

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7244428号**  
**(P7244428)**

(45)発行日 令和5年3月22日(2023.3.22)

(24)登録日 令和5年3月13日(2023.3.13)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/63 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/63	Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	Z N A
C 0 7 K	14/705 (2006.01)		C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)		C 0 7 K	14/47	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)		C 1 2 N	15/62	Z

請求項の数 20 (全60頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-546141(P2019-546141)  
 (86)(22)出願日 平成30年2月27日(2018.2.27)  
 (65)公表番号 特表2020-508066(P2020-508066  
 A)  
 (43)公表日 令和2年3月19日(2020.3.19)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/020038  
 (87)国際公開番号 WO2018/157163  
 (87)国際公開日 平成30年8月30日(2018.8.30)  
 審査請求日 令和3年2月26日(2021.2.26)  
 (31)優先権主張番号 62/463,999  
 (32)優先日 平成29年2月27日(2017.2.27)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73)特許権者 519302132  
 シャタック ラボ, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 78701 テキサス  
 オースティン、ウェスト 5 ストリート  
 500、スイート 1200  
 (74)代理人 100084995  
 弁理士 加藤 和詳  
 (72)発明者 シュライバー, ティラー  
 アメリカ合衆国, テキサス州 7870  
 3, オースティン, 3317 ボーマン  
 アベニュー  
 フロム, ジョージ  
 アメリカ合衆国, テキサス州 7870  
 3, オースティン, 3317 ボーマン  
 アベニュー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 V S I G 8 ベースのキメラタンパク質

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

N末端 - (a) - (b) - (c) - C末端の一般構造を含む異種キメラタンパク質であつて、ここで、

(a)は、V S I G 8 (V-set and immunoglobulin domain-containing protein 8)リガンドに結合できるV S I G 8 の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり；

(c)は、OX40L受容体に結合できるOX40リガンド(OX40L)の細胞外ドメインを含む第2のドメインであり；

(b)は、前記第1のドメイン及び前記第2のドメインを連結しつゝIgG4由来のヒンジ - CH2 - CH3 Fcドメインを含むリンカーであり、前記リンカーは、配列番号28~74のアミノ酸配列から独立に選択される1又は複数の結合リンカーをさらに含む、異種キメラタンパク質。

**【請求項 2】**

前記V S I G 8 の細胞外ドメインが、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%以上同一のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の異種キメラタンパク質。

**【請求項 3】**

前記OX40Lの細胞外ドメインが、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも95%以上同一のアミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載の異種キメラタンパク質。

**【請求項 4】**

前記リンカーが、ヒトIgG4由来のヒンジ - CH2 - CH3 Fcドメインを含む、

請求項 1 ~ 3のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

【請求項 5】

前記キメラタンパク質が、分泌可能で機能的な单一ポリペプチド鎖として哺乳動物宿主細胞により発現される、請求項 1 ~ 4のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

【請求項 6】

前記 V S I G 8 の細胞外ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を有する；

前記 O X 4 0 L の細胞外ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を有する；及び / 又は

前記リンカーが、配列番号 25、配列番号 26、又は配列番号 27 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 ~ 5のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

【請求項 7】

前記 V S I G 8 の細胞外ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列を有し；

前記 O X 4 0 L の細胞外ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列を有し；かつ

前記リンカーが、配列番号 25、配列番号 26、又は配列番号 27 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、

請求項 6に記載の異種キメラタンパク質。

【請求項 8】

前記リンカーが、各々配列番号 28 ~ 74 から独立して選択される 2 以上の結合リンカーを含み、1つの結合リンカーがヒンジ - C H 2 - C H 3 F c ドメインに対して N 末端であり、かつ別の結合リンカーがヒンジ - C H 2 - C H 3 F c ドメインに対して C 末端である、請求項 1 ~ 7のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

【請求項 9】

前記キメラタンパク質が、組換え融合タンパク質である、請求項 1 ~ 8のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質を治療有効量含む、医薬組成物。

【請求項 11】

対象の癌又は炎症性疾患を治療するため、又は対象の免疫応答を調節するため、請求項 10に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

N 末端 - ( a ) - ( b ) - ( c ) - C 末端の一般構造を含む組換え融合タンパク質であつて、ここで、

( a ) は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一でありかつ V S I G 8 リガンドに結合できる V S I G 8 の細胞外ドメインを含む第 1 のドメインであり、

( b ) は、前記第 1 のドメイン及び第 2 のドメインを連結しかつヒト I g G 4 に由来するヒンジ - C H 2 - C H 3 F c ドメインを含むリンカーであり、前記リンカーは、配列番号 28 ~ 74 のアミノ酸配列から独立に選択される 1 又は複数の結合リンカーをさらに含み、かつ

( c ) は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一でありかつ O X 4 0 L 受容体に結合できる C D 4 0 リガンド ( O X 4 0 L ) の細胞外ドメインを含む第 2 のドメインである、

組換え融合タンパク質。

【請求項 13】

前記リンカーが、さらに配列番号 28 ~ 74 から選択されるアミノ酸配列を有する 2 以上の結合リンカーを含む、請求項 12に記載の組み換え融合タンパク質。

10

20

30

40

50

**【請求項 14】**

前記リソルバーが、配列番号25、配列番号26、又は配列番号27のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である配列を含む、請求項12又は13に記載の組換え融合タンパク質。

**【請求項 15】**

請求項12～14のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質を含む医薬組成物。

**【請求項 16】**

癌の治療での使用のための請求項15に記載の医薬組成物。

**【請求項 17】**

炎症性疾患の治療での使用のための、請求項15に記載の医薬組成物。

**【請求項 18】**

請求項1～8のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質、又は請求項12～14のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質をコードする核酸。

10

**【請求項 19】**

請求項18に記載の核酸を含む発現ベクター。

**【請求項 20】**

請求項18に記載の核酸、又は請求項19に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****優先権**

本出願は、2017年2月27日出願の米国仮出願第62/463,999号の利益及び優先権を主張するものであり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

**【0002】****電子的に送信されたテキストファイルの説明**

本出願は配列リストを含有する。配列リストは、「SHK-003PC\_Sequence  
c e L i s t i n g \_ S T 25」というタイトルのASCIIテキストファイルとしてE  
F S - W e b を介して電子的に送信された。配列リストは81,752バイトのサイズで  
あり、2018年2月27日頃に作成された。配列リストは、参照によりその全体が本明  
細書に組み込まれる。

30

**【0003】****技術分野**

本発明は、部分的に、Vセット及び免疫グロブリンドメイン含有タンパク質8(VSI  
G8)の細胞外ドメインを含むキメラタンパク質並びに癌及び/又は炎症性疾患のための  
免疫療法などの、疾患の治療におけるそれらの使用に関する。

**【背景技術】****【0004】****背景**

最近の臨床データは、例えば、ヤーボイYERVOY、キイトルーダ(KEYTRUDA)  
A)、及びオプジーボ(Opdivo)の承認につながった臨床試験を含む、免疫共阻害  
分子を標的とする薬剤への印象的な患者の応答を実証した。これらの免疫療法は、チェック  
ポイント阻害剤として集合的に特徴付けられ、不運にも、これらの治療法は、癌患者の  
約15～30%のみに臨床的利益を提供する。より広い癌患者の集団のための臨床応答率  
を改善するための1つの潜在的なアプローチは、別の治療法とチェックポイント阻害剤療  
法を組み合わせることを含む。そのような組み合わせは、複数の個々の治療薬を使用して  
適用される場合に、臨床上の利益の向上をもたらすが、開発が厄介である。さらに、多くの  
免疫療法は、治療のための患者の治療ウィンドウを大幅に狭める重篤な副作用を併発す  
る。

