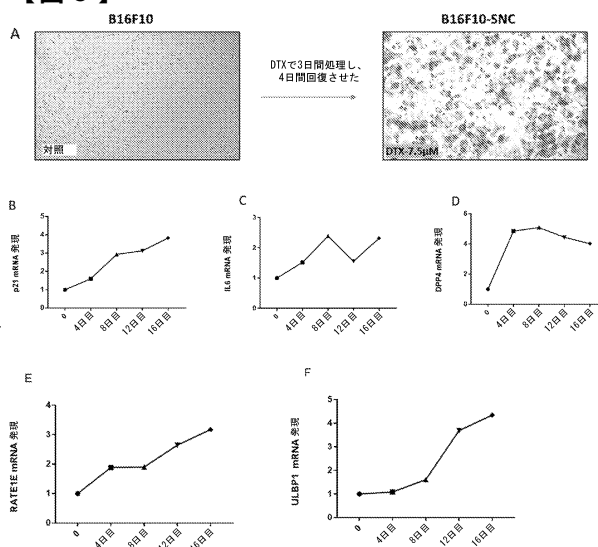
50

【圖 8】

* 高脂肪食未処理群および他の処理群からは統計的に有意である

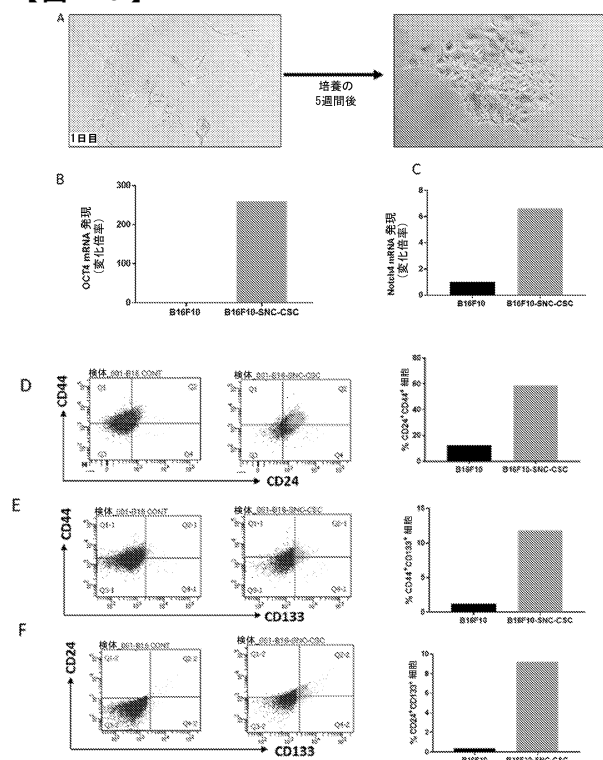


【圖 9】

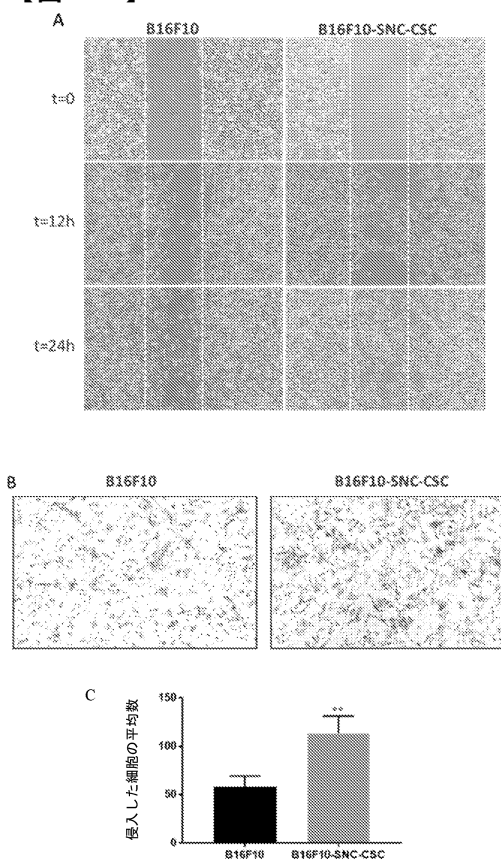


10

【図 10】



【図 1 1】



20

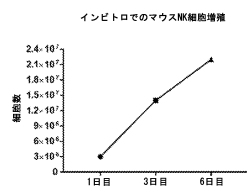
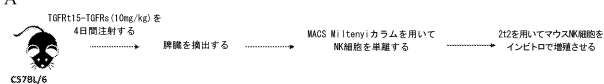
30