40

**【0005】**

単一薬物に複数の治療メカニズムを統合することを含む、効果的な免疫療法を提供する

50

新規な方法及び組成物が依然として必要とされている。

**【発明の概要】**

**【0006】**

**概要**

したがって、本発明は、部分的には、例えば、腫瘍微小環境において複数の抑制メカニズムを克服すること、及び免疫抗腫瘍メカニズムを刺激することによって、癌治療で使用される組成物及び方法を提供する。同様に、組成物及び方法は、炎症性疾患の治療に使用される。

**【0007】**

実施形態において、本キメラタンパク質は、単一構築物で免疫阻害シグナルをマスクし、かつ／又は免疫刺激シグナルを増強する。実施形態において、そのような免疫調節効果は、直接的な受容体／リガンド相互作用を介して達成される。

10

**【0008】**

例えば、本発明は、部分的には、同時に抗原提示細胞中でVISTA/VISIG8シグナル伝達を阻害しつつOX40/OX40Lシグナル伝達を刺激することを可能にする組成物及び方法を提供する。そのような同時に起こるVISIG8遮断及びOX40アゴニズムは、とりわけ、免疫阻害細胞の全体的な減少及びより炎症性の環境へのシフト並びに抗腫瘍効果の増大を引き起こす。

**【0009】**

態様において、本発明は、(a)Vセットの一部及びVSG8リガンドに結合できる免疫グロブリンドメイン含有タンパク質8(VSG8)を含む第1のドメイン；(b)OX40L受容体に結合できるOX40リガンド(OX40L)の一部を含む第2のドメイン；並びに(c)第1のドメイン及び第2のドメインを連結するリンカー、を含む異種キメラタンパク質を提供する。態様において、本発明は、この異種キメラタンパク質で癌を治療する方法を提供する。態様において、本発明は、この異種キメラタンパク質で炎症性疾患を治療する方法を提供する。

20

**【0010】**

態様において、本発明は、N末端-(a)-(b)-(c)-C末端の一般構造を含み、式中、(a)は配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一でありVSG8リガンドに結合できるVSG8の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、(b)は第1のドメイン及び第2のドメインを連結しヒトIgG4に由来するヒンジ-CH2-CH3-Fcドメインを含むリンカーであり(例えば、配列番号25、配列番号26、又は配列番号27のアミノ酸配列と95%同一である)、並びに(c)は配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも95%同一でありOX40L受容体に結合できるOX40リガンド(OX40L)の細胞外ドメインを含む第2のドメインである、組換え融合タンパク質を提供する。実施形態において、本発明は、この異種キメラタンパク質で癌を治療する方法を提供する。実施形態において、本発明は、この異種キメラタンパク質で炎症性疾患を治療する方法を提供する。

30

**【0011】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、腫瘍又は任意の他の望ましくない細胞の免疫攻撃を優先して免疫細胞のバランスをシフトできるか、又はそれをシフトすることを伴う方法で使用される。例えば、本発明のキメラタンパク質は、腫瘍を死滅させることができる細胞(例えば、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、抗腫瘍マクロファージ(例えば、M1マクロファージ)、B細胞、及び樹状細胞)を優先し、かつ腫瘍を保護する細胞(例えば、骨髄由来サブレッサー細胞(MDSC)、制御性T細胞(Treg)、腫瘍関連好中球(TAN)、M2マクロファージ、及び腫瘍関連マクロファージ(TAM))に反して、臨床的に重要な部位で免疫細胞の割合をシフトさせることができる。実施形態において、キメラタンパク質は、CD8+T細胞による腫瘍抗原の認識を高め、かつ／又はこれらのT細胞による腫瘍浸潤を増強する。

40

50

**【 0 0 1 2 】**

態様において、本発明のキメラタンパク質及び／又は組換え融合タンパク質は、その必要がある患者に、キメラタンパク質を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、癌又は炎症性疾患を治療するための方法において使用される。癌治療の実施形態において、例えば、本発明のキメラタンパク質及び／又は組換え融合タンパク質は、免疫記憶応答をもたらす。

**【 0 0 1 3 】**

態様は、例えば、癌及び／又は炎症性疾患を治療するための、医薬の製造における、本発明のキメラタンパク質及び／又は組換え融合タンパク質の使用を含む。

**【 0 0 1 4 】**

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

**【図面の簡単な説明】****【 0 0 1 5 】**

**【図1A】**理論に縛られることなく、その3つのドメインのそれぞれがその予測された天然の状態にある、ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のコンピューター予測2次構造を示す。キメラタンパク質の予測分子量は約 6 8 . 1 k D a である。

**【図1B】**腫瘍細胞とT細胞の間にキメラタンパク質によって形成されたシナプスを示す。  
**【図2】**非還元条件下、還元条件下、及び還元／脱グリコシル化（P N Gアーゼ）条件下でのウェスタンプロット分析によるヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質の特徴付けを示す。具体的には、キメラ構築物の各個々のドメインを、抗V S I G 8、抗F c、又は抗O X 4 0 L 抗体を用いてプローブした。h V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質の未処理試料、例えば、対照を、全プロットのレーン2にロードした（-メルカプトエタノール又はP N Gアーゼを含まない）。全プロットのレーン3の試料を、還元剤、-メルカプトエタノールで処理し、全プロットのレーン4の試料をアミダーゼペプチド：N - グリコシダーゼ酵素で処理した。バンドサイズは、約 6 8 . 1 k D a の予想単量体分子量を裏付け、キメラタンパク質の天然の状態はグリコシル化二量体であることを示唆する。

**【図3】**ヒトI g G（左パネル）及び組換えO X 4 0（右パネル）へのヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L の結合を実証する機能的E L I S Aのグラフを示す。

**【図4】**O X 4 0 発現細胞株（すなわち、ヒトO X 4 0 を過剰発現するように工学処理されたJ u r k a t 細胞）へのヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L のインビトロ細胞結合を示すグラフである。結合をインビトロで行い、フローサイトメトリーによって分析した。

**【図5】**ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L に対するo c t e t の結合親和性を示すグラフである。O X 4 0 へのV S I G 8 - F c - O X 4 0 L の結合親和性を、市販の片面ヒトF c - O X 4 0 L 対照又はタボリクマブ（t a v o l i x u m a b ）（抗ヒトO X 4 0 抗体）と比較して、バイオレイヤー干渉法（O c t e t ）により測定した。データは、V S I G 8 - F c - O X 4 0 L が、7 6 7 p M（上の曲線：タボリクマブ、中央の曲線：V S I G 8 - F c - O X 4 0 L 、下の曲線：片面ヒトF c - O X 4 0 L ）で測定した時に、高親和性でヒトO X 4 0 に結合することを示す。

**【図6】**ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質を用いる、インビトロN F - / N I Kシグナル伝達アッセイを示すグラフである。D i s c o v e r X N I K シグナル伝達アッセイからのU 2 O S 細胞を、3 0 μ g / mL の市販の片面F c - O X 4 0 L 、抗O X 4 0 抗体、抗O X 4 0 L 抗体、又はh V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のいずれかと培養した。バーは、左から右へ、片面F c - O X 4 0 L 、抗O X 4 0 L 抗体、抗O X 4 0 抗体、及びh V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質である。