40

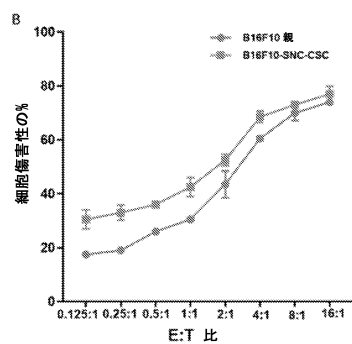
50

【図 12】

A



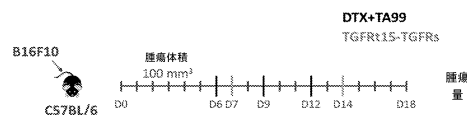
B



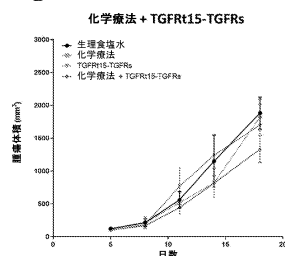
【図 13】

A

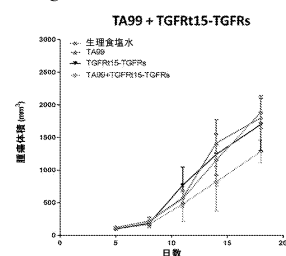
B16F10マウス腫瘍処理の概略図



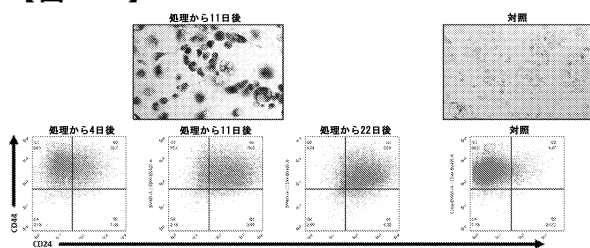
B



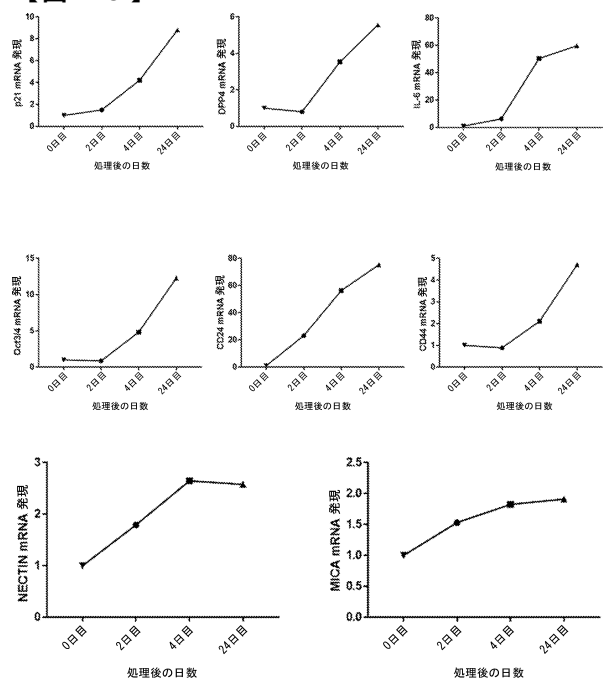
C



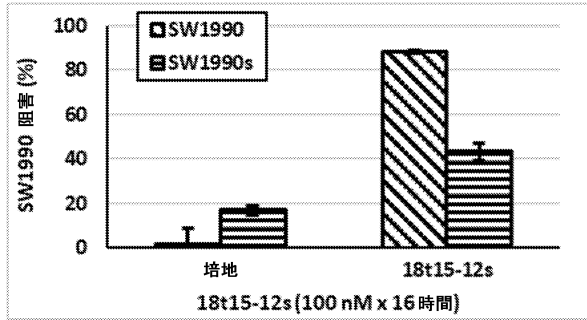
【図 14】



【図 15】



【図 16】



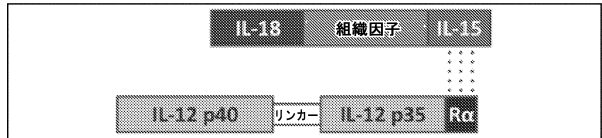
【図 17】



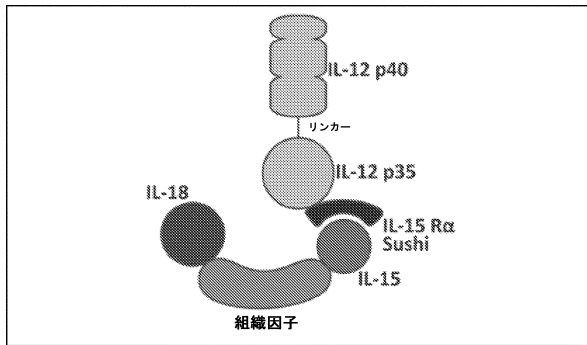
【図 18】



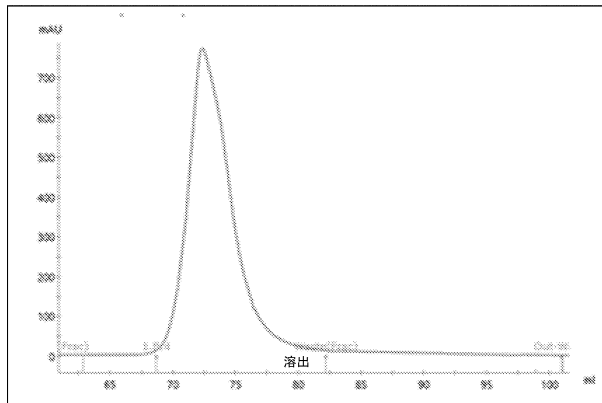
【図 19】



【図 20】



【図 21】



10

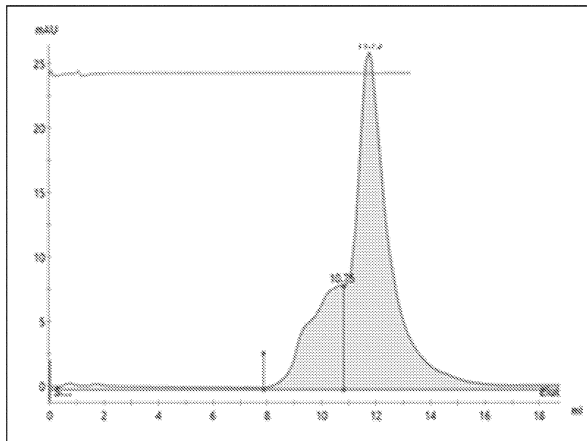
20

30

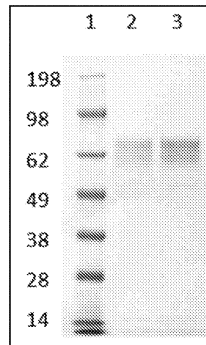
40

50

【図 2 2】

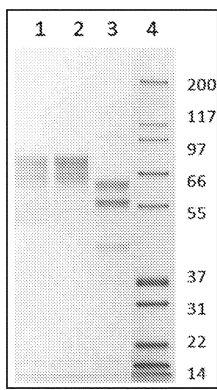


【図 2 3】

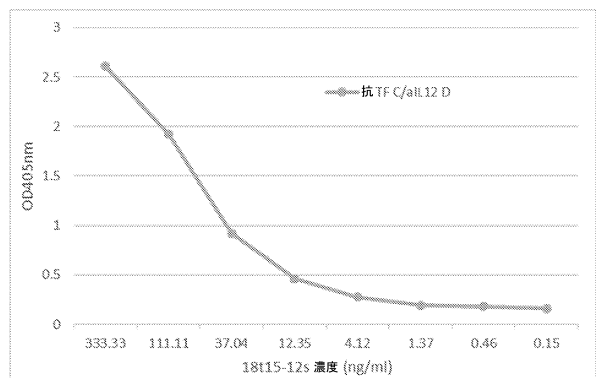


10

【図 2 4】

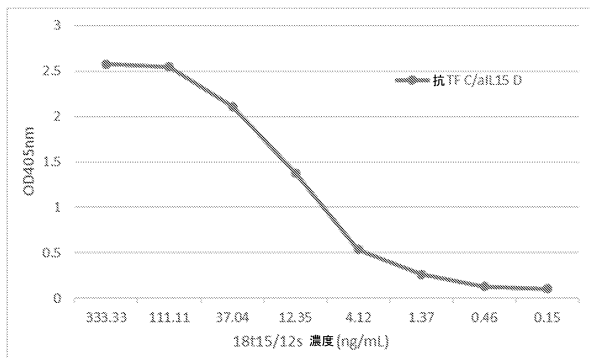


【図 2 5】

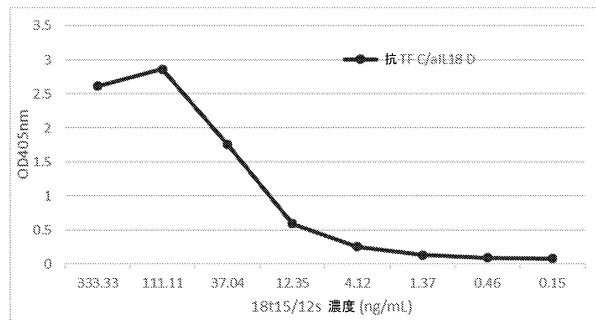


20

【図 2 6】



【図 2 7】

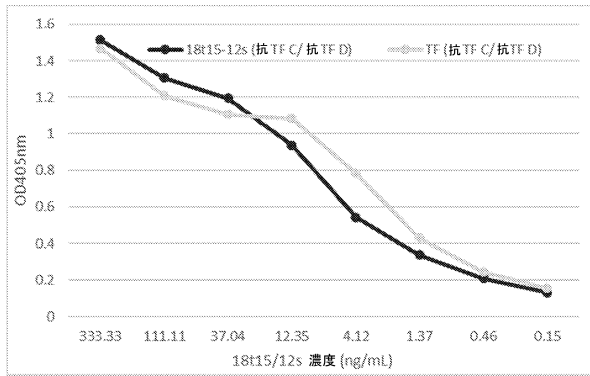


30

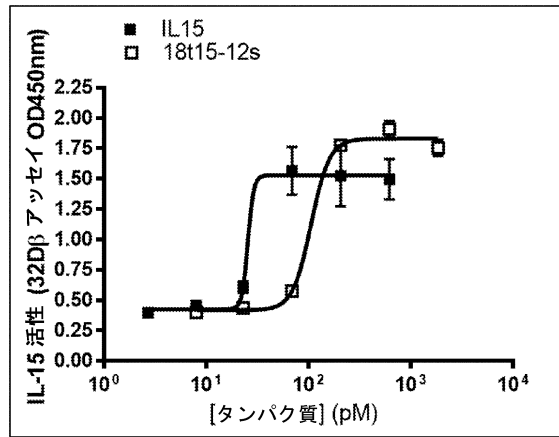
40

50

【図 28】

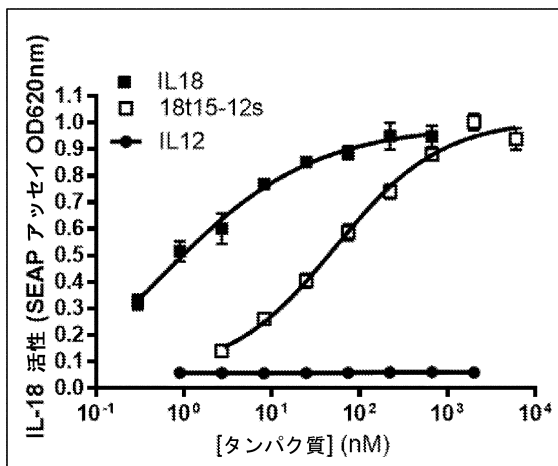


【図 29】

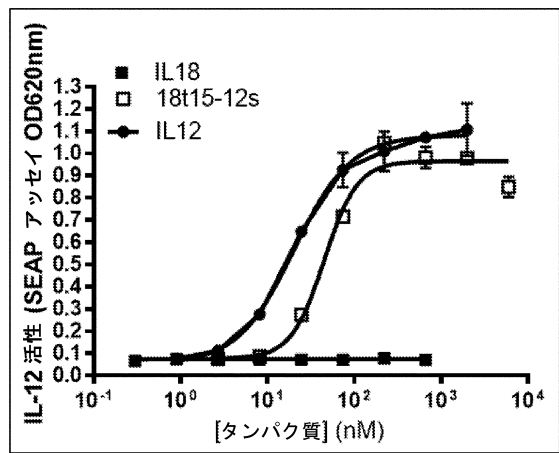


10

【図 30】



【図 31】



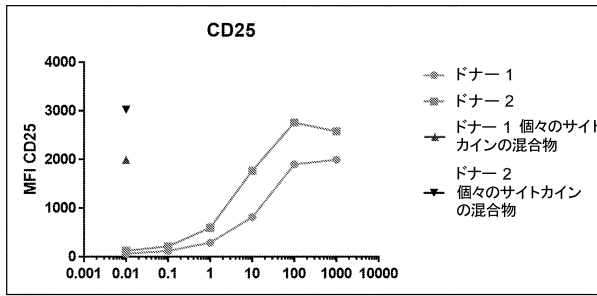
20

30

40

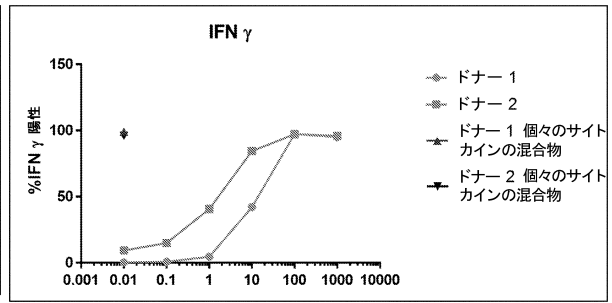
50

【図 3 2】

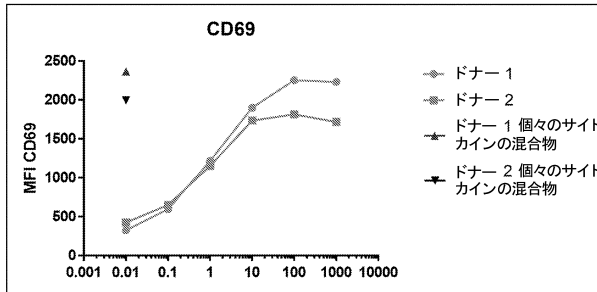


A

【図 3 3】



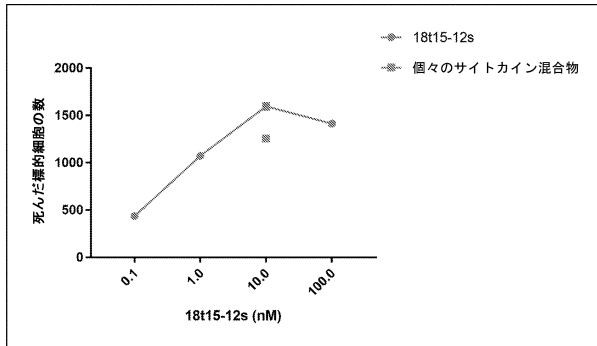
10



B

20

【図 3 4】



【図 3 5】



30

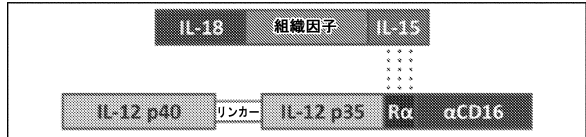
40

50

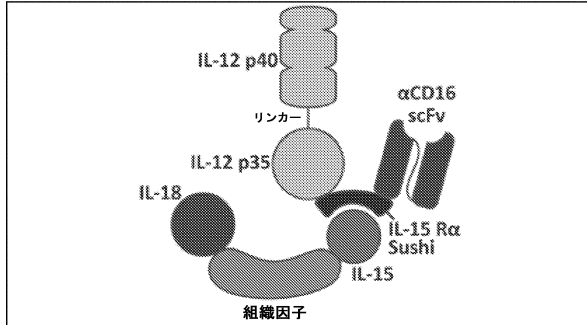
【図 3 6】



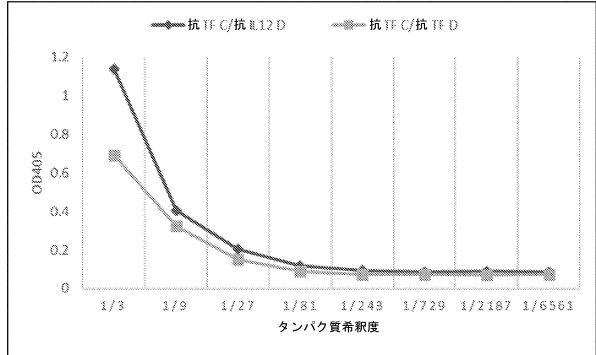
【図 3 7】



【図 3 8】



【図 3 9】



10

【図 4 0】

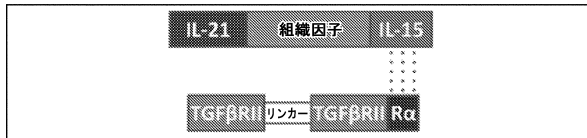


【図 4 1】

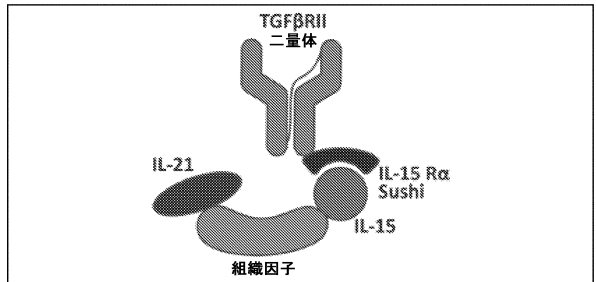


20

【図 4 2】



【図 4 3】

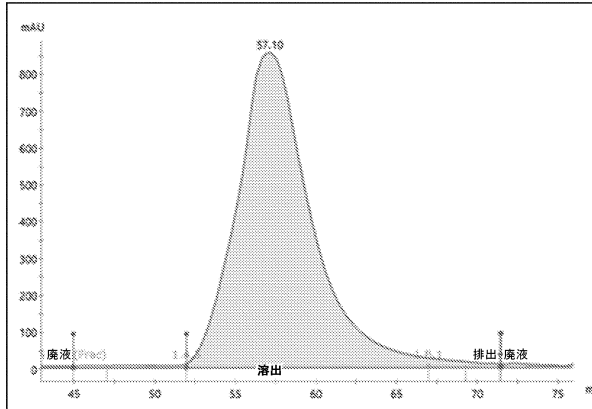


30

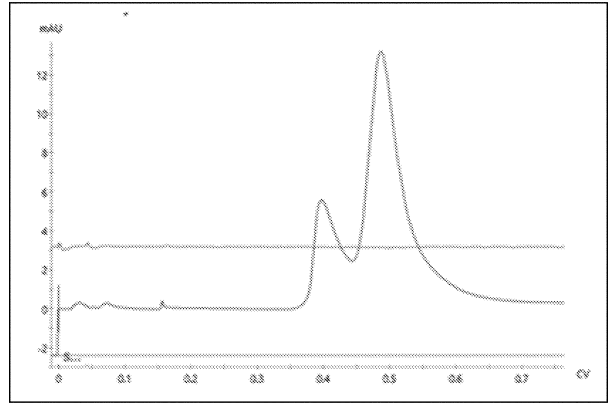
40

50

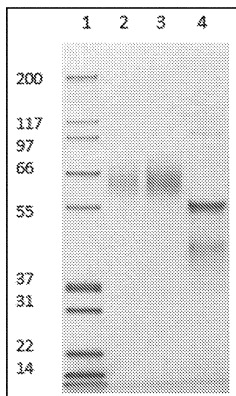
【図 4 4】



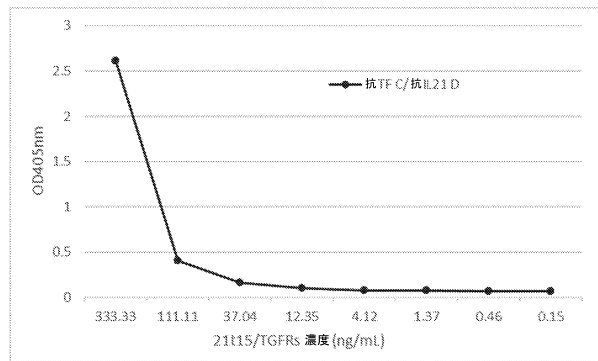
【図 4 5】



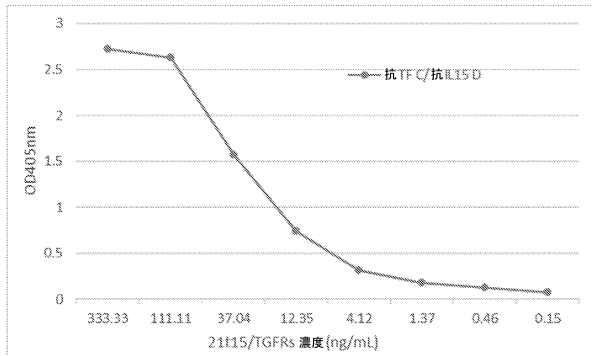
【図 4 6】



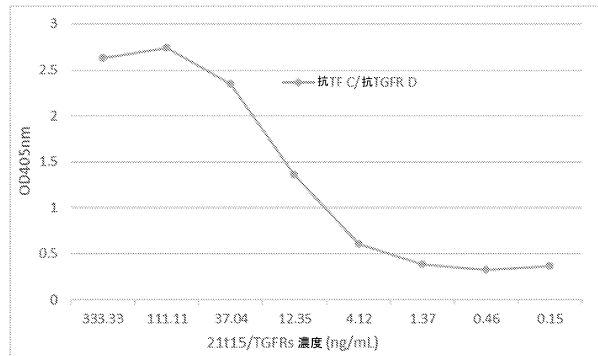
【図 4 7】



【図 4 8】



【図 4 9】



10

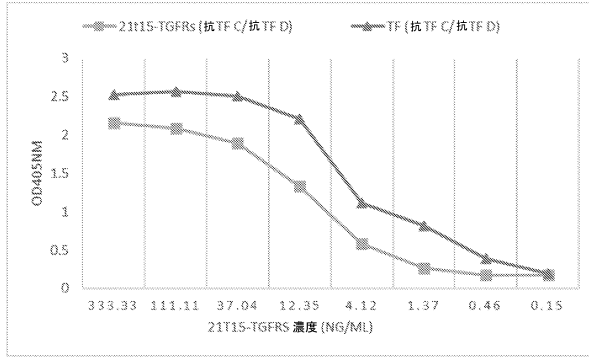
20

30

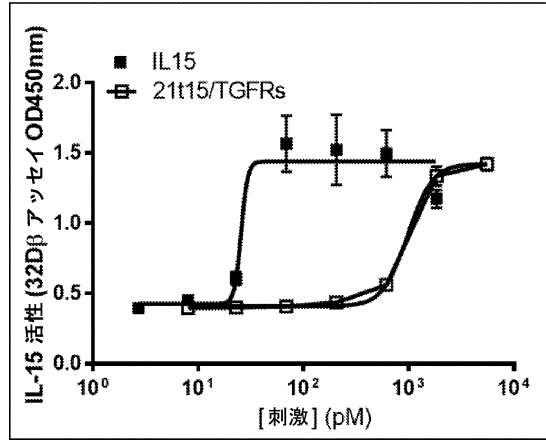
40

50

【図 5 0】

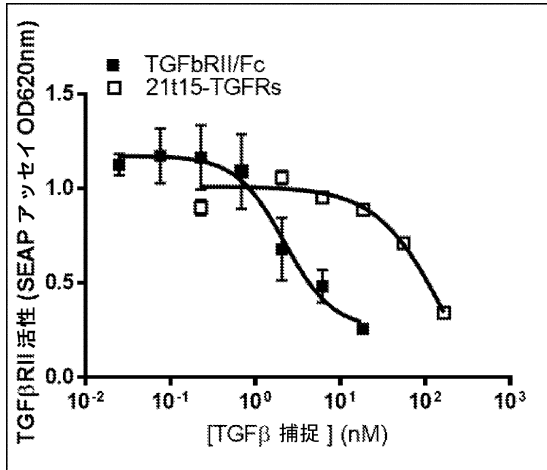


【図 5 1】

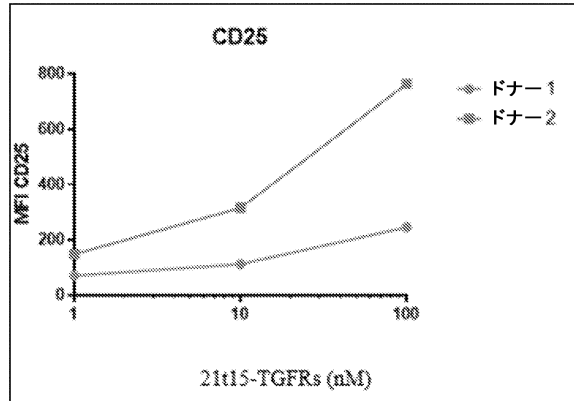


10

【図 5 2】



【図 5 3】



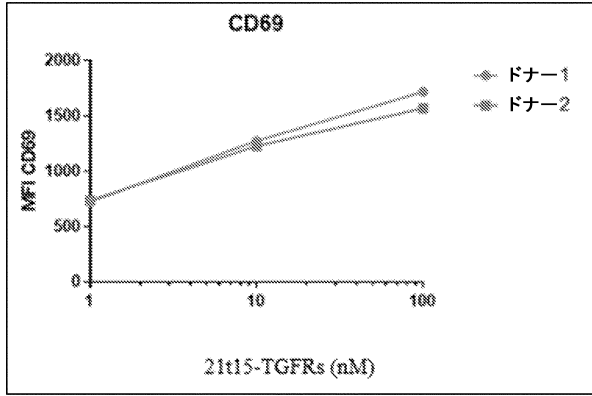
20

30

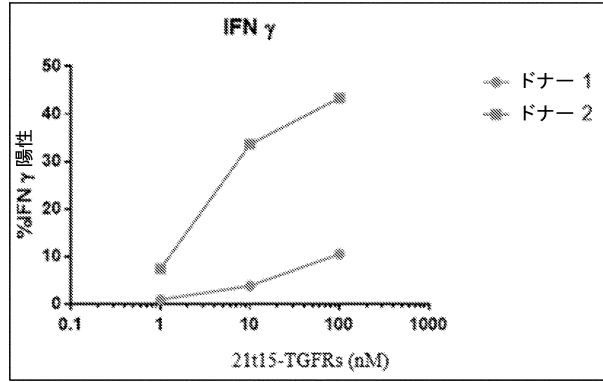
40

50

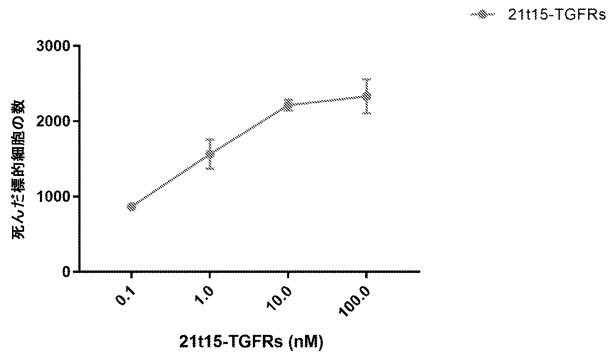
【図 5 4】



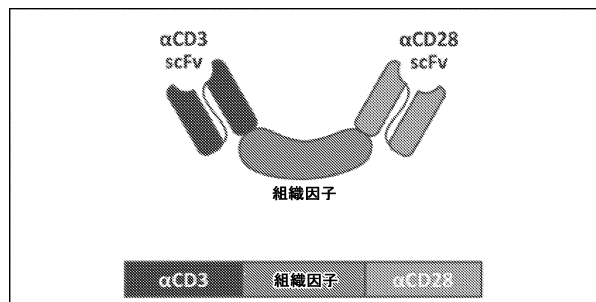
【図 5 5】



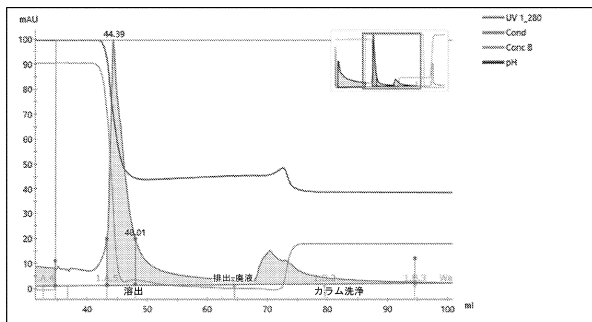
【図 5 6】



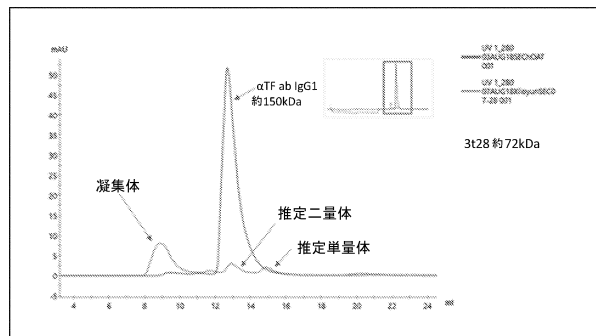
【図 5 7】



【図 5 8】



【図 5 9】



10

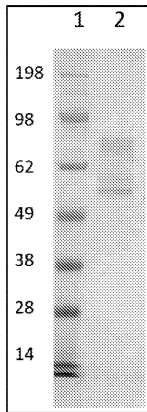
20

30

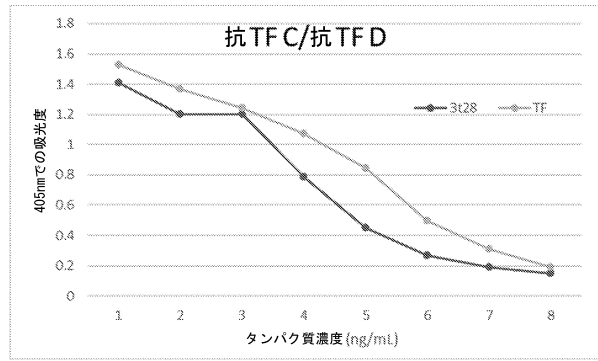
40

50

【図 6 0】

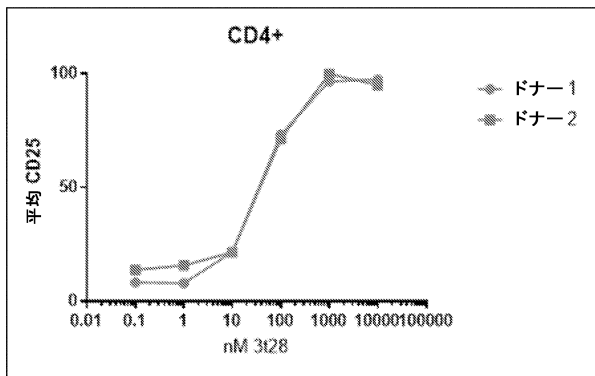


【図 6 1】

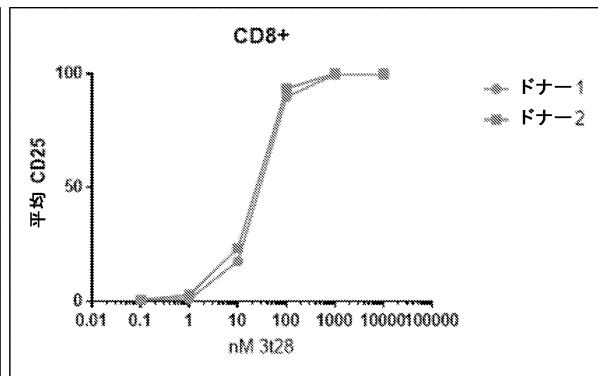


10

【図 6 2】

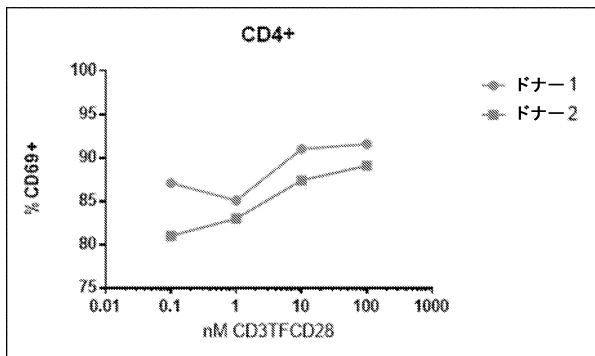


【図 6 3】



20

【図 6 4】



【図 6 5】



30

40

50

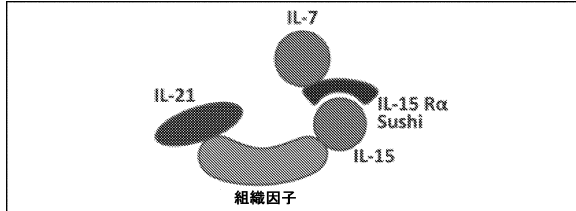
【図 6 6】



【図 6 7】



【図 6 8】



【図 6 9】



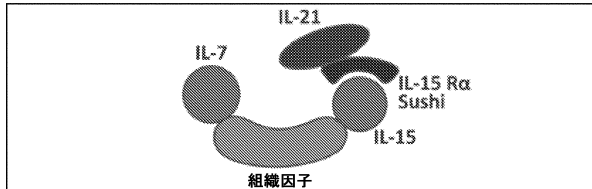
【図 7 0】



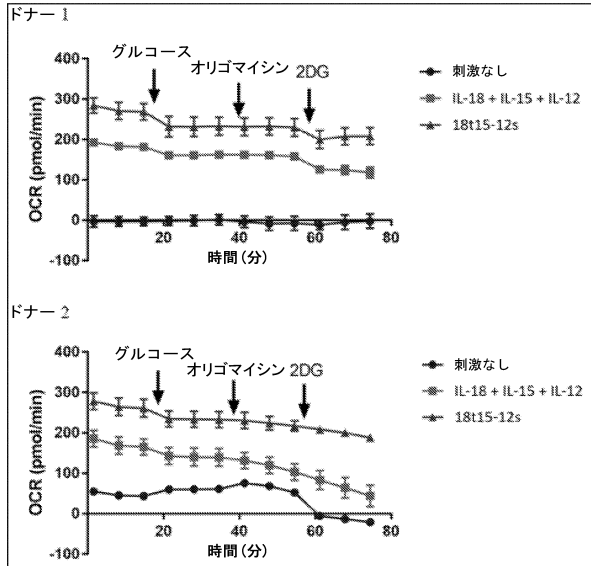
【図 7 1】



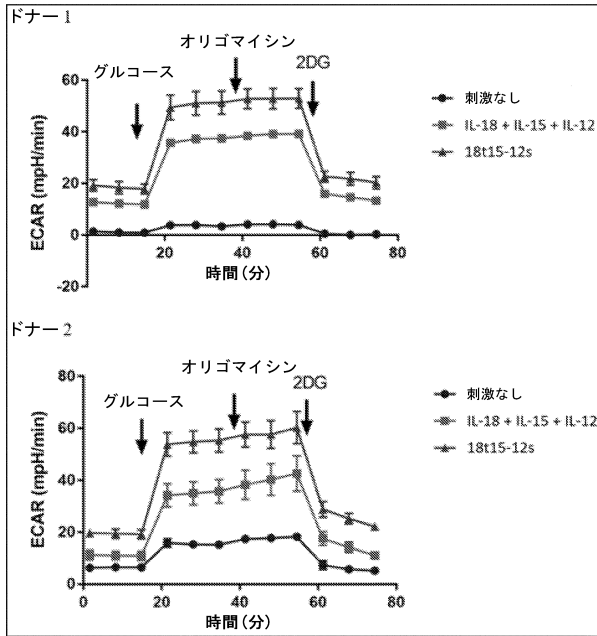
【図 7 2】



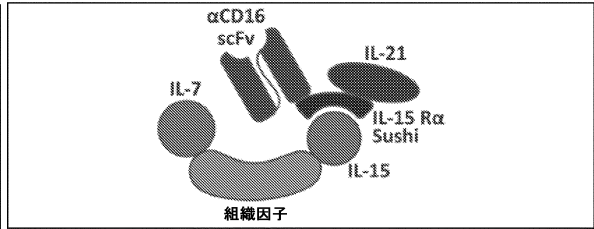
【図 7 3】



【図 7 4】



【図 7 5】

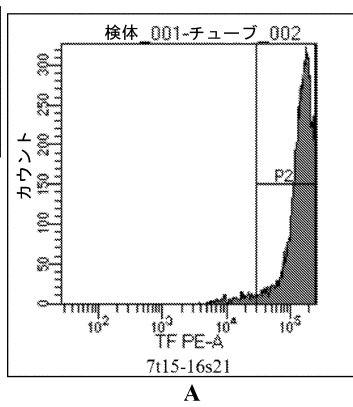


10

【図 7 6】

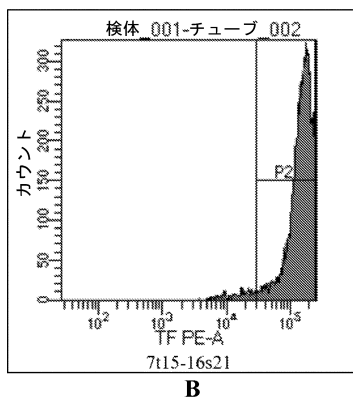


【図 7 7】



20

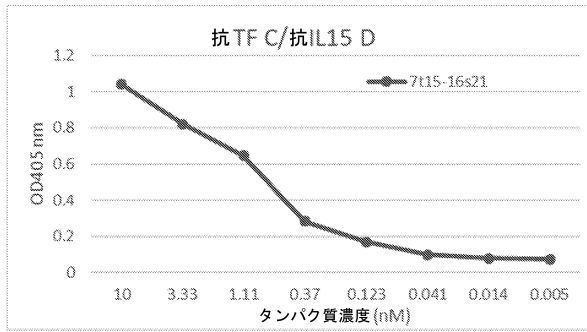
30



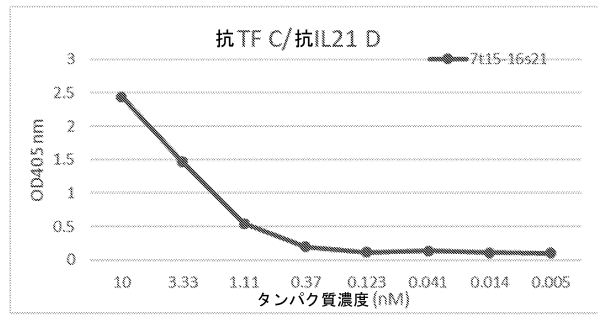
40

50

【図 7 8 A】

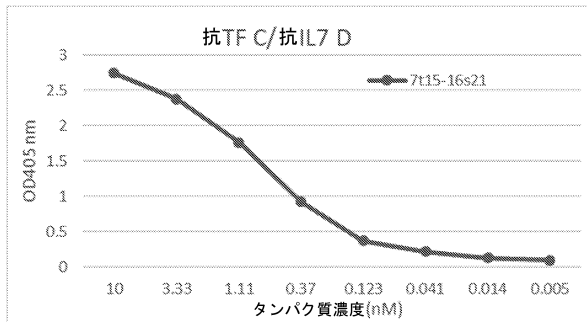


【図 7 8 B】

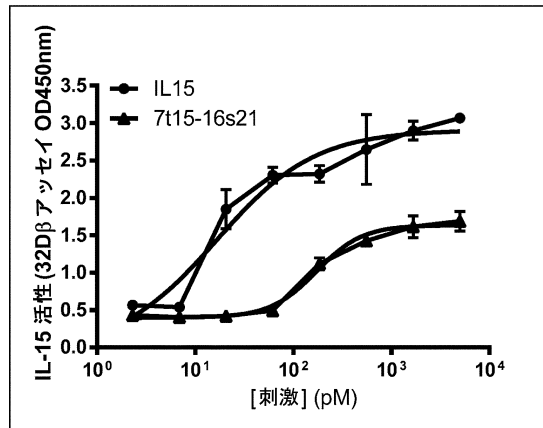


10

【図 7 8 C】

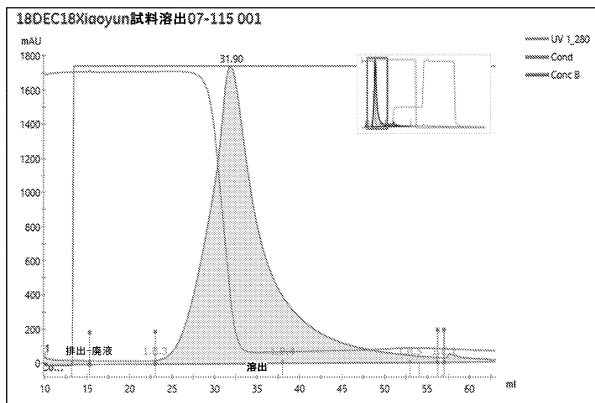


【図 7 9】

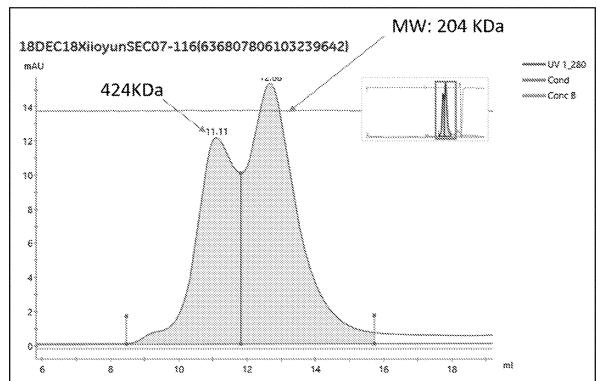


20

【図 8 0】



【図 8 1】

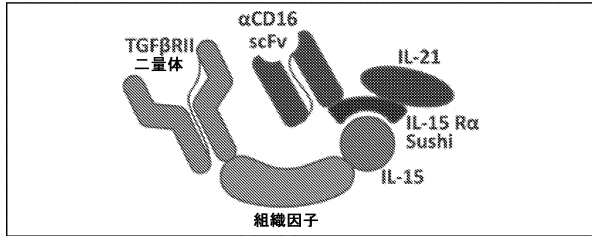


30

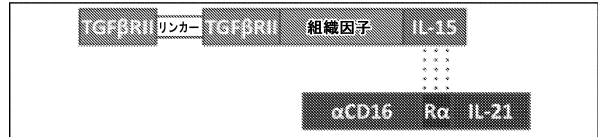
40

50

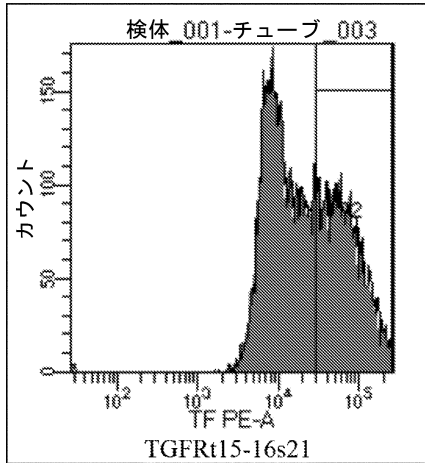
【図 8 2】



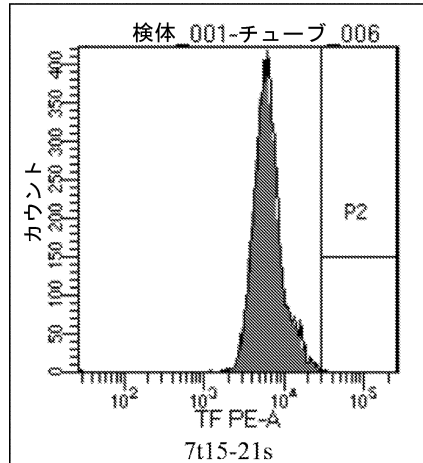