**【図7】**ブドウ球菌エンテロトキシンB（S E B）スーパー抗原活性化／サイトカイン放出アッセイを示すグラフである。ヒトP B M Cを、市販の片側ヒトF c - O X 4 0 L 、市販の片側V S I G 8 - F c 、2つの片側分子の組み合わせ、又はヒトV S I G 8 - F c -

10

20

30

40

50

O X 4 0 L キメラタンパク質の滴定のあり／なしで、ブドウ球菌エンテロトキシンB（200 ng / mL）と培養した。3日後に、上清を、ヒトIL2に特異的なELISAを用いて評価した。

【図8】非還元条件下、還元条件下、及び還元／脱グリコシル化（PNGアーゼ）条件下でのウェスタンプロット分析によるヒトVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の特徴付けを示す。バンドサイズは、予想単量体分子量が約68.1kDaであることを裏付け、キメラタンパク質の天然の状態はグリコシル化二量体であることを示唆する。

【図9A-C】それぞれの結合パートナーに対するマウスVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。図9Aは、VSG8の結合パートナーであるVISTAへのmVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の結合及び検出を示す。市販のmVSG8-Fc標準物質はないため、標準曲線を作成しなかった。図9Bは、プレートに結合した抗ヒトIgG抗体へのmVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質のFc部分の結合及び検出を示す。マウスIg（mIg）を標準物質（円の記号）として使用した。検出は、HRPコンジュゲート抗ヒトIgG抗体を介した。ELISAアッセイにおいて一般的に、中央Fc領域を用いてキメラタンパク質を検出すると、試料中の実際のタンパク質含有量を過小評価する傾向があることが観察された。したがって、標準物質（円の記号）と比較して低レベルのVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質（四角の記号）が検出された。図9Cは、OX40Lの結合パートナーである、プレートに結合した組換えマウスOX40への、mVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の結合及び検出、並びにOX40L特異的抗体を介する検出を示す。マウスOX40Lを標準物質（円の記号）として使用した。

【図10A-B】VISTA発現細胞株及びOX40発現細胞株へのマウスVSG8-Fc-OX40Lのインピトロ細胞結合アッセイを示すグラフである。不死化細胞株を工学処理して（図10A）マウスVISTA（EL4-mVISTA）又は（図10B）マウスOX40（CHOK1-mOX40）を安定に発現させた。漸増濃度のmVSG8-Fc-OX40Lを、各親細胞株及び過剰発現細胞株と2時間インキュベートした。細胞を収集し、洗浄し、フローサイトメトリーによるキメラタンパク質結合の検出用の抗体で染色した。全ての工学処理細胞株は、低いnMのインピトロ細胞結合親和性で、濃度依存的にmVSG8-Fc-OX40Lに結合した。CHOK1/mOX40へのmVSG8-Fc-OX40Lの結合親和性は16nMであり、EL4/mVISTAへのmVSG8-Fc-OX40Lの結合親和性は56nMであった。

【図11】マウスOX40-Hisに対するマウスVSG8-Fc-OX40Lの結合親和性のOctetベース評価を示すグラフである。10 μg/mLの市販のmFc-OX40L（下の曲線）又はmVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質（上の曲線）のいずれかが、組換えマウスOX40-hisでコーティングしたペンタHisバイオセンサーに結合した。

【図12】マウスVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質を用いるインピトロNF-Bルシフェラーゼシグナル伝達アッセイを示すグラフである。NF-Bルシフェラーゼ及びOX40を発現するように工学処理したJurkat細胞を、18nMの無関係のタンパク質（陰性対照、左のバー）、市販の片面Fc-OX40L（中央のバー）、又はmVSG8-Fc-OX40L（右のバー）のいずれかと培養した。

【図13A-C】マウスVSG8-Fc-OX40Lで処置した腫瘍担持マウスからの免疫表現型を示す。マウスに、0日目にCT26腫瘍を接種した。腫瘍が触知可能で、直径が少なくとも4~6mmになった時に、マウスを、150 μgのmVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の2回用量で処置した。免疫フェノタイプを、腫瘍移植後13日目に、各処置群からのマウスのサブセットの様々な組織にて行った。このデータは、mVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質で処置したマウスが、脾臓、腫瘍流入領域リンパ節（TDLN）、及び腫瘍において全CD4+T細胞のより高いパーセンテージを示し（図13A）、この増加は、大部分がCD4+CD25+T細胞における増

10

20

30

40

50

加から構成されたことを実証する（図13B）。さらなる分析を四量体染色によって行い、天然でCT26腫瘍により発現されるAH1腫瘍抗原を認識するCD8+T細胞の画分を分析した。脾臓内と腫瘍内の両方で、他のグループと比較してより高い割合のこれらのT細胞が、mVSIG8-Fc-OX40Lで処置したマウスにおいてAH1腫瘍抗原を認識することが見出された（図13C）。図13A～図13Cの各パネルについては、条件は、未処理か、又はマウスVSIG8-Fc-OX40Lでの処理である。

【図14A-C】結腸直腸CT26腫瘍に対するマウスVSIG8-Fc-OX40Lの抗腫瘍効果を示す。Balb/cマウスに、0日目にCT26腫瘍を接種した。腫瘍成長の4日後に、腫瘍の直径が4～5mmに達したときに、マウスを、対照抗体又はmVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質のいずれかで処置した。処置を次いで、7日目に再度繰り返した。図14Aは、各処置群についての個々の腫瘍成長曲線を示し、図14Bは、実験の50日目までの全体的な生存率を示し、図14Cは、各グループについてのグループサイズと治療結果をまとめた表である。

【図15】マウスVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質のELISAベースの抗薬物抗体（ADA）アッセイを示すグラフである。

【図16】例示的なキメラタンパク質（PD1-Fc-OX40L）の4つの潜在的な構成を示す。

【図17】非還元条件下、還元条件下、並びに還元条件かつその後のペプチド-N-グリコシダーゼF（PNGアーゼF）による処理下でSDS-PAGEにて泳動したPD-1-Fc-OX40Lキメラタンパク質のウェスタンプロットを示す。

【図18】サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）にて泳動したPD-1-Fc-OX40Lキメラタンパク質のクロマトグラフを示す。

【図19】非還元条件下（「-」）又は還元条件下（「+」）で泳動したPD-1-Fc-OX40Lキメラタンパク質のSDS-PAGE及びネイティブ（非SDS）PAGEゲルを示す。

【図20】リンカー中にFcドメインを欠くPD-1-No-Fc-OX40Lキメラタンパク質のネイティブ（非SDS）PAGEゲルを示す。

【図21】理論に縛られることなく、本発明のキメラタンパク質から六量体及びコンカマーを形成する方法のモデルを示す。

【図22】例示的なモジュラーリンカーに組み合わせができる結合リンカー及びFcリンカーを示す表である。示される例示的なモジュラーリンカーは、本明細書に記載の任意のI型とII型タンパク質並びに/又は本明細書に記載のI型とII型タンパク質の細胞外ドメインを組み合わされて、本発明のキメラタンパク質を形成できる。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0016】