【図 8 3】



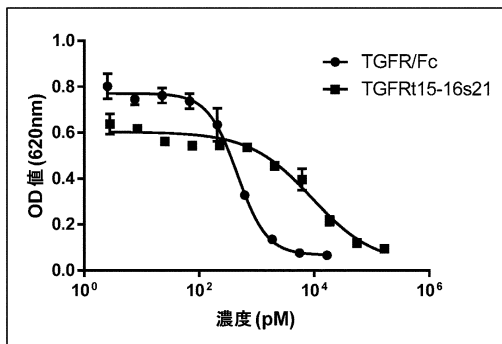
【図 8 4 A】



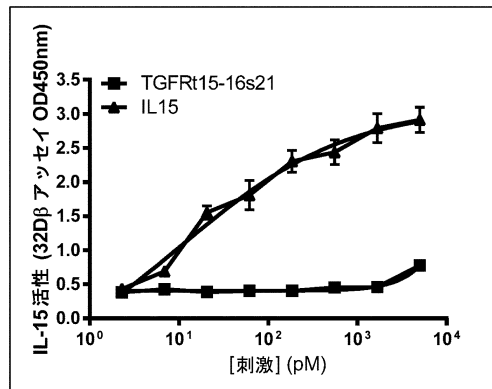
【図 8 4 B】



【図 8 5】



【図 8 6】



10

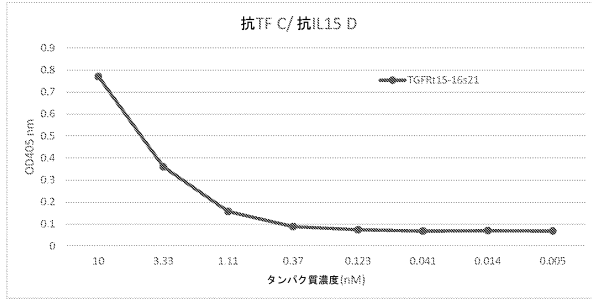
20

30

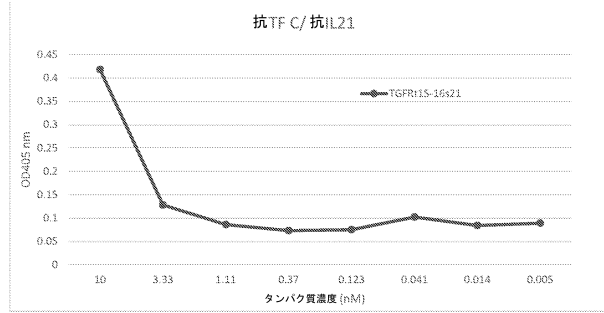
40

50

【図 8 7 A】

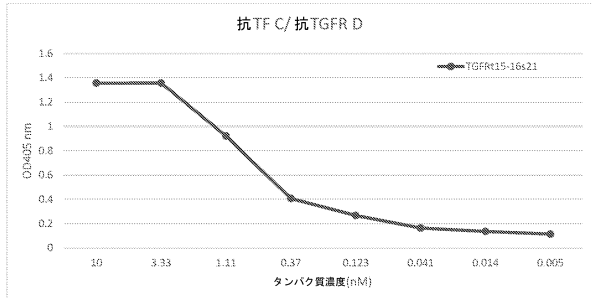


【図 8 7 B】

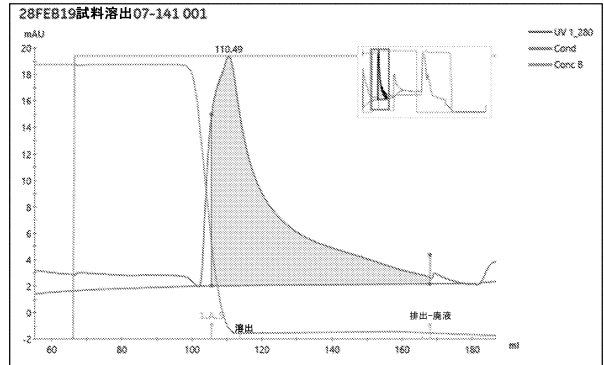


10

【図 8 7 C】

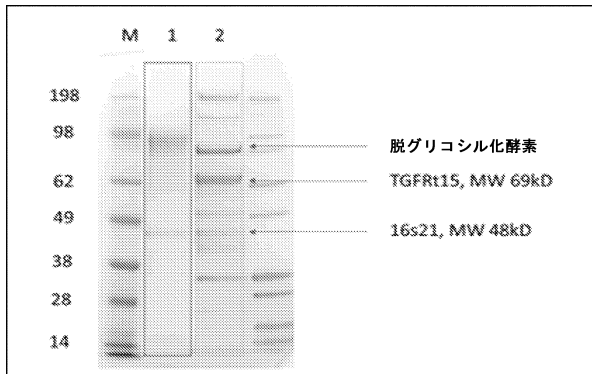


【図 8 8】

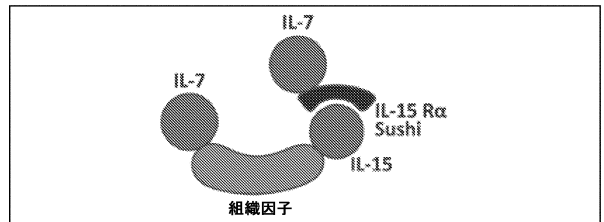


20

【図 8 9】



【図 9 0】



30

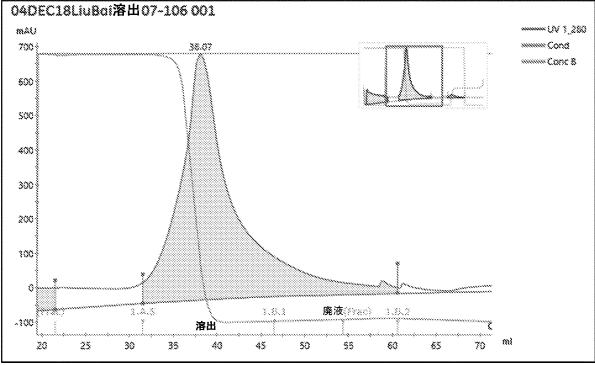
40

50

【図 9 1】

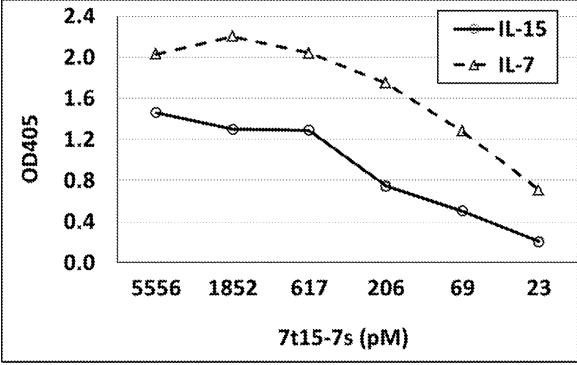


【図 9 2】

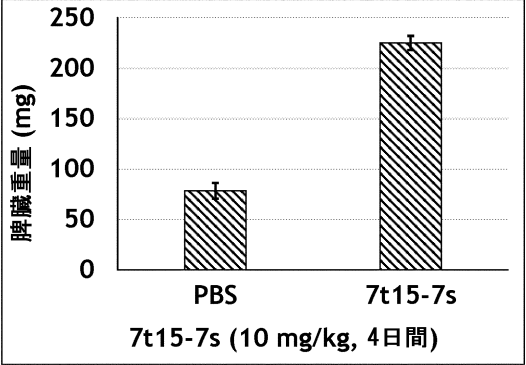


10

【図 9 3】

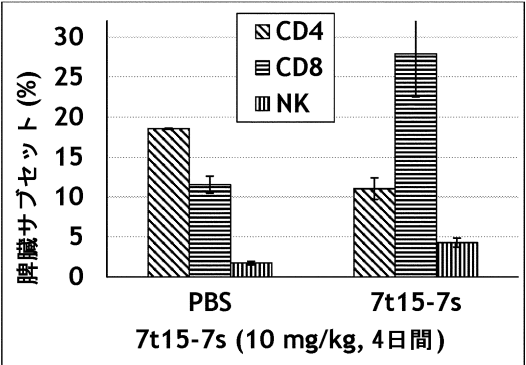


【図 9 4】



20

A



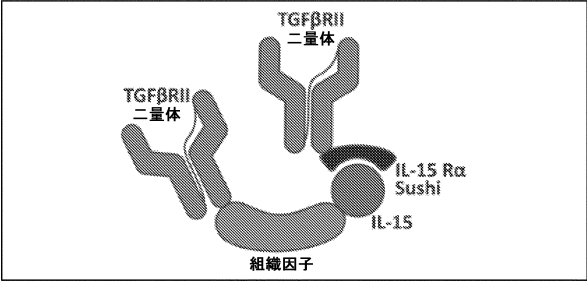
30

B

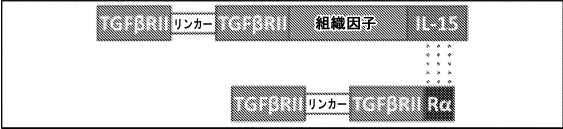
40

50

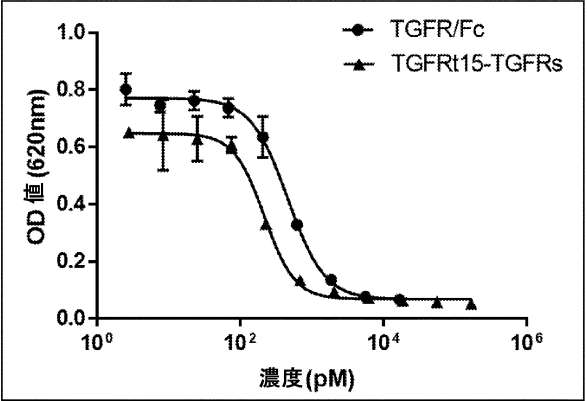
【図 9 5】



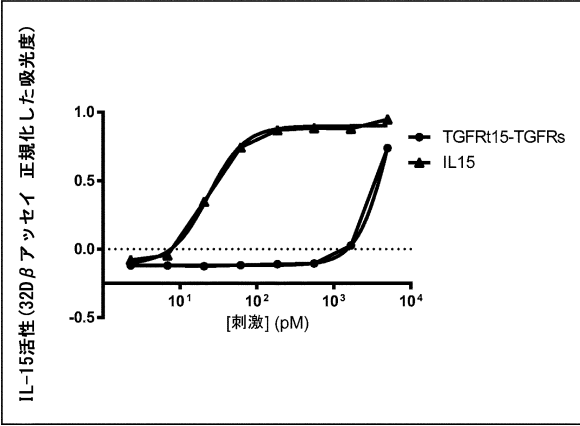
【図 9 6】



【図 9 7】



【図 9 8】



10

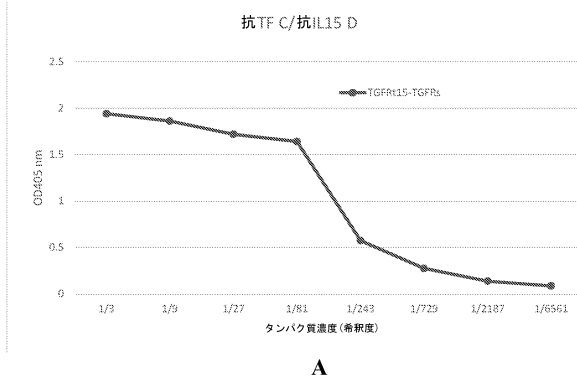
20

30

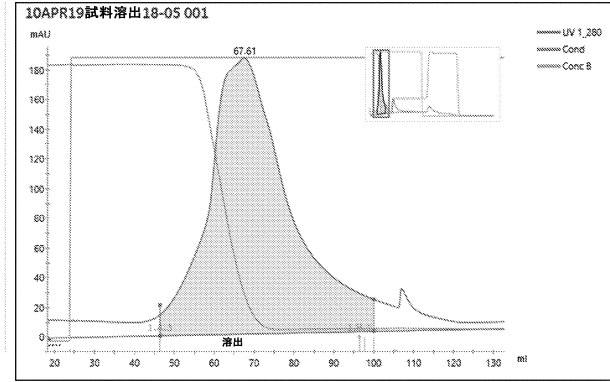
40

50

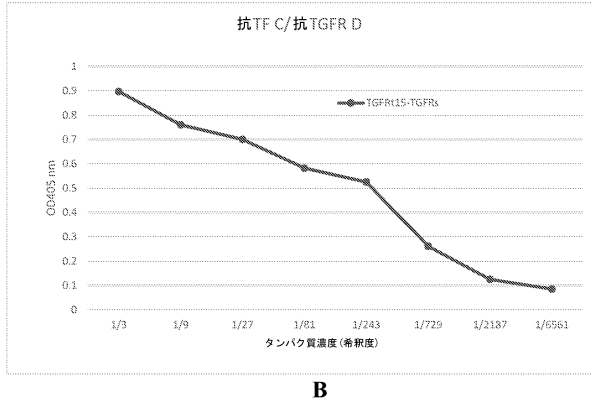
【図 99】



【図 100】

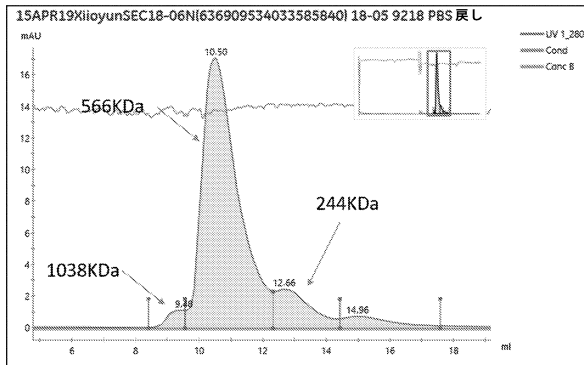


10

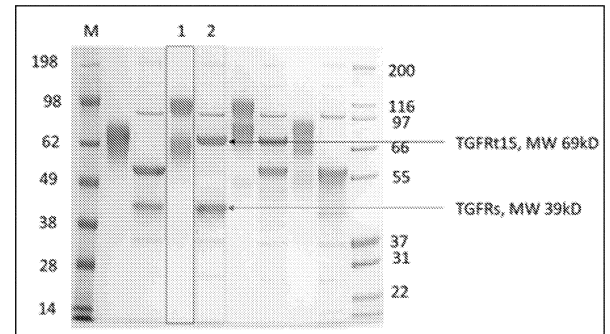


20

【図 101】



【図 102】

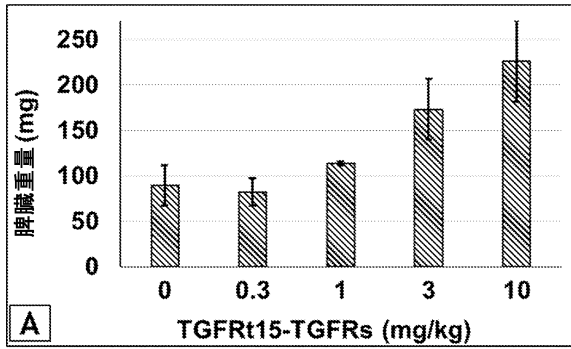


30

40

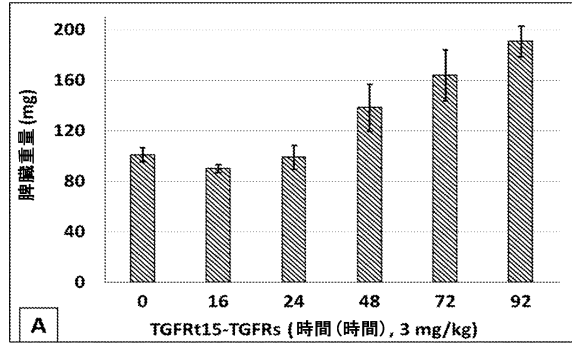
50

【図 1 0 3】

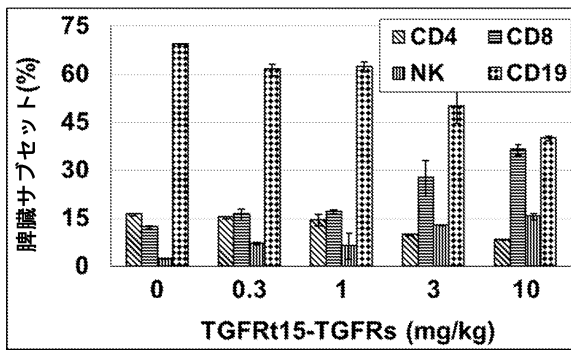


A

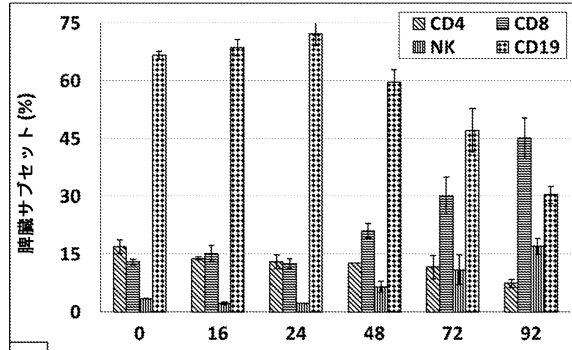
【図 1 0 4】



10

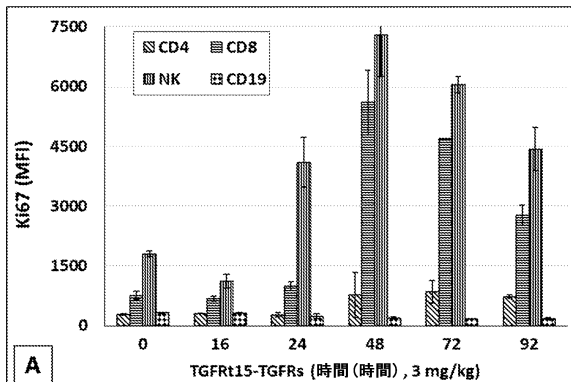


B



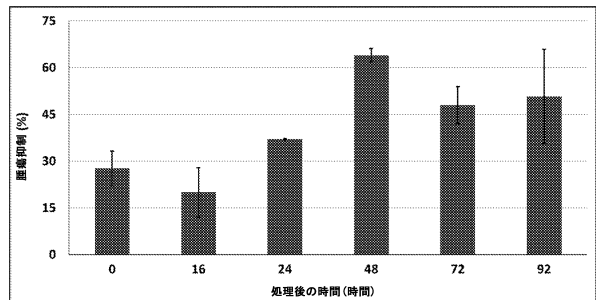
20

【図 1 0 5】



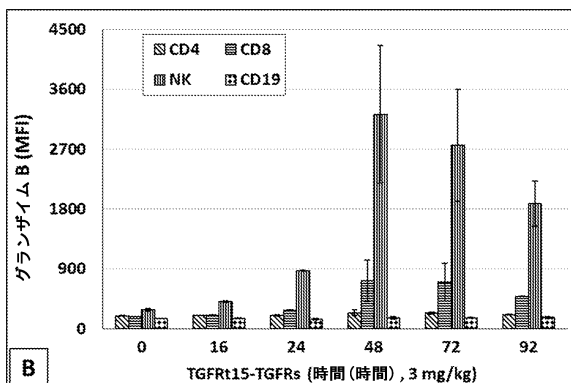
A

【図 1 0 6】



B

30

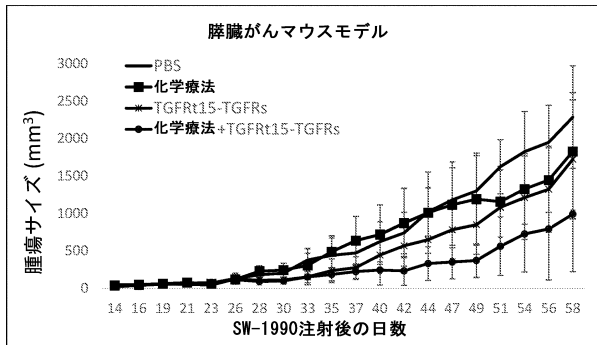


B

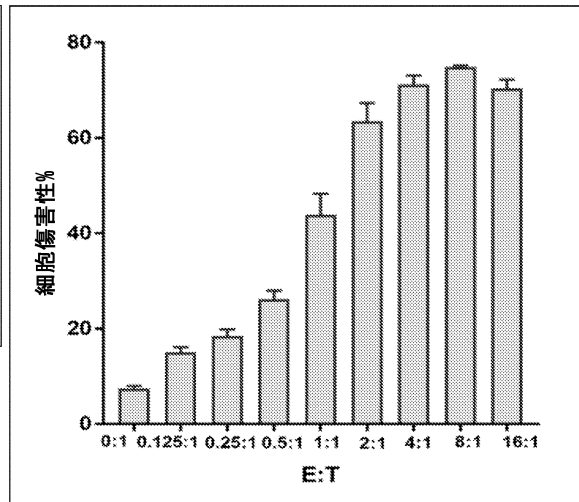
40

50

【図 1 0 7】

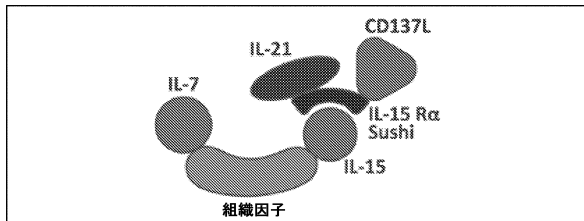


【図 1 0 8】

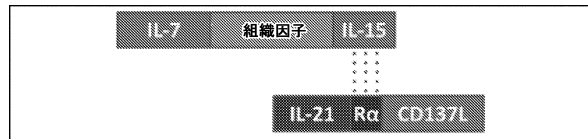


10

【図 1 0 9】

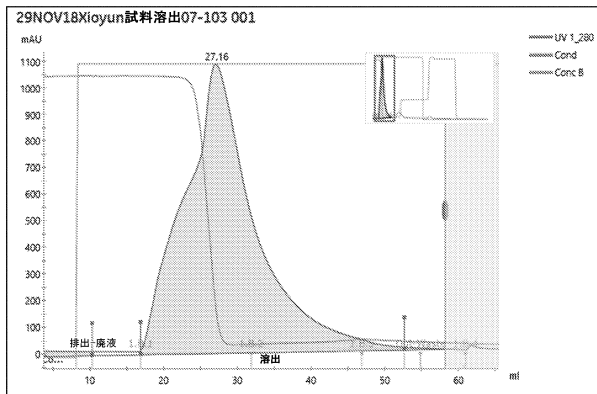


【図 1 1 0】

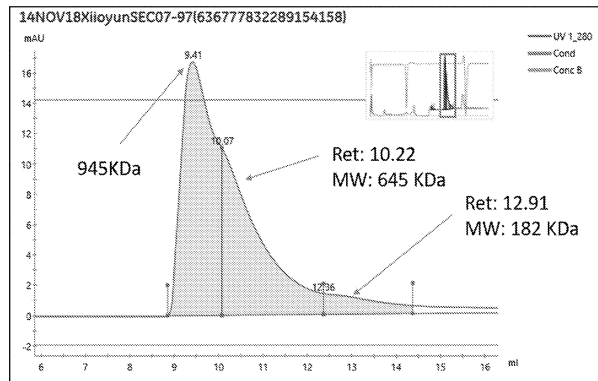