###### 詳細な説明

本発明は、アミノ末端付近にVセット及び免疫グロブリンドメイン含有タンパク質8（VSIG8）の細胞外ドメインを含む工学処理キメラタンパク質の発見に一部基づいている。実施形態において、キメラタンパク質は、カルボキシ末端付近にOX40リガンド（OX40L）の細胞外ドメインをさらに含む。実施形態において、2つの細胞外ドメインは、リンカーによって連結される。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、腫瘍細胞上の免疫阻害シグナルを癌の有効な治療のための免疫刺激シグナルと置き換えて腫瘍細胞上の免疫阻害シグナルをマスクする。

##### 【0017】

###### キメラタンパク質

実施形態において、本発明は、免疫阻害受容体Vセット及び免疫グロブリンドメイン含有タンパク質8（VSIG8）の細胞外ドメインを含むように工学処理したキメラタンパク質に関する。VSIG8は、T細胞活性化（VISTA）のV領域免疫グロブリン含有サブレッサーの受容体として機能する1回膜貫通I型膜タンパク質である。具体的には、ヒトVSIG8タンパク質は、21個のアミノ酸のシグナル配列、242個のアミノ酸の

10

20

30

40

50

細胞外ドメイン（ECD）を含有する2つのIg様Vタイプ（免疫グロブリン様）ドメイン、21個のアミノ酸の膜貫通ドメイン、及び130個のアミノ酸の細胞質ドメインを含む414個のアミノ酸を含む。

【0018】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、ヒトのVSG8のドメイン、例えば、細胞外ドメインを含む。ヒトVSG8は、配列番号1のアミノ酸配列（配列番号2を含む細胞外ドメインのアミノ酸配列を有する）を含む。

【0019】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、本明細書に記載のVSG8（例えば、配列番号2）、又はその変異体若しくは機能断片の細胞外ドメインを含み得る。例えば、キメラタンパク質は、本明細書に記載のVSG8の細胞外ドメインのアミノ酸と少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少なくとも約62%、又は少なくとも約63%、又は少なくとも約64%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約66%、又は少なくとも約67%、又は少なくとも約68%、又は少なくとも約69%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約81%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約83%、又は少なくとも約84%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約88%、又は少なくとも約89%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有する上記のVSG8、又はその変異体若しくは機能断片の細胞外ドメインの配列を含み得る。

【0020】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、シグナルペプチド（例えば、配列番号1に提供されるような）が別のシグナルペプチドと置き換えられるVSG8の変異体細胞外ドメインを含み得る。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）又はヒト胚腎臓（HEK）細胞などのタンパク質生成細胞での発現のためにコドン最適化されたcDNAから発現されるVSG8の変異体細胞外ドメインを含み得る。

【0021】

実施形態において、VSG8の細胞外ドメインは、細胞外環境と相互作用できるタンパク質の部分を指す。実施形態において、VSG8の細胞外ドメインは、細胞の外部又は細胞膜にあるタンパク質の全アミノ酸配列である。実施形態において、VSG8の細胞外ドメインは、細胞の外部又は細胞膜にあり、当技術分野で公知の方法（例えば、インビトロリガンド結合及び／又は細胞活性化アッセイ）を用いてアッセイされ得るようなシグナル伝達及び／又はリガンド結合に必要とされるタンパク質のアミノ酸配列の一部である。

【0022】

実施形態において、VSG8の細胞外ドメインは、T細胞活性化のV領域免疫グロブリン含有サプレッサー（VISTA）に結合できるタンパク質の一部を指す。VISTAは、CD4+又はCD8+T細胞を含む休止T細胞の活性化を抑制することに関与する負のチェックポイント調節因子である。VSG8とVISTAの結合は、T細胞の活性化、増殖及び／又は免疫サイトカイン生成に対する抑制効果を誘導する。実施形態において、キメラタンパク質は、約1μ、約900nM、約800nM、約700nM、約600nM、約500nM、約400nM、約300nM、約200nM、約100nM、約90nM、約80nM、約70nM、約60nM、約55nM、約50nM、約45nM、約40nM、約35nM、約30nM、約25nM、約20nM、約15nM、約10nMを含む。

10

20

30

40

50

nM、又は約5nM、又は約1nM未満のKDでヒトVISTAに結合する(例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定した場合に)。実施形態において、キメラタンパク質は、約1nM、約900pM、約800pM、約700pM、約600pM、約500pM、約400pM、約300pM、約200pM、約100pM、約90pM、約80pM、約70pM、約60pM、約55pM、約50pM、約45pM、約40pM、約35pM、約30pM、約25pM、約20pM、約15pM、又は約10pM、又は約1pM未満のKDでヒトVISTAに結合する(例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定した場合に)。実施形態において、キメラタンパク質は、約200pM～約600pMのKDでヒトVISTAに結合する(例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定した場合に)。

10

#### 【0023】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫刺激分子OX40リガンド(OX40L)のドメイン、例えば、細胞外ドメインをさらに含む。OX40Lは、腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーに属するII型膜貫通糖タンパク質である。具体的には、ヒトOX40Lタンパク質は、アミノ末端細胞質ドメイン(アミノ酸1～23)及びカルボキシ末端細胞外ドメイン(アミノ酸51～183)を含む183個のアミノ酸を含む。

#### 【0024】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、ヒトOX40Lの細胞外ドメインを含む。ヒトOX40Lは、配列番号3のアミノ酸配列(配列番号4を含む細胞外ドメインのアミノ酸配列を有する)を含む。

20

#### 【0025】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、本明細書に記載のOX40L(例えば、配列番号4)、又はその変異体若しくはその機能断片の細胞外ドメインを含み得る。例えば、キメラタンパク質は、上記のOX40Lの細胞外ドメインのアミノ酸配列と少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少なくとも約62%、又は少なくとも約63%、又は少なくとも約64%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約66%、又は少なくとも約67%、又は少なくとも約68%、又は少なくとも約69%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約81%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約83%、又は少なくとも約84%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約88%、又は少なくとも約89%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有する上に提供したOX40L、又はその変異体若しくは機能断片の細胞外ドメインの配列を含み得る。

30

#### 【0026】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、シグナルペプチド(例えば、配列番号3に提供されるような)が別のシグナルペプチドと置き換えられるOX40Lの変異体細胞外ドメインを含み得る。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、CHO又はHEK細胞などのタンパク質生成細胞中での発現のためにコドン最適化されたcDNAから発現するOX40Lの変異体細胞外ドメインを含み得る。

40

#### 【0027】

実施形態において、OX40Lの細胞外ドメインは、細胞外環境と相互作用できるタンパク質の部分を指す。実施形態において、OX40Lの細胞外ドメインは、細胞の外部又は細胞膜にあるタンパク質の全アミノ酸配列である。実施形態において、OX40Lの細胞外ドメインは、細胞の外部又は細胞膜にあり、当技術分野で公知の方法を用いてアッセ

50

イされ得るシグナル伝達及び／又はリガンド結合に必要とされるタンパク質のアミノ酸配列の一部である。

#### 【0028】

実施形態において、OX40Lの細胞外ドメインは、OX40受容体に結合できるタンパク質の一部を指す。他のTNFスーパーファミリーメンバーと同様に、膜結合OX40Lはホモ三量体として存在する。OX40Lは、CD4+及び／又はCD8+T細胞並びにいくつかのリンパ系及び非リンパ系細胞上で主に発現するTNF受容体スーパーファミリーのメンバーであるOX40に結合する。証拠は、OX40-OX40L相互作用の主要な機能は、後期共刺激シグナルを伝達して活性化T細胞の生存及び増殖を促進し免疫応答を延長することであることを示唆する。

10

#### 【0029】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、約1μM、約900nM、約800nM、約700nM、約600nM、約500nM、約400nM、約300nM、約200nM、約100nM、約90nM、約80nM、約70nM、約60nM、約55nM、約50nM、約45nM、約40nM、約35nM、約30nM、約25nM、約20nM、約15nM、約10nM、又は約5nM、又は約1nM未満のKDでヒトOX40に結合する（例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定した場合に）。実施形態において、キメラタンパク質は、約1nM、約900pM、約800pM、約700pM、約600pM、約500pM、約400pM、約300pM、約200pM、約100pM、約90pM、約80pM、約70pM、約60pM、約55pM、約50pM、約45pM、約40pM、約35pM、約30pM、約25pM、約20pM、約15pM、又は約10pM、又は約1pM未満のKDでヒトOX40に結合する（例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定した場合に）。実施形態において、キメラタンパク質は、約200pM～約600pMのKDでヒトOX40に結合する（例えば、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法によって測定した場合に）。

20

#### 【0030】

実施形態において、キメラタンパク質は、本明細書に記載のタンパク質配列のいずれかに対して、1以上のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含み得る。実施形態において、キメラタンパク質は、本明細書に開示されるキメラタンパク質のアミノ酸配列のいずれか1つに対して約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100又はそれより多いアミノ酸変異を有する配列を含む。

30

#### 【0031】

実施形態において、1以上のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠損、及び切り詰めから独立して選択され得る。

#### 【0032】

実施形態において、アミノ酸変異は、アミノ酸置換であり、かつ保存的及び／又は非保存的置換を含み得る。

40

#### 【0033】

「保存的置換」は、例えば、極性、電荷、大きさ、溶解性、疎水性、親水性、及び／又は関与するアミノ酸残基の両親媒性の性質の類似性に基づいて行われ得る。20個の天然アミノ酸は、以下の6つの標準的なアミノ酸のグループ：(1)疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr；Asn、Gln；(3)酸性：Asp、Glu；(4)塩基性：His、Lys、Arg；(5)鎖の向きに影響を与える残基：Gly、Pro；及び(6)芳香族性：Trp、Tyr、Pheにグループ化できる。

#### 【0034】

本明細書で使用する「保存的置換」は、上に示す6つの標準的なアミノ酸のグループの同じグループ内にリストされた別のアミノ酸とのアミノ酸の交換として定義される。例え

50

ば、GluによるAspの交換は、そのように修飾されたポリペプチド中に1つの負電荷を保持する。加えて、グリシン及びプロリンは、-ヘリックスを破壊するそれらの能力に基づいて互いに置換され得る。

#### 【0035】

本明細書で使用する「非保存的置換」は、上に示す6つの標準的なアミノ酸のグループ(1)~(6)の異なるグループにリストされた別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。

#### 【0036】

実施形態において、置換はまた、非古典的アミノ酸(例えば、一般的に、セレノシステイン、ピロリシン、N-ホルミルメチオニン-アラニン、GABA及び-D-アミノレブリン酸、4-アミノベンゾイン酸(PABA)、一般的なアミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノブチル酸、-アミノイソブチル酸、4-アミノブチル酸、Abu、2-アミノブチル酸、-Abu、-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソブチル酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコスメ、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシリラニン、-アラニン、フルオロアミノ酸、-メチルアミノ酸、C-メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、及びアミノ酸類似体)を含み得る。

10

#### 【0037】

変異はまた、コドン縮重を考慮することを含む、遺伝コードを参照することによってキメラタンパク質のヌクレオチド配列に行われ得る。

20

#### 【0038】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、本明細書に記載の変異体であり得、例えば、本発明のキメラタンパク質は、本発明のキメラタンパク質のアミノ酸配列、例えば、配列番号5及び配列番号6の1以上と少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少なくとも約62%、又は少なくとも約63%、又は少なくとも約64%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約66%、又は少なくとも約67%、又は少なくとも約68%、又は少なくとも約69%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約81%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約83%、又は少なくとも約84%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約88%、又は少なくとも約89%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を有し得る。

30

#### 【0039】

実施形態において、キメラタンパク質はリンカーを含む。実施形態において、リンカーは、ジスルフィド結合を形成できる少なくとも1つのシステイン残基を含む。本明細書の他の場所で説明するように、ジスルフィド結合を形成できるそのような少なくとも1つのシステイン残基は、理論に縛られることなく、キメラタンパク質の適切な多量体状態を維持し効率的な生成を可能にすることに関与する。

40

#### 【0040】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、(a)Vセット及び免疫グロブリンドメイン含有タンパク質8(VSIG8)の一部、例えば、VISTAに結合できるVSIG8の細胞外ドメイン、を含む第1のドメイン、(b)OX40Lの一部、例えば、OX40に結合できるOX40Lの細胞外ドメイン、を含む第2のドメイン、必要に応じて、(c)第1のドメイン及び第2のドメインを連結するリンカー、を含む。

#### 【0041】

50

実施形態において、キメラタンパク質は、組換え融合タンパク質、例えば、本明細書に記載の細胞外ドメイン（及び、必要に応じてリンカー）を有する单一のポリペプチドである。例えば、実施形態において、キメラタンパク質は、細胞中で单一単位として翻訳される。実施形態において、キメラタンパク質は、複数のポリペプチド、例えばインビトロで、（例えば、本明細書に記載の1以上の合成リンカーを用いて）連結されて单一単位をもたらす、例えば、本明細書に記載の複数の細胞外ドメインの組換えタンパク質、を指す。実施形態において、キメラタンパク質は、1つのポリペプチドとして化学合成されるか、又は各ドメインが別々に化学合成され、次いで組み合わされ得る。実施形態において、キメラタンパク質の一部は翻訳され、一部は化学合成される。

## 【0042】

10

実施形態において、キメラタンパク質はリンカーを含む。実施形態において、リンカーは、天然に存在するマルチドメインタンパク質に由来し得るか、又は例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる *Chichilíら*, (2013), *Protein Sci.* 22(2):153-167, *Chenら*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369に記載の実験的リンカーである。実施形態において、リンカーは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる *Chenら*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369及び *Crastoら*, (2000), *Protein Eng.* 13(5):309-312に記載のものなどのデータベース及びコンピュータプログラムを設計するリンカーを用いて設計され得る。

## 【0043】

20

実施形態において、リンカーはPEGなどの合成リンカーである。

## 【0044】

実施形態において、リンカーはポリペプチドを含む。実施形態において、ポリペプチドは、約500アミノ酸長、約450のアミノ酸長、約400のアミノ酸長、約350のアミノ酸長、約300のアミノ酸長、約250のアミノ酸長、約200のアミノ酸長、約150のアミノ酸長、又は約100のアミノ酸長未満である。例えば、リンカーは、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、又は約2のアミノ酸長未満であり得る。実施形態において、リンカーは柔軟である。実施形態において、リンカーは硬い。

30

## 【0045】

実施形態において、リンカーは、実質的にグリシン及びセリン残基（例えば、約30%、又は約40%、又は約50%、又は約60%、又は約70%、又は約80%、又は約90%、又は約95%、又は約97%、又は約98%、又は約99%、又は約100%のグリシン及びセリン）で構成される。