20

【図 1 1 1】



【図 1 1 2】

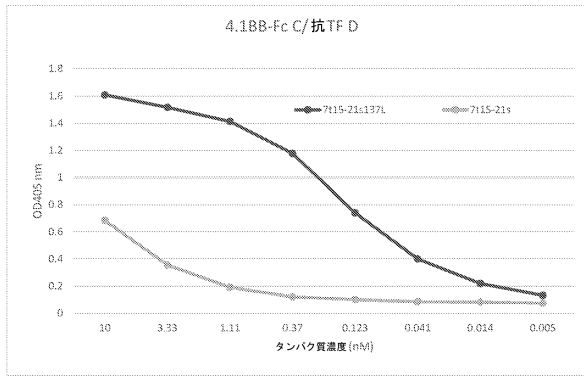


30

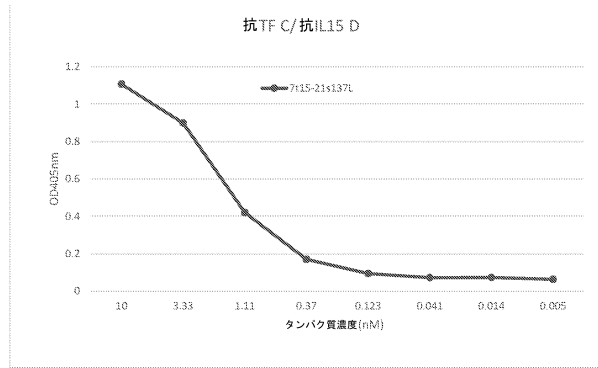
40

50

【図 1 1 3】

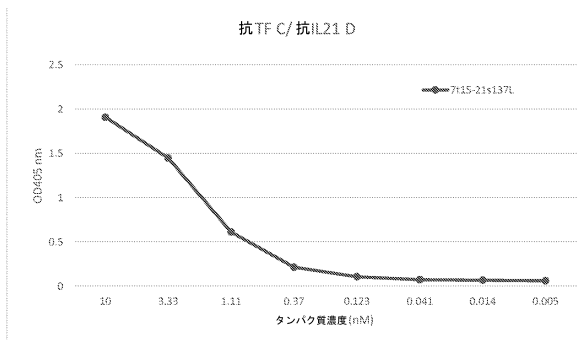


【図 1 1 4 A】

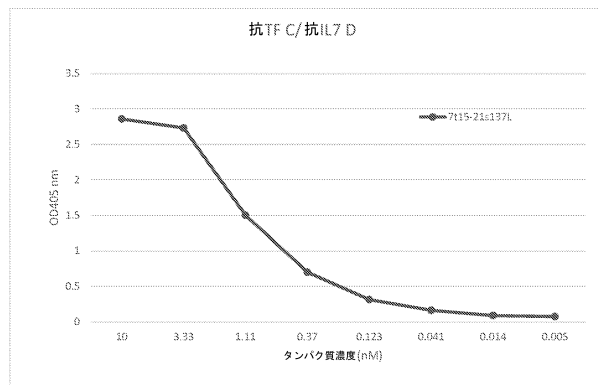


10

【図 1 1 4 B】

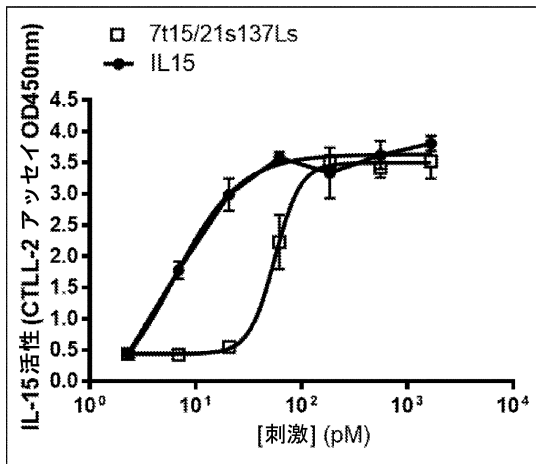


【図 1 1 4 C】

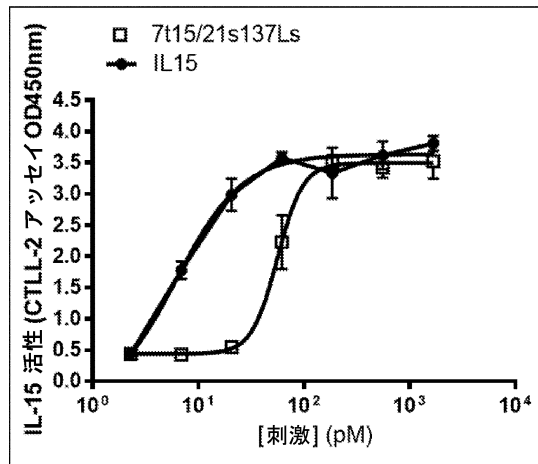


20

【図 1 1 5】



【図 1 1 6】

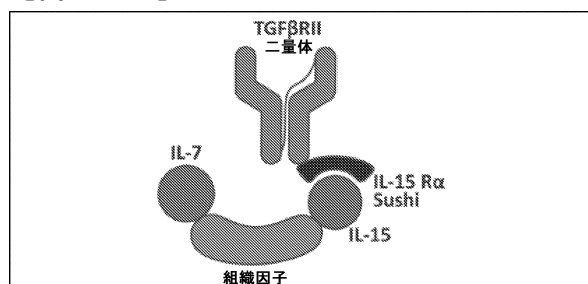


30

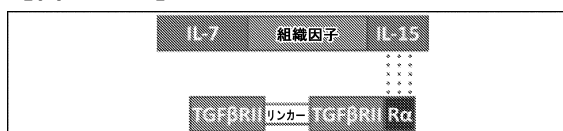
40

50

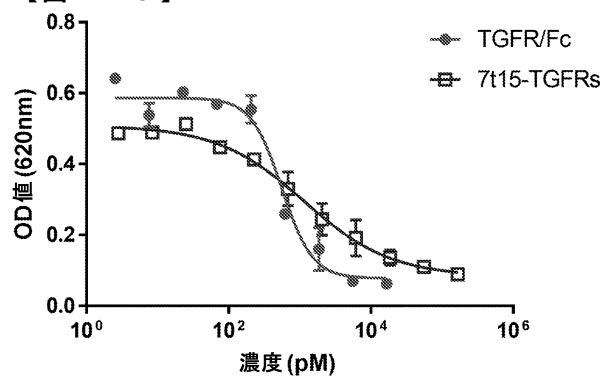
【図 1 1 7】



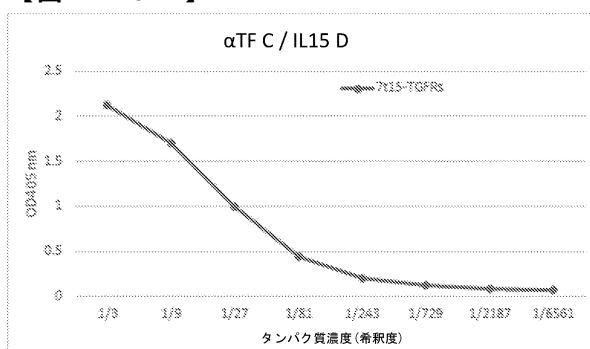
【図 1 1 8】



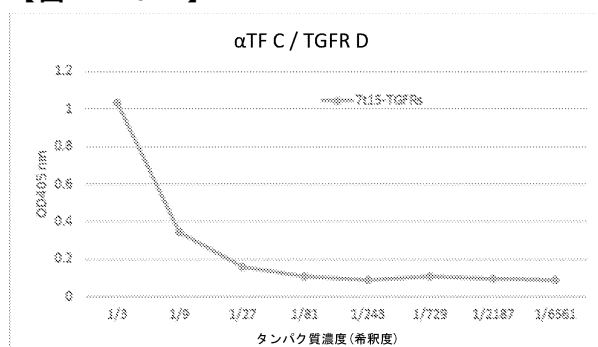
【図 1 1 9】



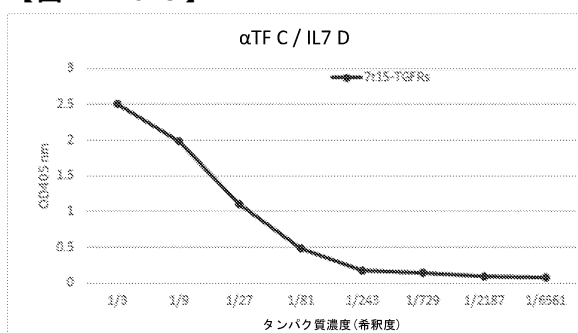
【図 120 A】



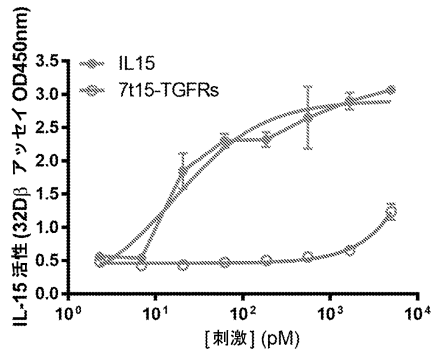
【図 120 B】



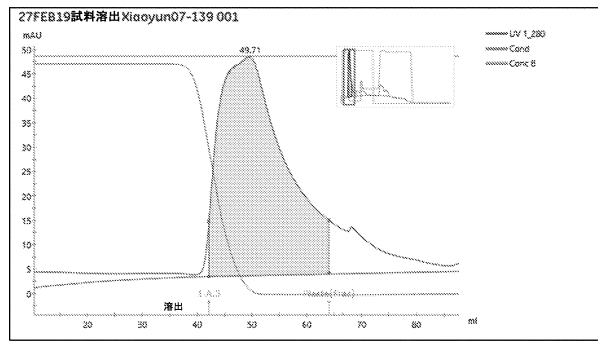
【図 120 C】



【図 1 2 1】

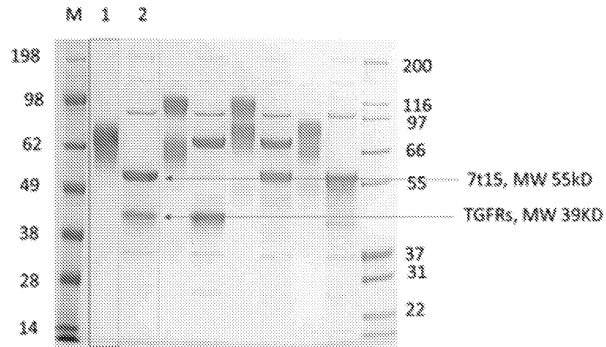


【図 1 2 2】

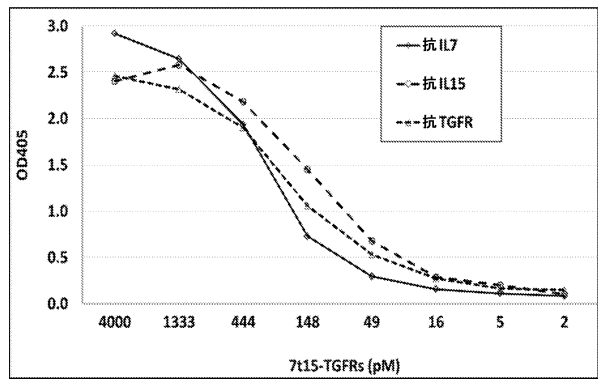


10

【図 1 2 3】



【図 1 2 4】



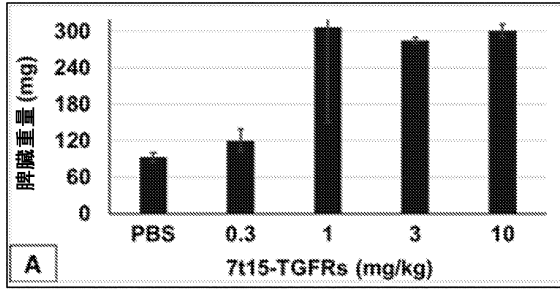
20

30

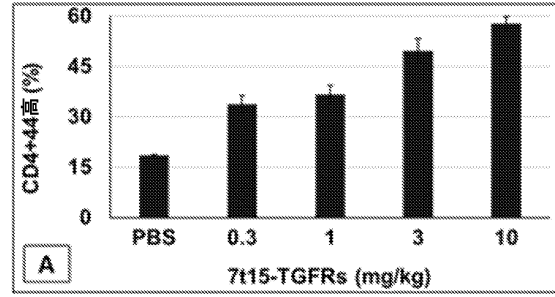
40

50

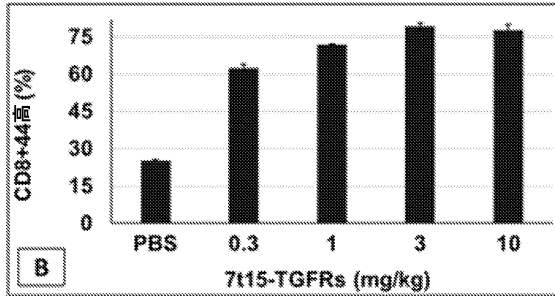
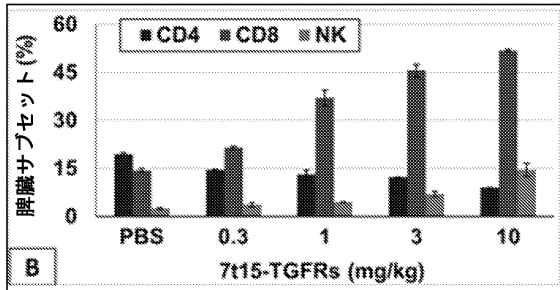
【図 1 2 5】



【図 1 2 6】

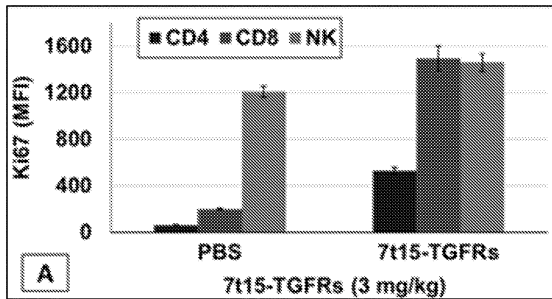


10

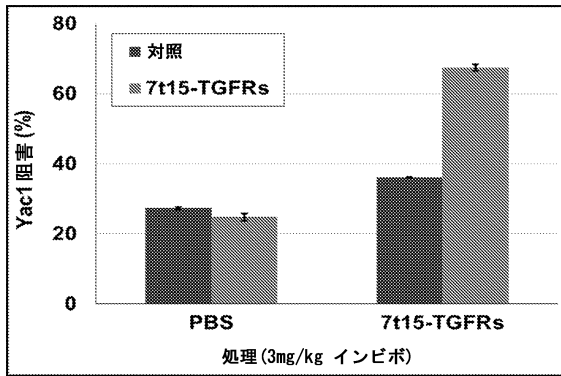


20

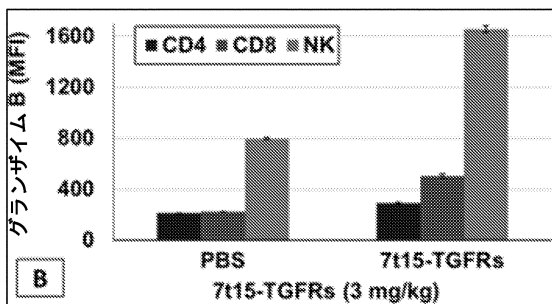
【図 1 2 7】



【図 1 2 8】



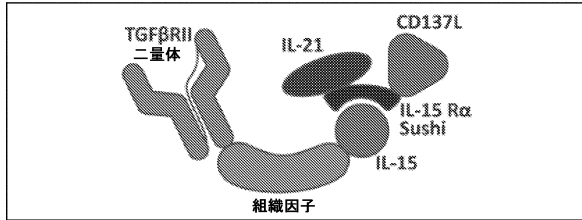
30



40

50

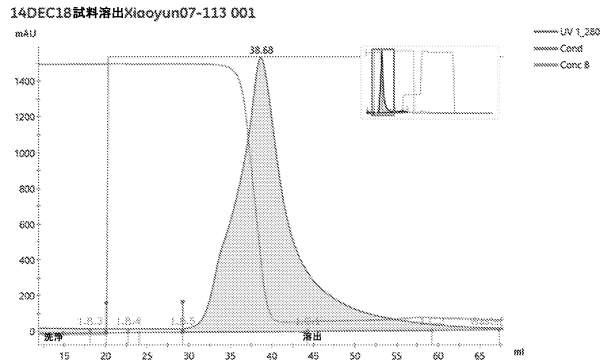
【図 1 2 9】



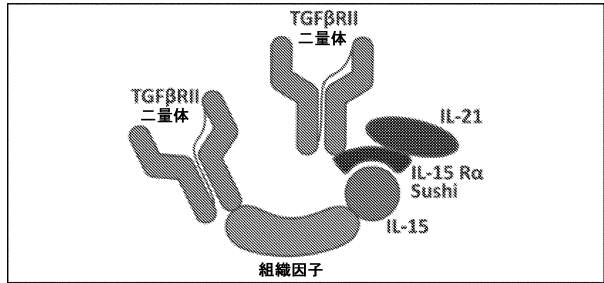
【図 1 3 0】



【図 1 3 1】



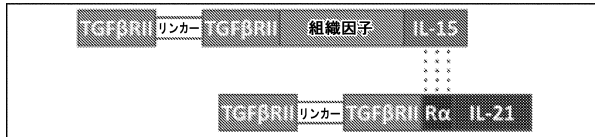
【図 1 3 2】



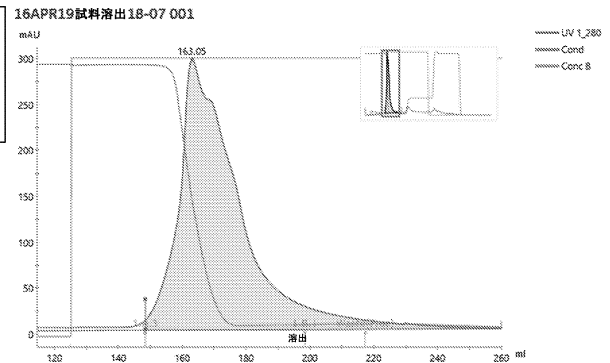
10

20

【図 1 3 3】



【図 1 3 4】

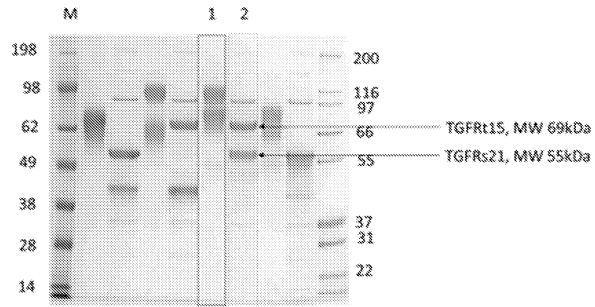


30

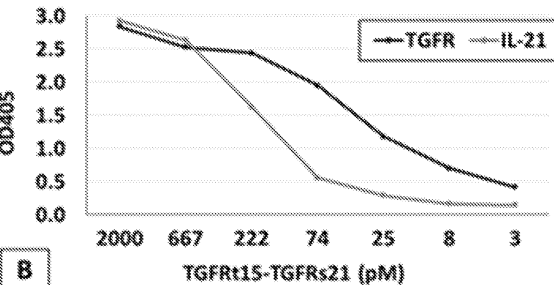
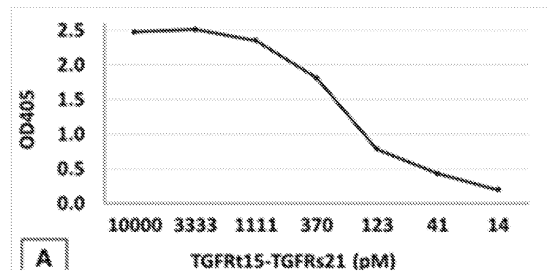
40

50

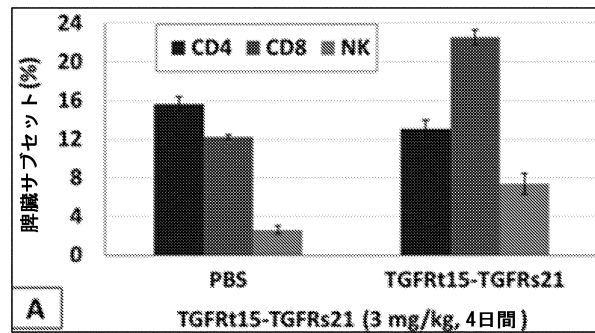
【図 1 3 5】



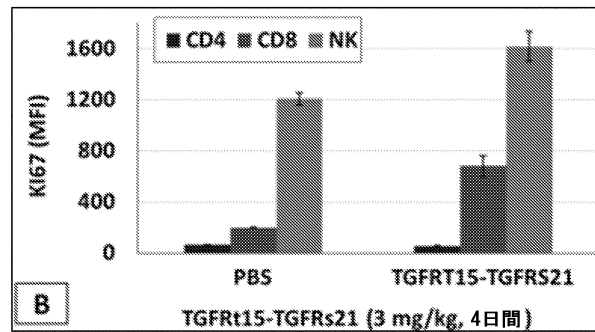
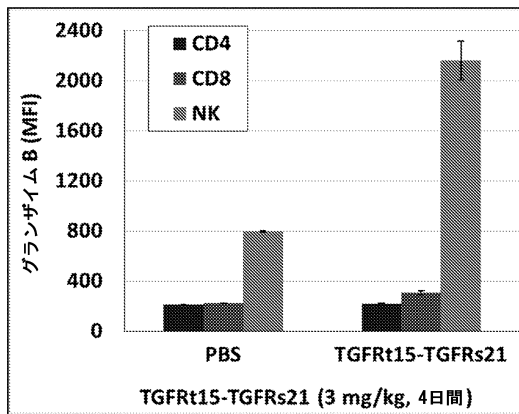
【図 1 3 6】



【図 1 3 7】



【図 1 3 8】



10

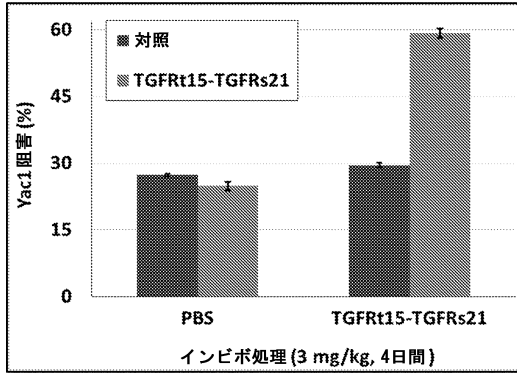
20

30

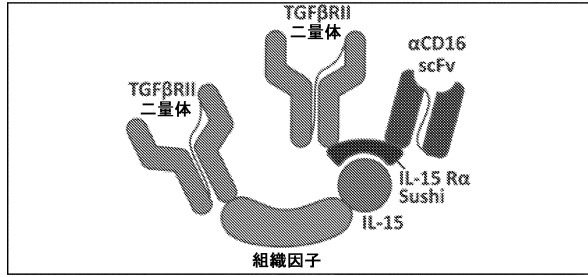
40

50

【図 1 3 9】

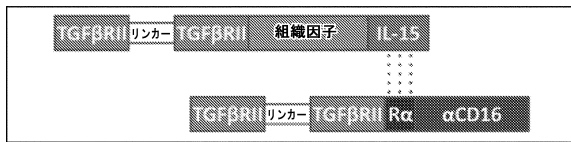


【図 1 4 0】

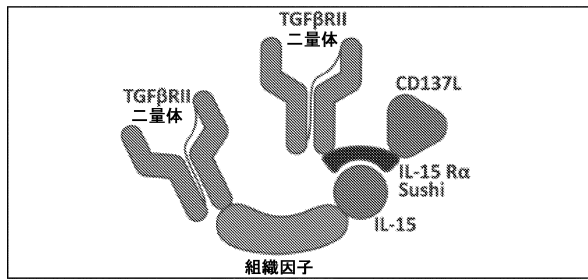


10

【図 1 4 1】

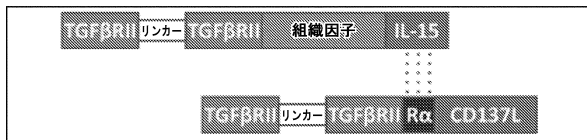


【図 1 4 2】

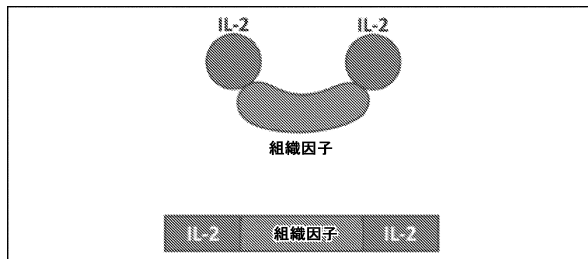


20

【図 1 4 3】



【図 1 4 4】

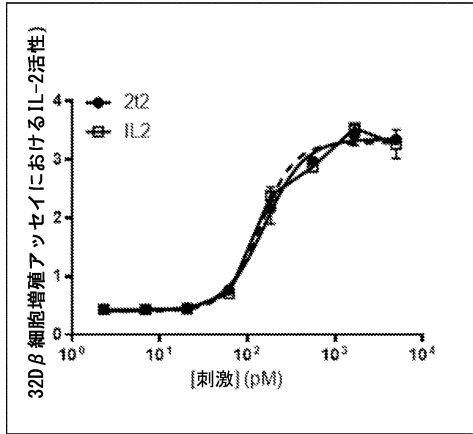


30

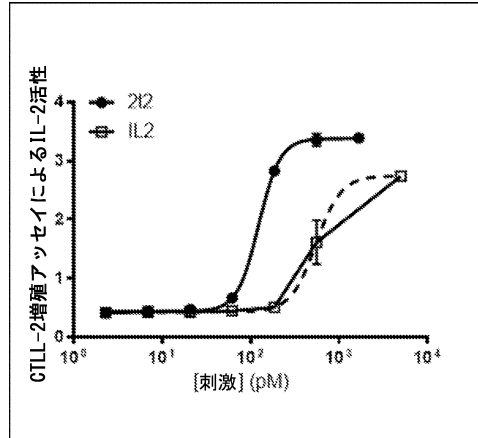
40

50

【図 1 4 5】

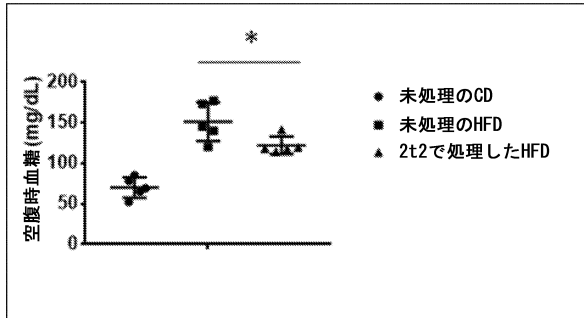


【図 1 4 6】

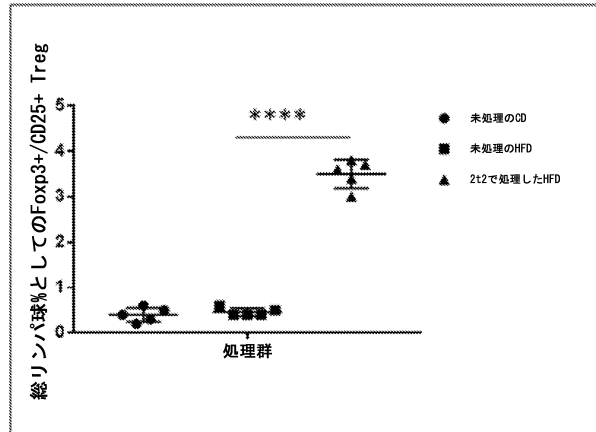


10

【図 1 4 7】



【図 1 4 8】



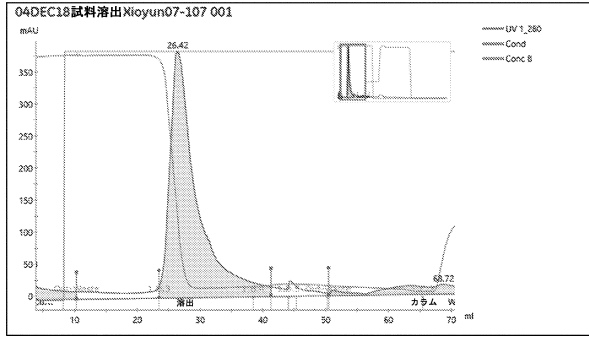
20

30

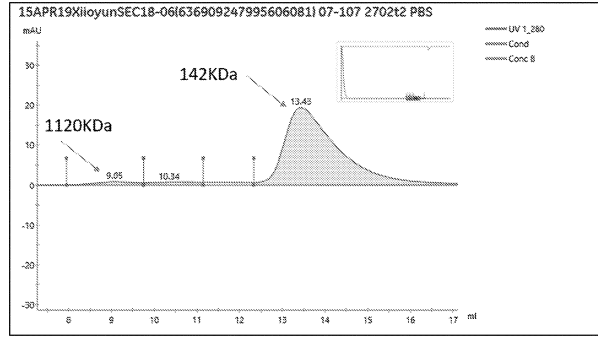
40

50

【図 1 4 9】

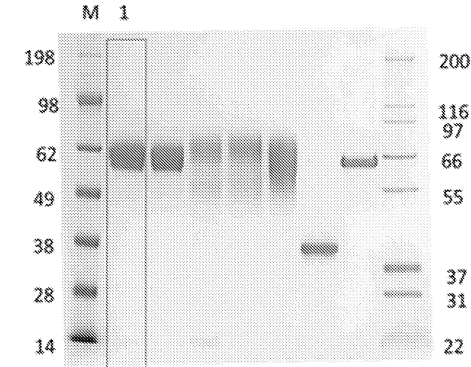


【図 1 5 0】



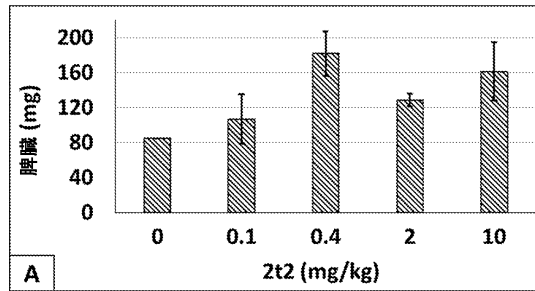
10

【図 1 5 1】

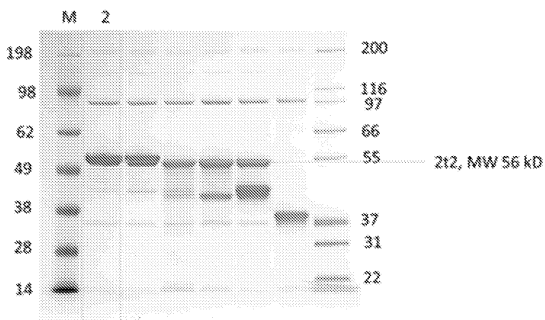


A

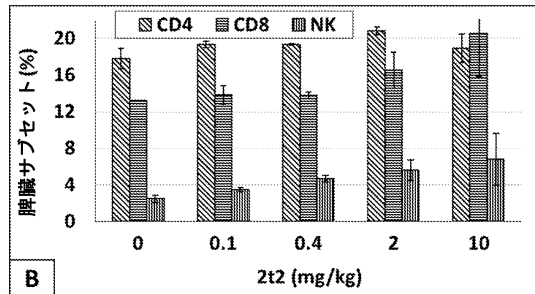
【図 1 5 2】



20



B

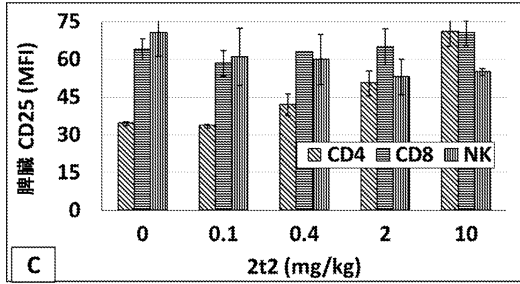


30

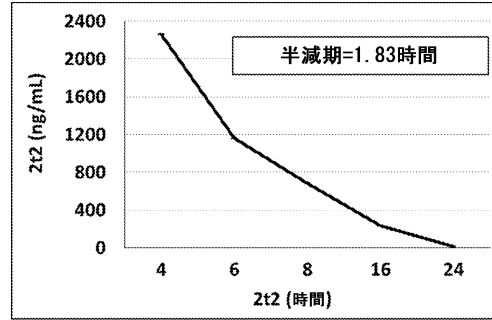
40

50

【図 1 5 3】

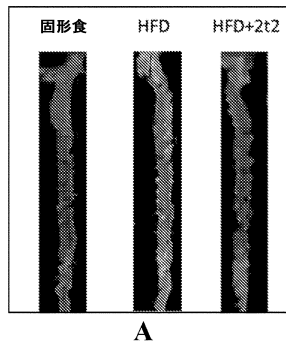


【図 1 5 4】

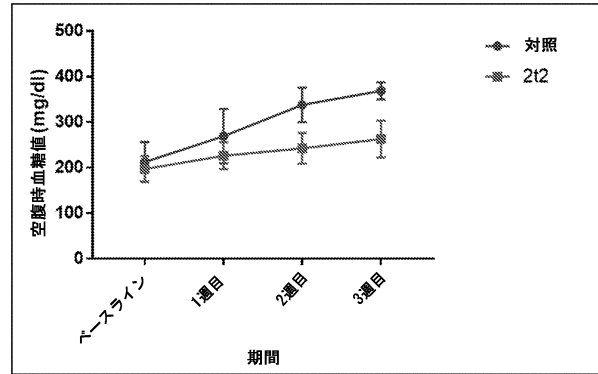


10

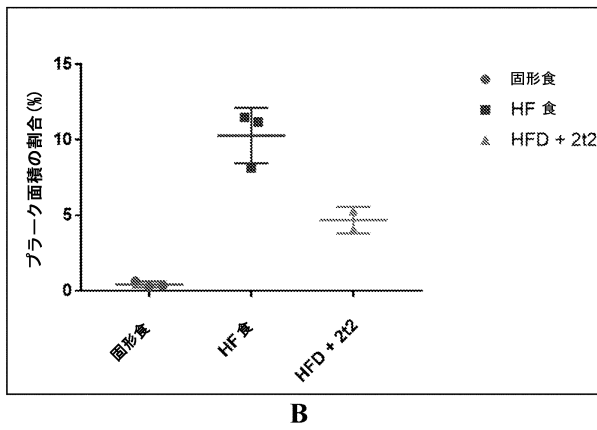
【図 1 5 5】



【図 1 5 6】



20

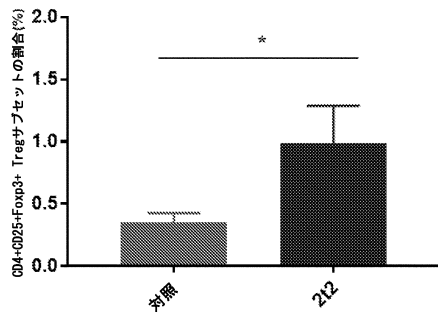


30

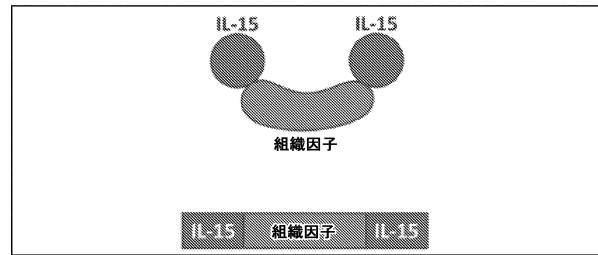
40

50

【図 1 5 7】

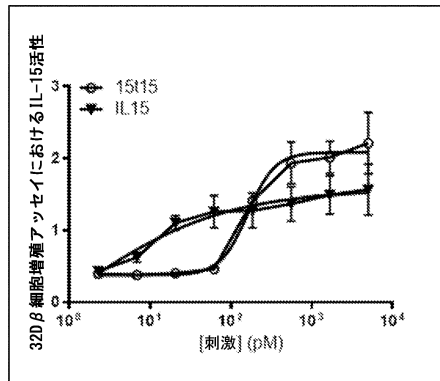


【図 1 5 8】

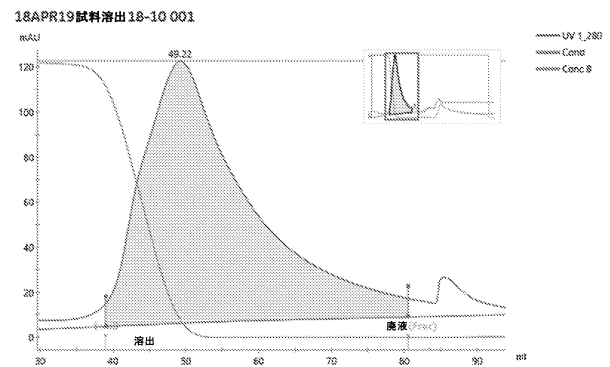


10

【図 1 5 9】



【図 1 6 0】



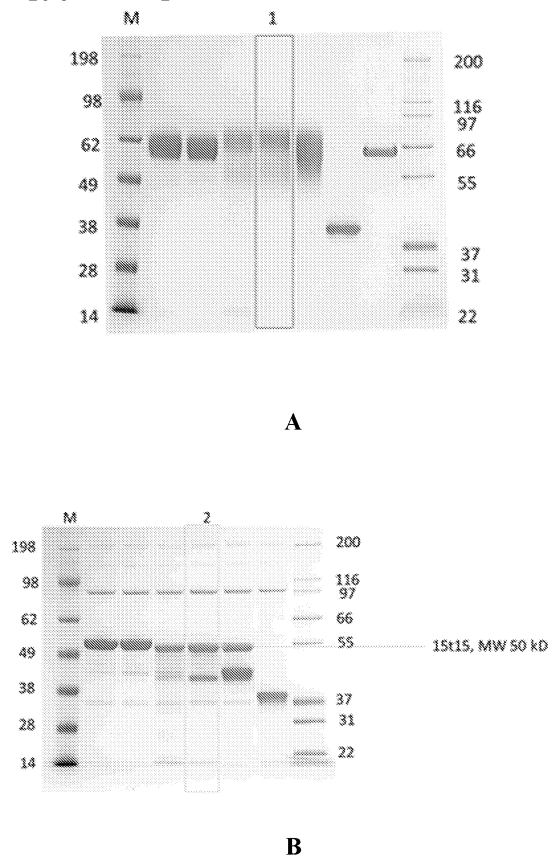
20

30

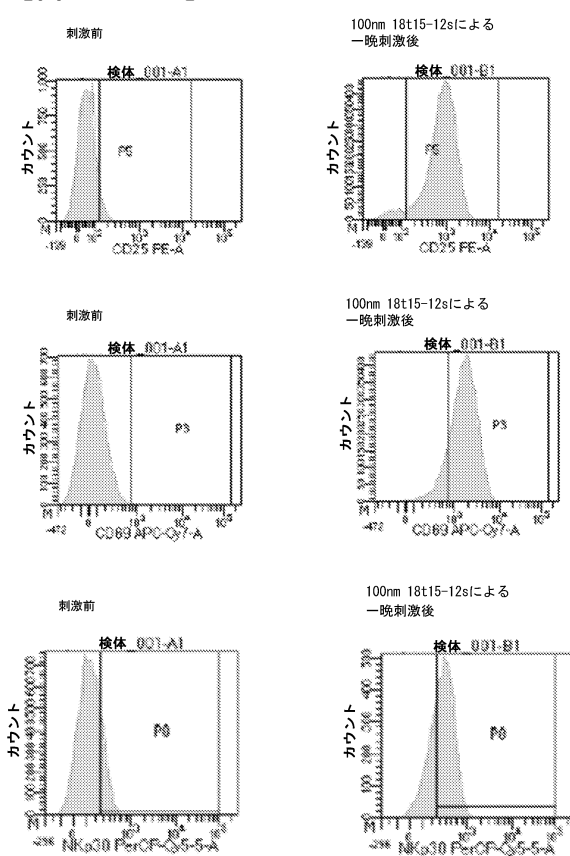
40

50

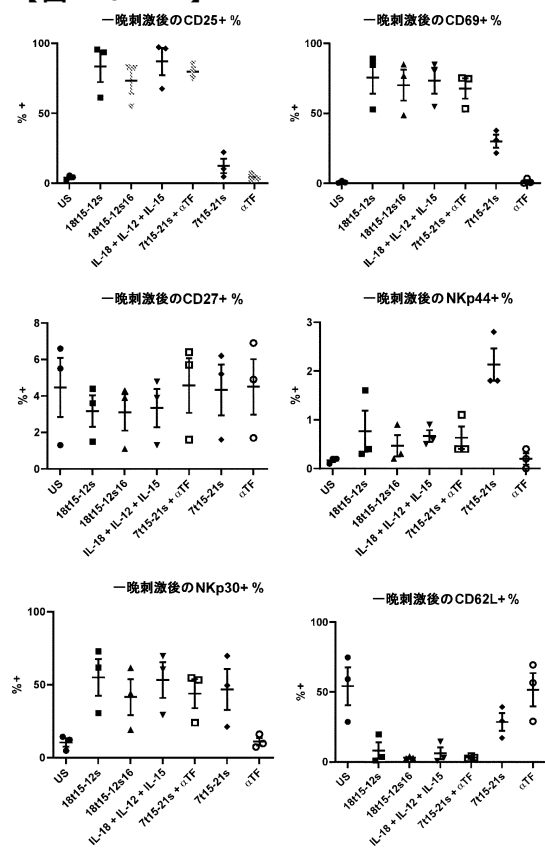
【図 161】



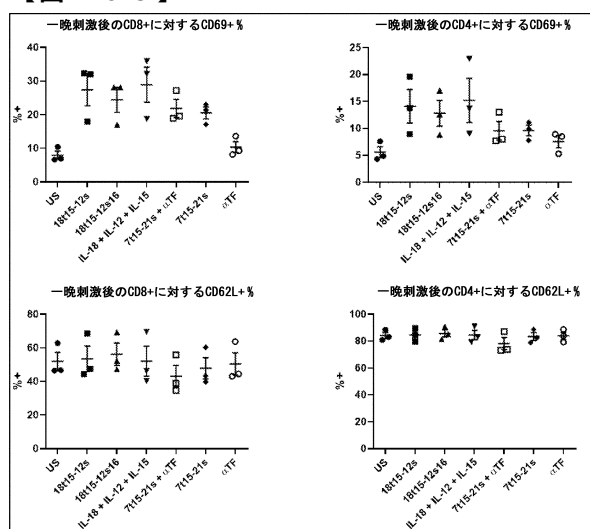
【図 1 6 2 A】



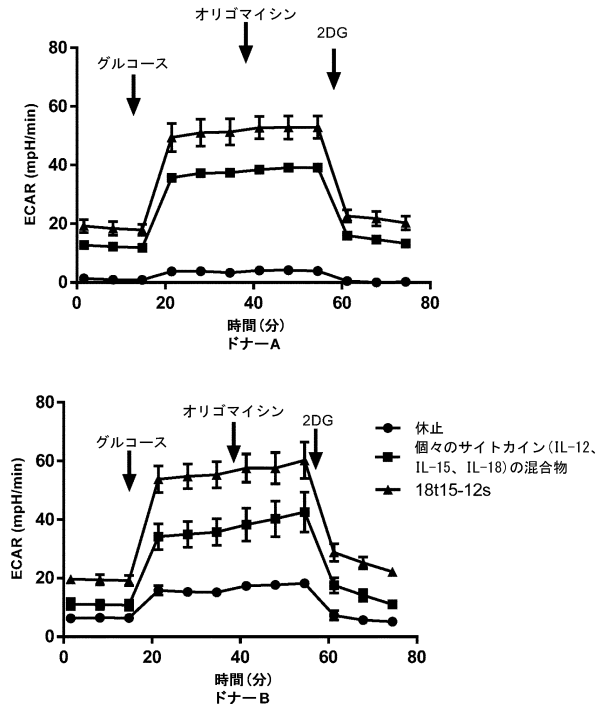
【図 162 B】



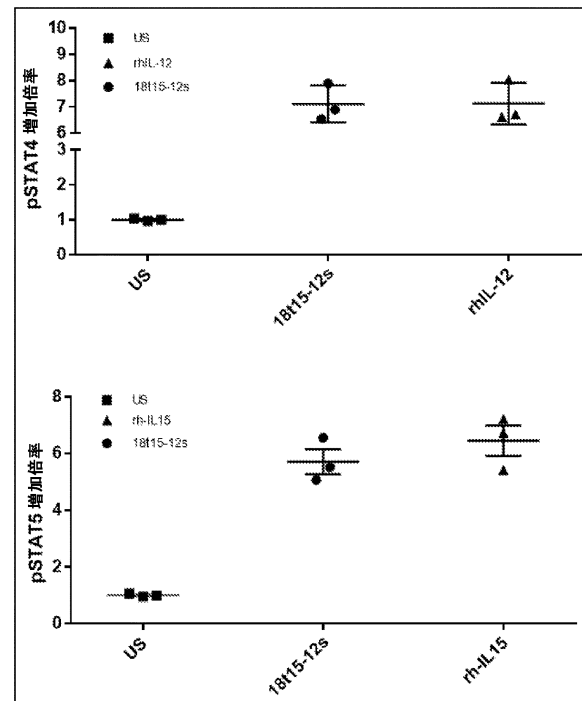
【図 163】



【図 1 6 4】



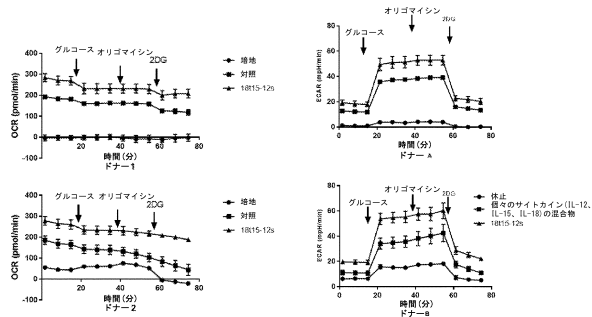