## 【0046】

40

実施形態において、リンカーは、抗体（例えば、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4、及びIgA1及びIgA2）を含むIgG、IgA、IgD、及びIgE）のヒンジ領域を含む。IgG、IgA、IgD、及びIgEクラスの抗体に見られるヒンジ領域は、柔軟なスペーサーとして機能し、Fab部分が空間内で自由に移動することを可能にする。定常領域とは対照的に、ヒンジドメインは構造的に多様であり、免疫グロブリンクラス及びサブクラス間で配列と長さの両方が変化する。例えば、ヒンジ領域の長さ及び柔軟性は、IgGサブクラス間で変化する。IgG1のヒンジ領域はアミノ酸216～231を包含し、それが自由に柔軟であるため、Fab断片は、それらの対称の軸を中心に回転し2つの重鎖間のジスルフィド架橋の第1を中心とする球内を移動できる。IgG2はIgG1よりも短いヒンジを有し、12のアミノ酸残基及び4つのジスルフィド架橋を有する。IgG2のヒンジ領域は、グリシン残基を欠き、比較的短く、追加の重鎖間ジスルフィド架橋によって安定化された硬いポリプロリン二重らせん

50

を含有する。これらの特性は、IgG2分子の柔軟性を制限する。IgG3は、その特有の拡張ヒンジ領域（IgG1ヒンジの約4倍の長さ）によって他のサブクラスと異なり、62個のアミノ酸（21個のプロリン及び11個のシステインを含む）を含有し、柔軟性のないポリプロリン二重らせんを形成する。IgG3では、Fc断片はFc断片から比較的離れており、分子により高い柔軟性を与える。IgG3中の伸長したヒンジはまた、他のサブクラスと比較してより高いその分子量に関与する。IgG4のヒンジ領域はIgG1のヒンジ領域よりも短く、その柔軟性はIgG1及びIgG2の柔軟性の中間である。ヒンジ領域の柔軟性は、IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2の順序で減少すると報告されている。実施形態において、リンカーは、ヒトIgG4に由来し、二量体化（S228Pを含む）又はFcRn結合を増強するための1以上の変異を含有し得る。

10

#### 【0047】

結晶学的研究によると、免疫グロブリンヒンジ領域は、さらに3つの領域：上部ヒンジ領域、コア領域、及び下部ヒンジ領域に機能的に細分化できる。Shinら, 1992 Immuno logical Reviews 130: 87を参照されたい。上部ヒンジ領域は、CH<sub>1</sub>のカルボキシル末端～動きを制限するヒンジ中の第1の残基、一般に2つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合を形成する第1のシステイン残基、のアミノ酸を含む。上部ヒンジ領域の長さは、抗体のセグメントの柔軟性と相關する。コアヒンジ領域は重鎖間ジスルフィド架橋を含有し、下部ヒンジ領域は、CH<sub>2</sub>ドメインのアミノ末端に結合し、CH<sub>2</sub>中の残基を含む。野生型ヒトIgG1のコアヒンジ領域は、ジスルフィド結合形成によって二量体化すると、ピボットとして作用すると考えられる環状オクタペプチドを生じ、そのため柔軟性を与える、配列CPPC（配列番号48）を含有する。実施形態において、本リンカーは、任意の抗体（例えば、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4、及びIgA1及びIgA2）を含むIgG、IgA、IgD、及びIgE）の上部ヒンジ領域、コア領域、及び下部ヒンジ領域の1つ、又は2つ、又は3つを含む。ヒンジ領域はまた、炭水化物結合のための部位のいくつかの構造的に別個の種類を含む1以上のグリコシリ化部位を含有し得る。例えば、IgA1は、ヒンジ領域の17個のアミノ酸セグメント内に5つのグリコシリ化部位を含有し、分泌性免疫グロブリンに有利な性質と考えられる、腸プロテアーゼに対するヒンジ領域ポリペプチドの耐性を付与する。実施形態において、本発明のリンカーは、1以上のグリコシリ化部位を含む。

20

#### 【0048】

実施形態において、リンカーは、抗体（例えば、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4、及びIgA1及びIgA2）を含むIgG、IgA、IgD、及びIgE）のFcドメインを含む。実施形態において、リンカーは、ヒトIgG4抗体に由来するヒンジ-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>Fcドメインを含む。実施形態において、リンカーは、ヒトIgG1抗体に由来するヒンジ-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>Fcドメインを含む。実施形態において、Fcドメインは、新生児Fc受容体（FcRn）に対する親和性の増加及び結合の増強を示す。実施形態において、Fcドメインは、FcRnに対する親和性を増加させ、FcRnへの結合を増強する1以上の変異を含む。理論に縛られることなく、FcRnに対する親和性の増加及び結合の増強は、本発明のキメラタンパク質のインビボ半減期を増加させると考えられる。

30

#### 【0049】

実施形態において、Fcドメインリンカーは、アミノ酸残基250、252、254、256、308、309、311、416、428、433又は434（参照により明示的に本明細書に組み込まれるKabatら、免疫学的関心のあるタンパク質の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）、第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）のKabat番号付けに従う）での1以上のアミノ酸置換、又はそれらの等価物を含有する。実施形態において、アミノ酸残基250におけるアミノ酸置換はグルタミンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基252におけるアミノ酸置換は、チロシン、フェ

40

50

ニルアラニン、トリプトファン又はスレオニンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 254 におけるアミノ酸置換は、スレオニンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 256 におけるアミノ酸置換は、セリン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、又はスレオニンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 308 におけるアミノ酸置換は、スレオニンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 309 におけるアミノ酸置換は、プロリンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 311 におけるアミノ酸置換は、セリンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 385 におけるアミノ酸置換は、アルギニン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、ヒスチジン、リジン、アラニン又はグリシンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 386 におけるアミノ酸置換は、スレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リジン、アルギニン、イソロイシン、又はメチオニンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 387 におけるアミノ酸置換は、アルギニン、プロリン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、又はアラニンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 389 におけるアミノ酸置換は、プロリン、セリン又はアスパラギンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 416 におけるアミノ酸置換は、セリンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 428 におけるアミノ酸置換は、ロイシンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 433 におけるアミノ酸置換は、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリン、又はグルタミンとの置換である。実施形態において、アミノ酸残基 434 におけるアミノ酸置換は、ヒスチジン、フェニルアラニン、又はチロシンとの置換である。

#### 【0050】

実施形態において、Fc ドメインリンカー（例えば、IgG 定常領域を含む）は、アミノ酸残基 252、254、256、433、434、又は 436（参照により明示的に本明細書に組み込まれる Kabat ら、免疫学的関心のあるタンパク質の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）、第 5 版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) の Kabat 番号付けに従う）での置換などの 1 以上の変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、3 つの M252Y / S254T / T256E 変異又は YTE 変異を含む。別の実施形態において、IgG 定常領域は、3 つの H433K / N434F / Y436H 変異又は KFH 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、組み合わせでYTE 変異と KFH 変異を含む。

#### 【0051】

実施形態において、本発明の改変されたヒト化抗体は、（参照により明示的に本明細書に組み込まれる Kabat ら、免疫学的関心のあるタンパク質の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）、第 5 版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) の Kabat 番号付けに従って）アミノ酸残基 250、253、307、310、380、428、433、434、及び 435 における 1 以上の変異を含有する IgG 定常領域を含む。例示的変異は、T250Q、M428L、T307A、E380A、I253A、H310A、M428L、H433K、N434A、N434F、N434S、及び H435A を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、M428L / N434S 変異又は L S 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、N428L / N434S 変異又は L S 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、T250Q / M428L 変異又は Q L 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、N434A 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、T307A / E380A / N434A 変異又は A A A 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、I253A / H310A / H435A 変異又は IHH 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、組み合わせで H433K / N434F 変異を含む。実施形態において、IgG 定常領域は、M252Y / S254T /

10

20

30

40

50

T 2 5 6 E 変異と H 4 3 3 K / N 4 3 4 F 変異を含む。

【 0 0 5 2 】

I g G 定常領域における追加の例示的変異は、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Robbieら, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2013), 57(12):6147-6153, Dallal, Acquaら, JBC (2006), 281(33):23514-24, Dallal'Acquaら, Journal of Immunology (2002), 169:5171-80, Koら, Nature (2014) 514:642-645, Greivysら, Journal of Immunology. (2015), 194(11):5497-508、及び米国特許第7,083,784号に記載される。 10

【 0 0 5 3 】

実施形態において、リンカー中の Fc ドメインは、配列番号 25 (以下の表参照)、又は配列番号 25 と少なくとも 90%、又は 93%、又は 95%、又は 97%、又は 98%、又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。実施形態において、安定性及び/又は半減期を増加させるために、変異が配列番号 25 に行われる。例えば、実施形態において、リンカー中の Fc ドメインは、配列番号 26 (以下の表参照)、又は配列番号 26 と少なくとも 90%、又は 93%、又は 95%、又は 97%、又は 98%、又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な Fc 安定化変異体は S228P である。例示的な Fc 半減期延長変異体は、T250Q、M428L、V308T、L309P、及び Q311S であり、本リンカーは、これらの変異体の 1、又は 2、又は 3、又は 4、又は 5 個を含み得る。実施形態において、リンカー中の Fc ドメインは、配列番号 27 (以下の表参照)、又は配列番号 27 と少なくとも 90%、又は 93%、又は 95%、又は 97%、又は 98%、又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。 20

【 0 0 5 4 】

さらに、1 以上の結合リンカーは、リンカー中の Fc ドメイン (例えば、配列番号 25、配列番号 26、又は配列番号 27、又はそれらと少なくとも 90%、又は 93%、又は 95%、又は 97%、又は 98%、又は 99% の同一性を有するもののうちの 1 つ) と細胞外ドメインを連結するために使用され得る。例えば、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、又はそれらの変異体のうちの任意の 1 つが、本明細書に記載の細胞外ドメインと本明細書に記載のリンカーを連結し得る。必要に応じて、配列番号 28 ~ 74、又はそれらの変異体の任意の 1 つが、本明細書に記載の細胞外ドメインと本明細書に記載のリンカーの間に置かれる。 30

【 0 0 5 5 】

配列番号 25 ~ 74 のアミノ酸配列は、以下の表 1 に提供される。

【 0 0 5 6 】

## 【表 1】

表 1：例示的なリンカー（Fc ドメインリンカー及び結合リンカー）

配列番号	配列	
25	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTIS NATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	10
26	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTPHSDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISN ATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSGK	20
27	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTIS NATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSLGK	30
28	SKYGPPCPSCP	
29	SKYGPPCPPCP	
30	SKYGPP	
31	IEGRMD	
32	GGGVPRDCG	
33	IEGRMDGGGGAGGGG	
34	GGGSGGGS	
35	GGGSGGGGGGG	
36	EGKSSGSGSESKST	
37	GGSG	
38	GGSGGGGGGGSG	
39	EAAAKEAAAKEAAAK	
40	EAAAAREAAAAREAAR	
41	GGGGSGGGGGGGGSAS	
42	GGGGAGGGG	
43	GS 又は GGS 又は LE	
44	GSGSGS	40

45	GSGSGSGSGS
46	GGGGSAS
47	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
48	CPPC
49	GGGGS
50	GGGGSGGGGS
51	GGGGSGGGSGGGGS
52	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
53	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
54	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
55	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
56	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
57	GGSGGSGGGS
58	GGGGGGGG
59	GGGGGG
60	EAAAK
61	EAAAKEAAAK
62	EAAAKEAAAKEAAAK
63	AEAAAKEAAAKA
64	AEAAAKEAAAKEAAKA
65	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAKA
66	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKA
67	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAKA
68	PAPAP
69	KESGSVSSEQLAQFRSLD
70	GSAGSAAGSGEF
71	GGGSE
72	GSESG
73	GSEGS
74	GEGGSSEGSSGEGSSSEGGGSEGGSEGGSEGGS

10

20

30

40

## 【 0 0 5 7 】

実施形態において、結合リンカーは、実質的にグリシン及びセリン残基（例えば、約 3 0 %、又は約 4 0 %、又は約 5 0 %、又は約 6 0 %、又は約 7 0 %、又は約 8 0 %、又は約 9 0 %、又は約 9 5 %、又は約 9 7 %、約 9 8 %、又は約 9 9 %、又は約 1 0 0 % のグリシン及びセリン）を含む。例えば、実施形態において、結合リンカーは ( G l y 4 S e r ) <sub>n</sub> であり、式中、n は、約 1 ~ 約 8 、例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は 8 （それぞれ配列番号 4 9 ~ 配列番号 5 6 ）である。実施形態において、結合リンカー配列は G G S G G G G G G G G G G G S （配列番号 5 7 ）である。追加の例示的な結合リンカーは、配列 L E 、 ( G l y ) 8 （配列番号 5 8 ）、 ( G l y ) 6 （配列番号 5 9 ）、 (

50

E A A A K )<sub>n</sub> ( n = 1 ~ 3 ) ( 配列番号 6 0 ~ 配列番号 6 2 ) 、 A ( E A A A K )<sub>n</sub> A ( n = 2 ~ 5 ) ( 配列番号 6 3 ~ 配列番号 6 6 ) 、 A ( E A A A K )<sub>4</sub> A L E A ( E A A A K )<sub>4</sub> A ( 配列番号 6 7 ) 、 P A P A P ( 配列番号 6 8 ) 、 K E S G S V S S E Q L A Q F R S L D ( 配列番号 6 9 ) 、 G S A G S A A G S G E F ( 配列番号 7 0 ) 、 及び ( X P )<sub>n</sub> ( 式中、 X は、任意のアミノ酸、例えば、 A l a 、 L y s 、又は G l u である ) を有するリンカーを含むが、これらに限定されない。実施形態において、結合リンカーは G G S である。

#### 【 0 0 5 8 】

実施形態において、結合リンカーは、 G G G S E ( 配列番号 7 1 ) 、 G S E S G ( 配列番号 7 2 ) 、 G S E G S ( 配列番号 7 3 ) 、 G E G G S G E G S S G E G S S S E G G G S E G G G S E G G G S E G G S ( 配列番号 7 4 ) 、 及び 4 アミノ酸ごとの間隔で G 、 S 、及び E がランダムに配置される結合リンカーの 1 以上である。  
10