【図 1 6 5】



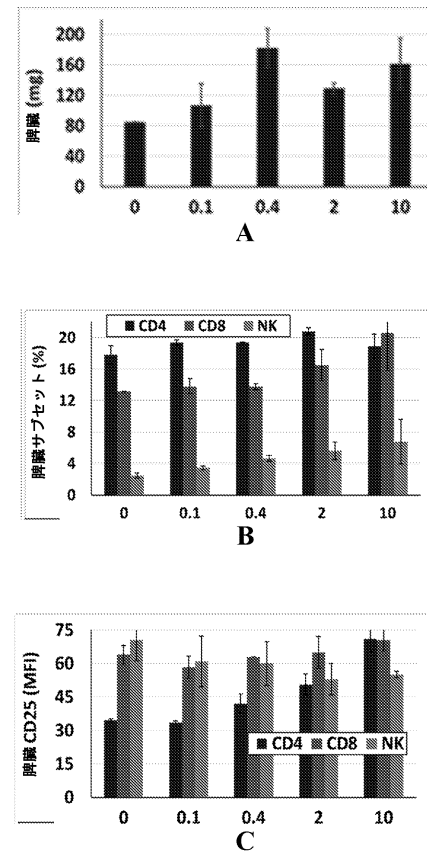
10

20

【図 1 6 6】



【図 1 6 7】

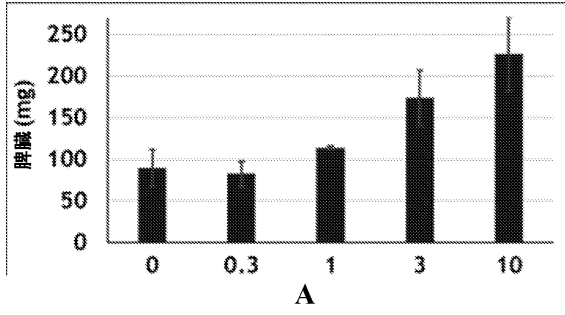


30

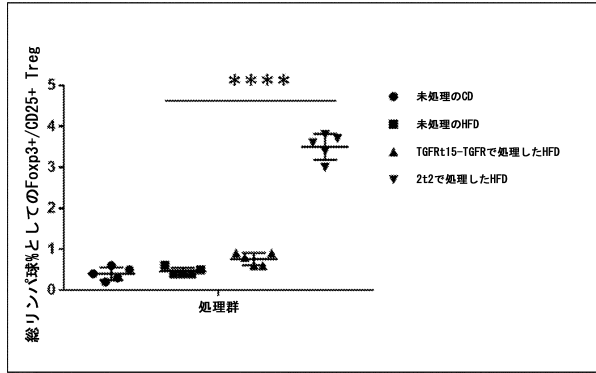
40

50

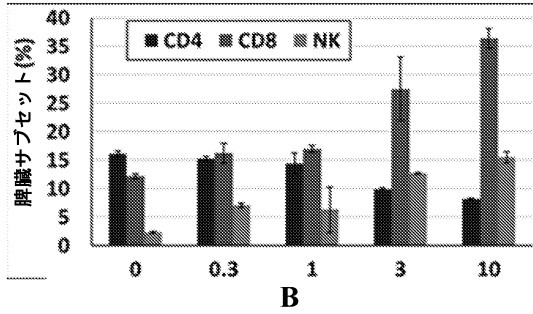
【図 1 6 8】



【図 1 6 9 A】

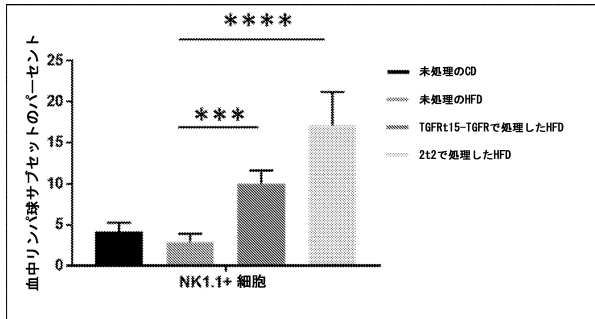


10

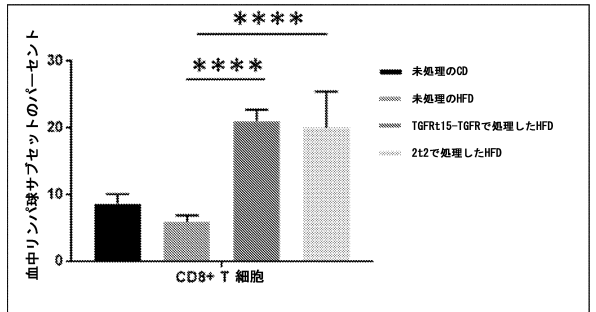


20

【図 1 6 9 B】



【図 1 6 9 C】

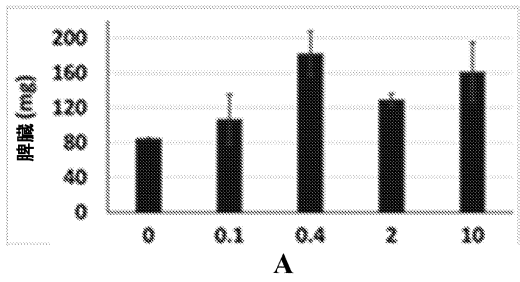


30

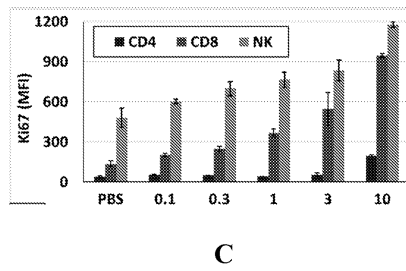
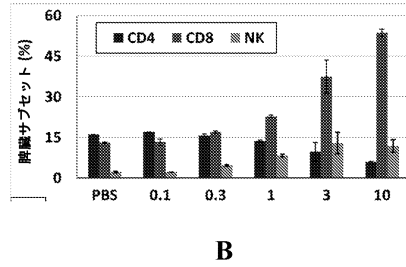
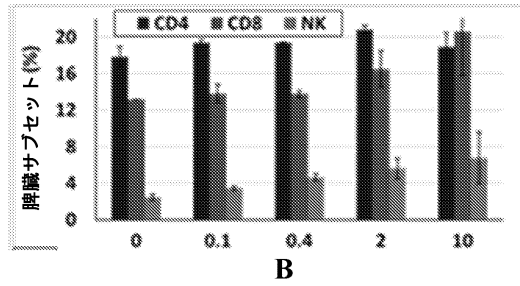
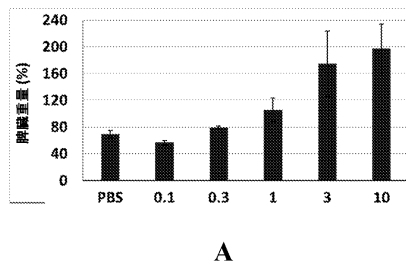
40

50

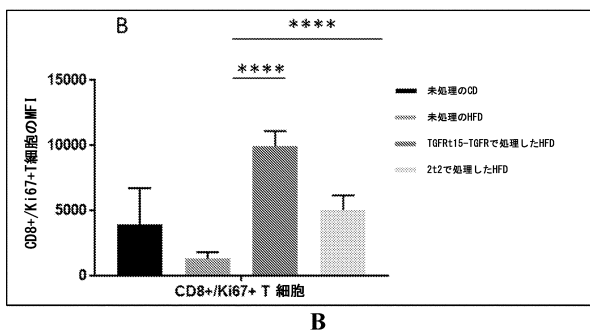
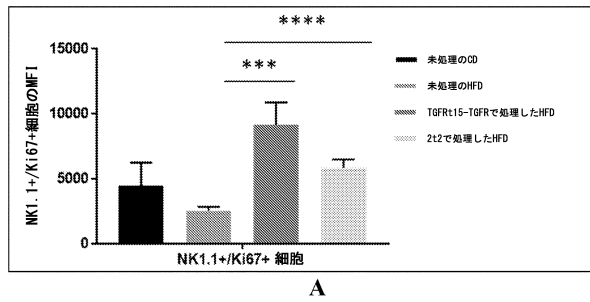
【図 170】



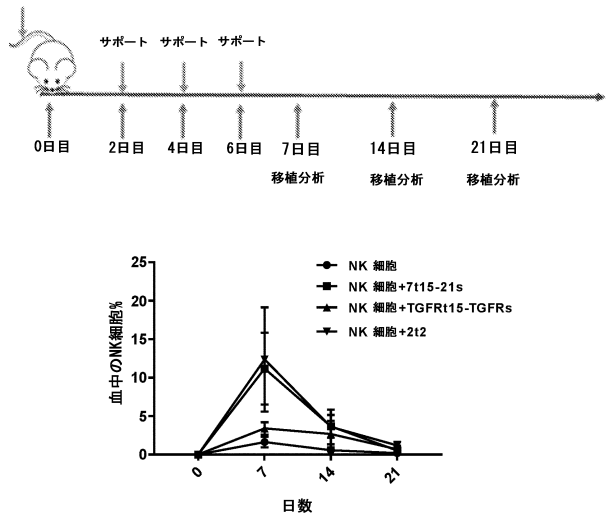
【図 171】



【図 172】



【図 173】



10

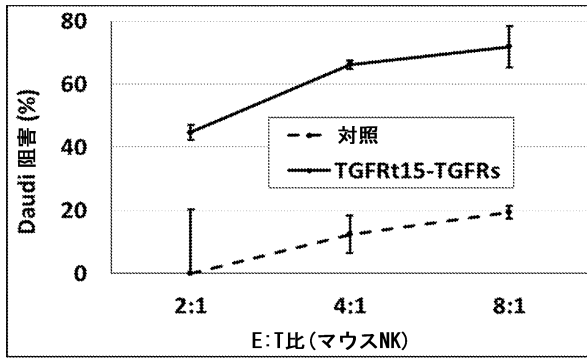
20

30

40

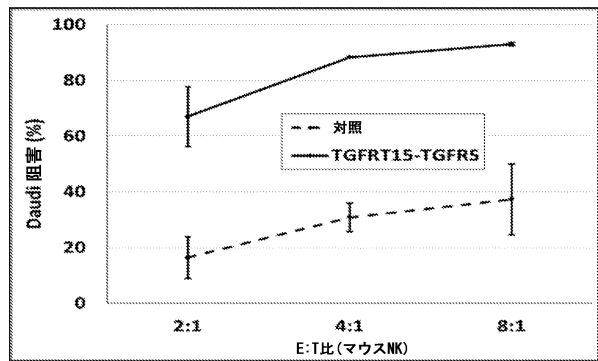
50

【図 1 7 4】

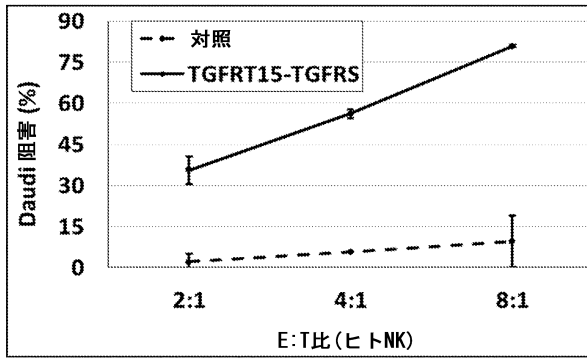


A

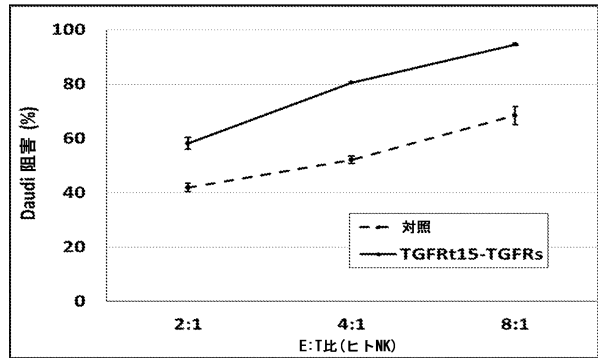
【図 1 7 5】



A

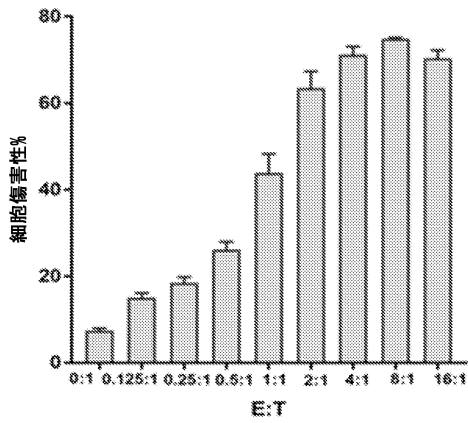


B

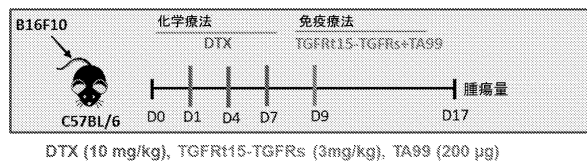


B

【図 1 7 6】



【図 1 7 7 A】



10

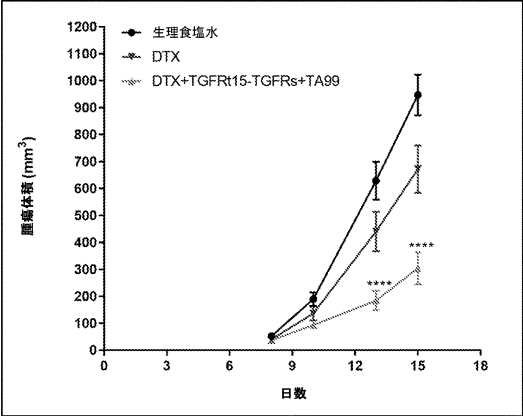
20

30

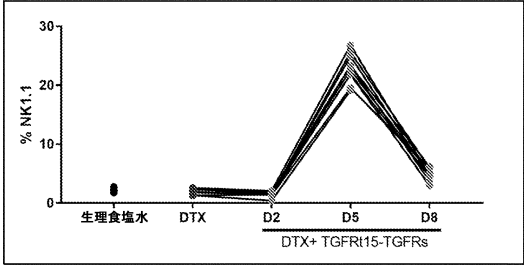
40

50

【図 1 7 7 B】

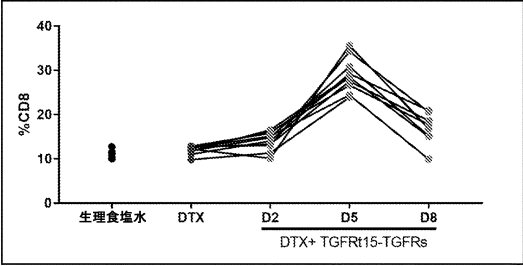


【図 1 7 7 C】

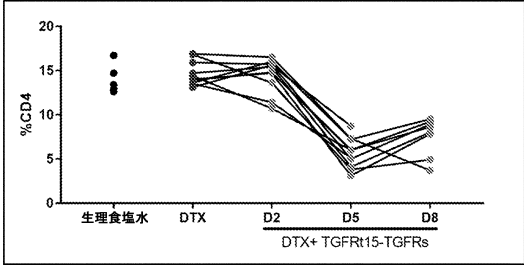


10

【図 1 7 7 D】

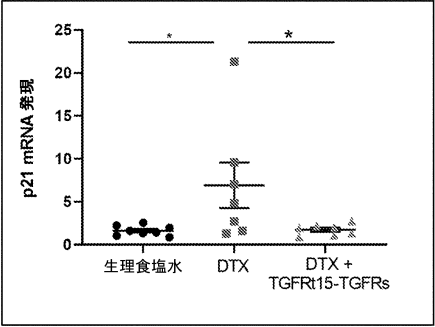


【図 1 7 7 E】

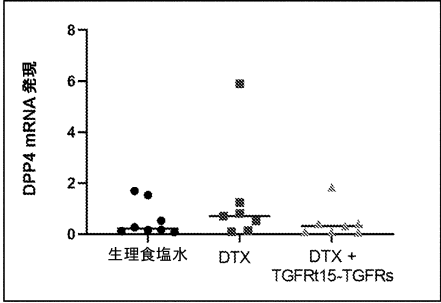


20

【図 1 7 7 F】



【図 1 7 7 G】

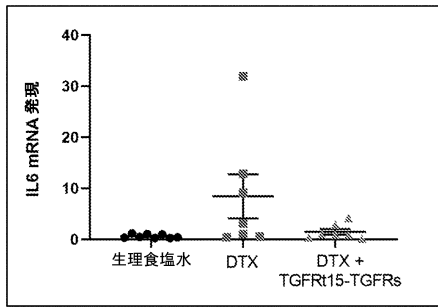


30

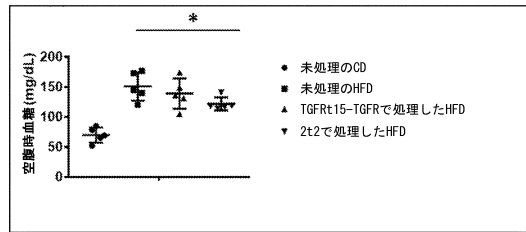
40

50

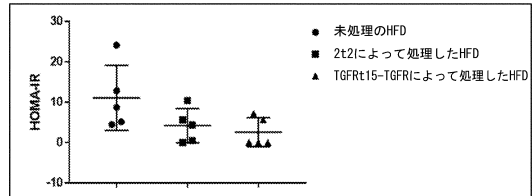
【図 1 7 7 H】



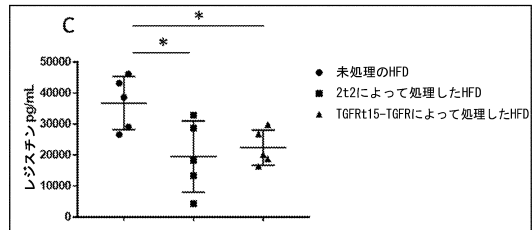
【図 1 7 8】



A

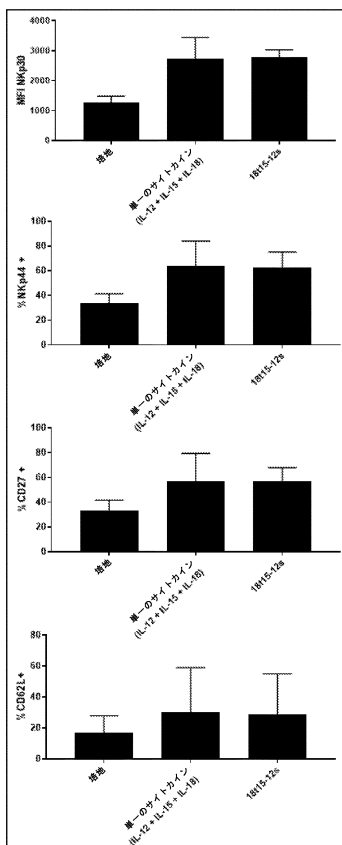


B

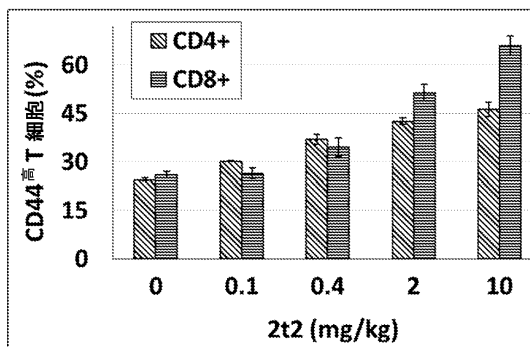
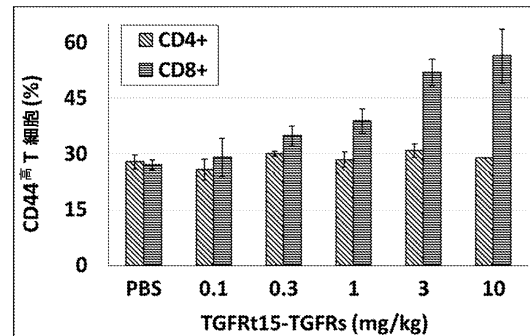