#### 【 0 0 5 9 】

実施形態において、キメラタンパク質は、図 2 2 に示すモジュラーリンカーを含む。

#### 【 0 0 6 0 】

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

#### 【 0 0 6 1 】

実施形態において、キメラタンパク質は、増強した安定性及びタンパク質半減期を示す。実施形態において、キメラタンパク質は、高い親和性で F c R n に結合する。実施形態において、キメラタンパク質は、約 1 n M ~ 約 8 0 n M の K D で F c R n に結合し得る。例えば、キメラタンパク質は、約 1 n M 、約 2 n M 、約 3 n M 、約 4 n M 、約 5 n M 、約 6 n M 、約 7 n M 、約 8 n M 、約 9 n M 、約 1 0 n M 、約 1 5 n M 、約 2 0 n M 、約 2 5 n M 、約 3 0 n M 、約 3 5 n M 、約 4 0 n M 、約 4 5 n M 、約 5 0 n M 、約 5 5 n M 、約 6 0 n M 、約 6 5 n M 、約 7 0 n M 、約 7 1 n M 、約 7 2 n M 、約 7 3 n M 、約 7 4 n M 、約 7 5 n M 、約 7 6 n M 、約 7 7 n M 、約 7 8 n M 、約 7 9 n M 、又は約 8 0 n M の K D で F c R n に結合し得る。実施形態において、キメラタンパク質は、約 9 n M の K D で F c R n に結合し得る。実施形態において、キメラタンパク質は、エフェクター機能を有する他の F c 受容体（すなわち、 F c R n 以外）に実質的に結合しない。  
30

#### 【 0 0 6 2 】

実施形態において、式 E C D 1 - 結合リンカー 1 - F c ドメイン - 結合リンカー 2 - E C D 2 ( 式中、 E C D 1 は V S I G 8 であり、 E C D 2 は O X 4 0 L である ) を有するキメラタンパク質は、 V S I G 8 - F c - O X 4 0 L として本開示で言及され得る。実施形態において、キメラタンパク質は、一方又は両方の結合リンカーを欠き、そのようなキメラタンパク質はまた、 V S I G 8 - F c - O X 4 0 L として本開示で言及され得る。これらのキメラタンパク質は、結合リンカーの一方又は両方を欠く場合がある。例示的な結合リンカー 1 s 、 F c ドメイン、及び結合リンカー 2 s は、上記の表 1 に記載されており、キメラタンパク質を形成するのに有用であり特異的な結合リンカー 1 s 、 F c ドメイン、及び結合リンカー 2 s を含むモジュラーリンカーは、図 2 2 に示される。  
40

#### 【 0 0 6 3 】

実施形態において、本方法は、例えば、再発を防止することが可能であり得る記憶応答をもたらす。

#### 【 0 0 6 4 】

実施形態において、キメラタンパク質は、式 N 末端 - ( a ) - ( b ) - ( c ) - C 末端 ( 式中、 ( a ) は V S I G 8 であり、 ( b ) は F c ドメインの少なくとも一部を含むリンカーであり、かつ ( c ) は O X 4 0 L である ) を有する融合タンパク質であり、本開示では V S I G 8 - F c - O X 4 0 L と呼ばれ得る。

#### 【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

実施形態において、キメラタンパク質は、マウスのリガンド／受容体に対し最適化され／それらを指向する。そのようなキメラタンパク質の例は、本明細書ではm V S I G 8 - F c - O X 4 0 Lとも呼ばれる、マウスV S I G 8 - F c - O X 4 0 Lである。

#### 【 0 0 6 6 】

実施形態において、キメラタンパク質は、ヒトのリガンド／受容体に対し最適化され／それらを指向する。そのようなキメラタンパク質の例は、本明細書ではh V S I G 8 - F c - O X 4 0 Lとも呼ばれる、ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 Lである。

#### 【 0 0 6 7 】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、V I S T A / V S I G 8 免疫阻害シグナル伝達経路を標的とする。実施形態において、キメラタンパク質は、V S I G 8へのV I S T A の結合によって媒介される免疫阻害シグナルの伝達を破壊、阻止、低減、及び／又は阻害する。実施形態において、免疫阻害シグナルは、免疫応答を減少又は排除するシグナルを指す。例えば、腫瘍学の状況では、そのようなシグナルは、抗腫瘍免疫を減少又は排除し得る。通常の生理的条件下で、阻害シグナルは、自己耐性の維持（例えば、自己免疫の予防）において、及び免疫系が病原性感染に反応しているときに組織を損傷から保護するためにも有用である。例えば、限定されないが、免疫阻害シグナルは、そのような阻害シグナルが遮断される場合に、細胞増殖、サイトカイン産生、細胞死滅活性又は食作用活性の増加を検出することによって特定され得る。

10

#### 【 0 0 6 8 】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、V S I G 8へのV I S T A 又は他の結合パートナーの結合によって媒介される免疫阻害シグナルの伝達を破壊、遮断、低減、及び／又は阻害する。実施形態において、キメラタンパク質はV I S T A に結合するが、免疫細胞（例えば、T 細胞）への阻害性シグナル伝達を破壊、遮断、低減、及び／又は阻害する。実施形態において、キメラタンパク質は、例えば、V I S T A を発現し免疫細胞（例えば、T 細胞）への阻害性シグナル伝達を破壊、遮断、低減、及び／又は阻害するリンパ球細胞に作用する。

20

#### 【 0 0 6 9 】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫阻害受容体／リガンド対であるV I S T A / V S I G 8 の結合を低減、破壊、又は除去できるか、又はそれを低減、破壊、又は除去することを含む方法で使用される。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、V S I G 8 及び／又はV I S T A 若しくは他の結合パートナーとのV S I G 8 の結合を阻止、低減、及び／又は阻害する。

30

#### 【 0 0 7 0 】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、O X 4 0へのO X 4 0 Lの結合によって媒介される免疫刺激シグナルを標的とする。実施形態において、キメラタンパク質は、O X 4 0へのO X 4 0 Lの結合によって媒介される免疫刺激シグナルの伝達を増強、増加、及び／又は刺激する。実施形態において、免疫刺激シグナルは、免疫応答を増強するシグナルを指す。例えば、腫瘍学の状況では、そのようなシグナルは抗腫瘍免疫を増強し得る。例えば、限定されないが、免疫刺激シグナルは、T 細胞のサブセットを含む、白血球の増殖、サイトカイン産生、死滅活性又は食作用活性を直接刺激することによって特定され得る。

40

#### 【 0 0 7 1 】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、O X 4 0へのO X 4 0 Lの結合によって媒介される免疫刺激シグナルの伝達を増強、増加、及び／又は刺激する。実施形態において、O X 4 0 Lの細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質は、O X 4 0 を発現する免疫細胞（例えば、T 細胞）に作用し、その免疫細胞（例えば、T 細胞）への刺激シグナル伝達を増強、増加、及び／又は刺激する。

#### 【 0 0 7 2 】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫刺激受容体／リガンド対であるO X 4 0 : O X 4 0 Lの結合を刺激又は増強できるか、又はそれを刺激又は増強すること

50

を含む方法で使用される。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、OX40及び／若しくはOX40Lの1以上とのOX40の結合を増加並びに／又は刺激する。

#### 【0073】

実施形態において、キメラタンパク質は、OX40L以外のII型タンパク質の細胞外ドメインを含む。例示的なII型タンパク質は、4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A、及びTRAILを含む。本発明は、キメラタンパク質、並びに以下のキメラタンパク質：VISIG8/4-1BBL、VISIG8/CD30L、VISIG8/CD40L、VISIG8/FasL、VISIG8/GITRL、VISIG8/LIGHT、VISIG8/TL1A、及びVISIG8/TRAILを使用する方法をさらに含む。実施形態において、キメラタンパク質は、VISIG8-Fc-4-1BBL、VISIG8-Fc-CD30L、VISIG8-Fc-CD40L、VISIG8-Fc-FasL、VISIG8