C

【図 1 7 9】



【図 1 8 0】



10

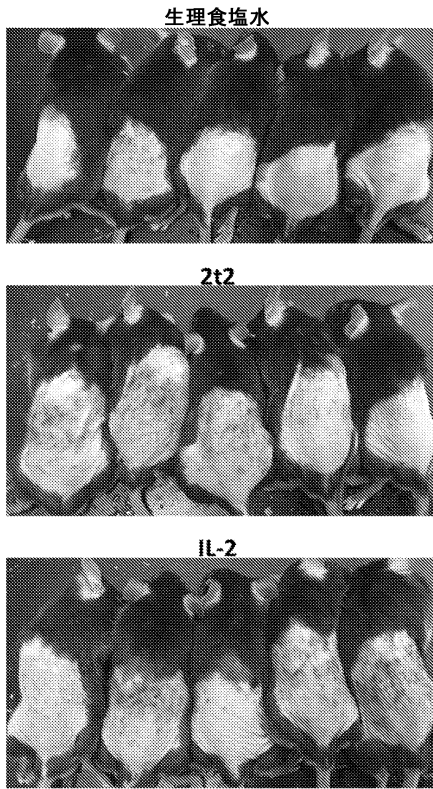
20

30

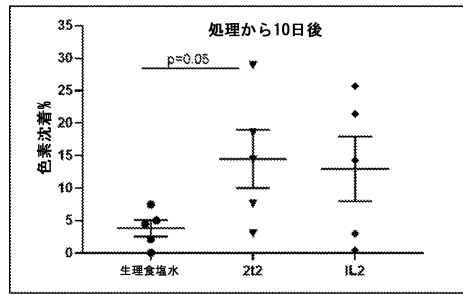
40

50

【図 1 8 1 A】



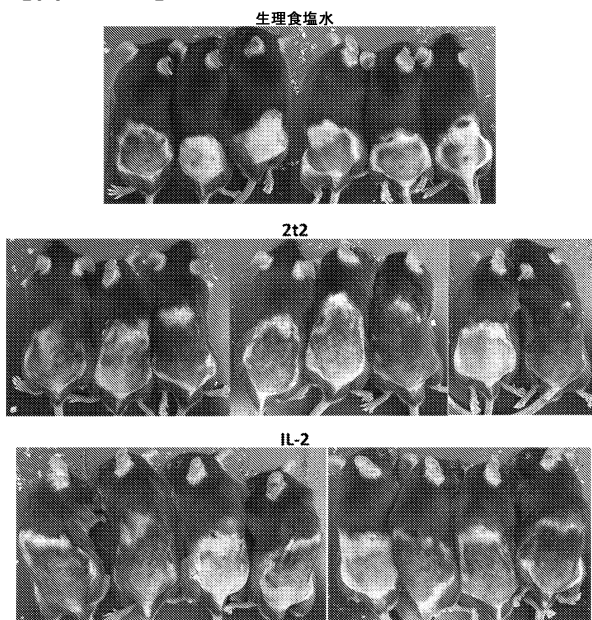
【図 1 8 1 B】



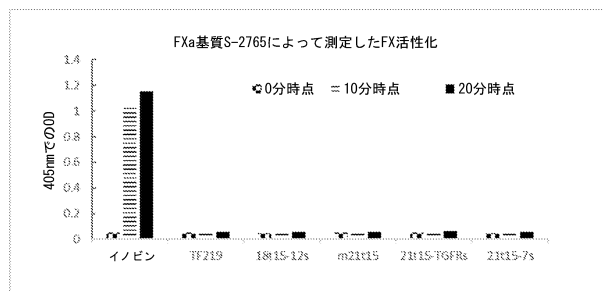
10

20

【図 1 8 2】



【図 1 8 3】

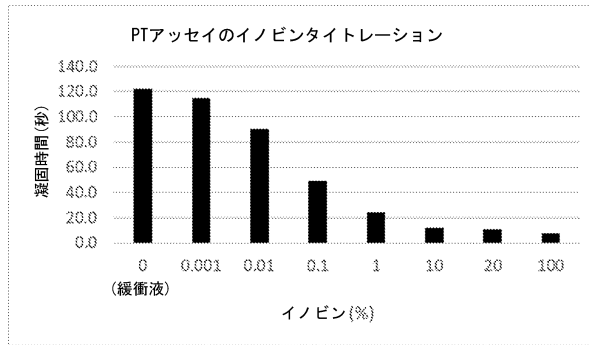


30

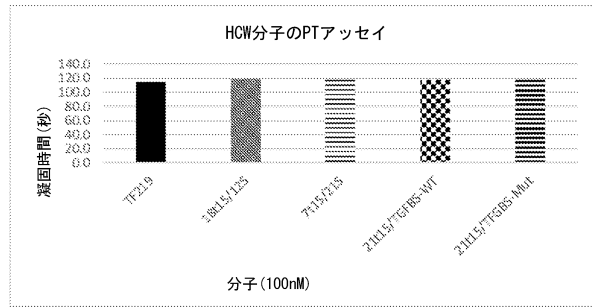
40

50

【図 184】

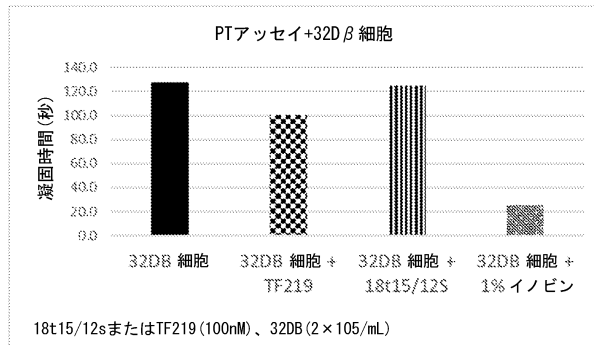


【図 185】

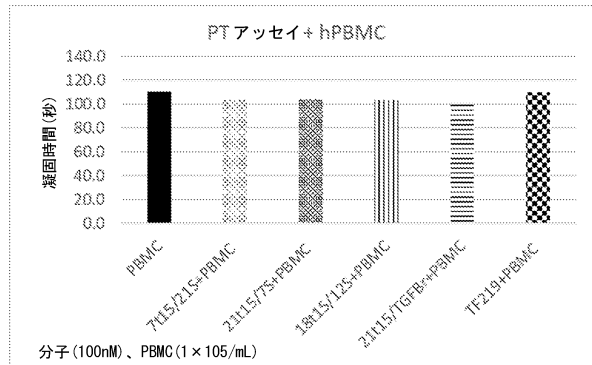


10

【図 186】

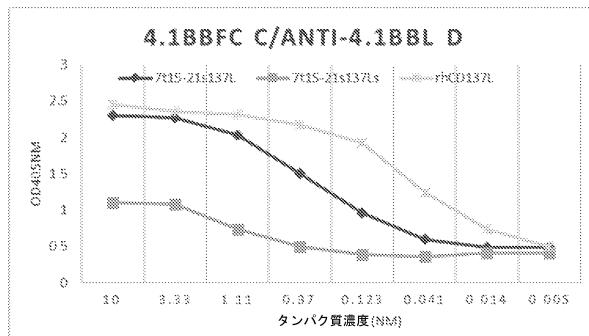


【図 187】

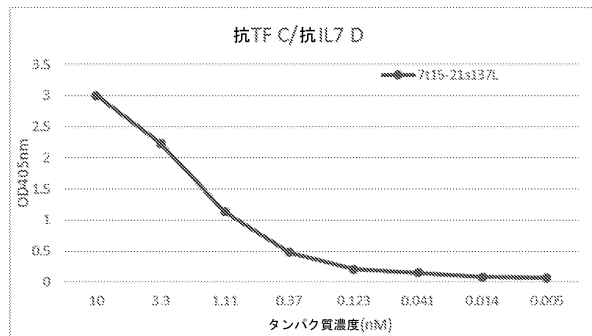


20

【図 188】



【図 189 A】

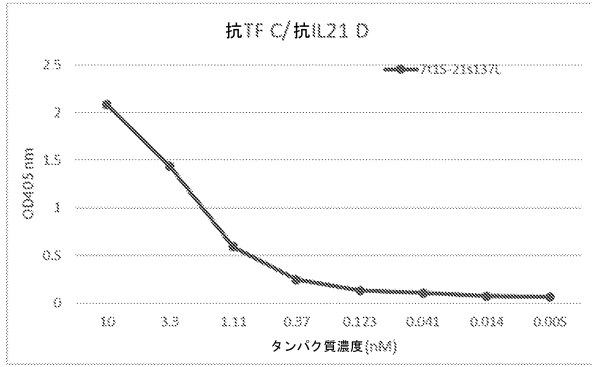


30

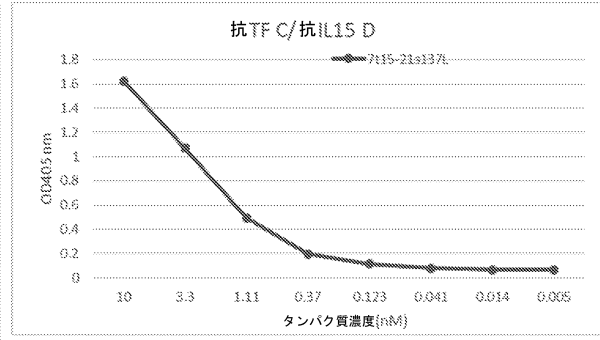
40

50

【図 1 8 9 B】

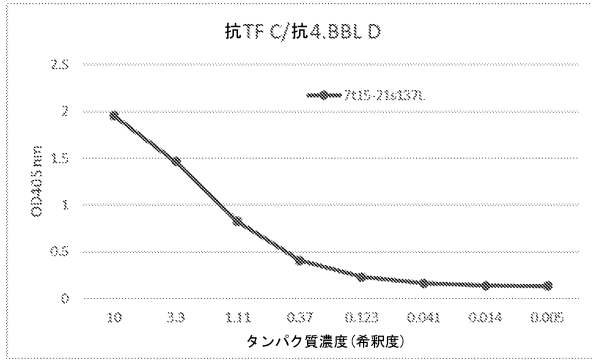


【図 1 8 9 C】



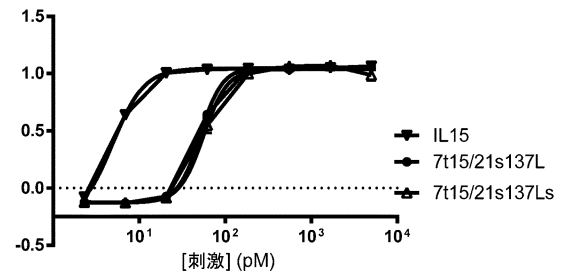
10

【図 1 8 9 D】



【図 1 9 0】

IL-15活性 (CTL2アッセイ 正規化した吸光度)



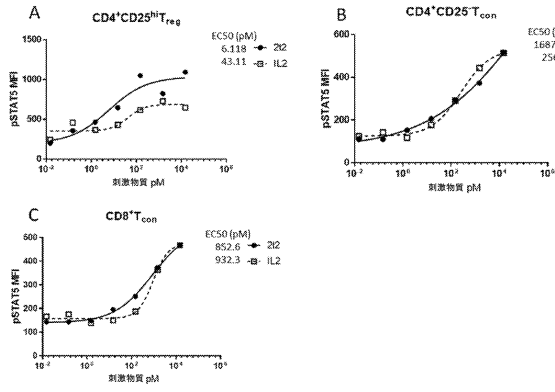
20

30

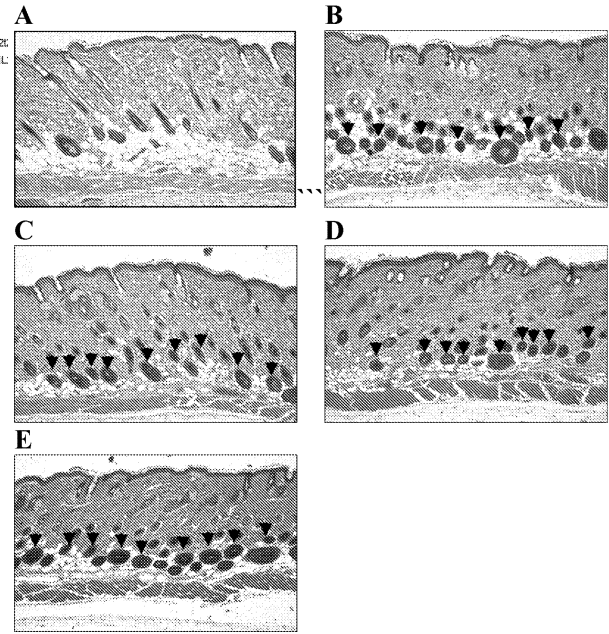
40

50

【図 1 9 1】

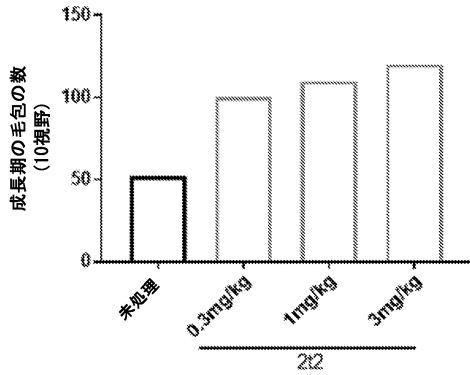


【図 1 9 2】

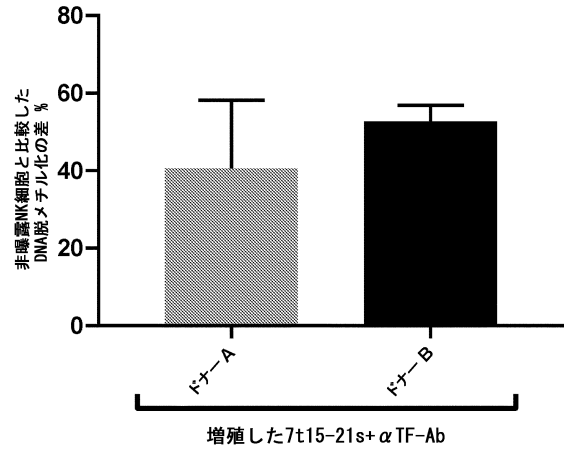


10

【図 1 9 3】



【図 1 9 4】



20

30

40

50

【配列表】
0007449292000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	14/715	(2006.01)	C 0 7 K	14/715	
C 0 7 K	14/71	(2006.01)	C 0 7 K	14/71	
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/725,043

(32)優先日 平成30年8月30日(2018.8.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/725,010

(32)優先日 平成30年8月30日(2018.8.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/746,832

(32)優先日 平成30年10月17日(2018.10.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/749,007

(32)優先日 平成30年10月22日(2018.10.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/749,506

(32)優先日 平成30年10月23日(2018.10.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/816,683

(32)優先日 平成31年3月11日(2019.3.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/817,230

(32)優先日 平成31年3月12日(2019.3.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/817,244

(32)優先日 平成31年3月12日(2019.3.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/817,241

(32)優先日 平成31年3月12日(2019.3.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/881,088

(32)優先日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/881,039

(32)優先日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ウォン ヒン

アメリカ合衆国 3 3 0 2 5 フロリダ州 ミラマー ノース コマース パークウェイ 2 9 2 9

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 8 / 0 7 5 9 8 9 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 6 7 8 2 5 (WO, A 1)

特許第 4 3 6 1 1 3 3 (JP, B 2)

RIPPMANN J F; ET AL, FUSION OF THE TISSUE FACTOR EXTRACELLULAR DOMAIN TO A TUMOUR STROMASPECIFIC SINGLE-CHAIN FRAGMENT VARIABLE ANTIBODY RESULTS IN AN ANTIGEN-SPECIFIC COAGULATION-PROMOTING MOLECULE, BIOCHEMICAL JOURNAL, BIOCHEMICAL SOCIETY, 2000年08月, VOL:349, NR:3, PAGE(S):805-812, <https://doi.org/10.1042/bj3490805>

NILSSON F; ET AL, TARGETED DELIVERY OF TISSUE FACTOR TO THE ED-B DOMAIN OF FIBRONECTIN, A MARKER OF ANGIOGENESIS, MEDIATES THE INFARCTION OF SOLID TUMORS IN MICE, CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2001年01月15日, VOL:61, NR:2, PAGE(S):711-716, <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/61/2/711.full.pdf>

HELFRICH W; ET AL, A RAPID AND VERSATILE METHOD FOR HARNESSING SCFV ANTIBODY FRAGMENTS WITH VARIOUS BIOLOGICAL EFFECTOR FUNCTIONS, JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., 2000年04月, VOL:237, NR:1-2, PAGE(S):131-145, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00220-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00220-3)

MOLEMA G; ET AL, THE USE OF BISPECIFIC ANTIBODIES IN TUMOR CELL AND TUMOR VASCULATURE DIRECTED IMMUNOTHERAPY, JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, NL, ELSEVIER, 2000年02月, VOL:64, NR:1-3, PAGE(S):229-239, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00137-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00137-6)

X-B WANG, A NEW RECOMBINANT SINGLE CHAIN TRISPECIFIC ANTIBODY RECRUITS T LYMPHOCYTES TO KILL CEA (CARCINOMA EMBRYONIC ANTIGEN) POSITIVE TUMOR CELLS IN VITRO EFFICIENTLY, JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2004年04月, VOL:135, NR:4, PAGE(S):555-565, <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvh065>

Cancer Res., 2009年, vol.69, no.12, p.5126-5132

Biochem. J., 2000年, vol.349, p.805-812

Cancer Res., 2001年, vol.61, no.2, p.711-716

Protein Eng. Des. Sel., 2010年, vol.24, no.4, p.373-383

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 3 8 /

A61P 35/00

C07K 16/

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed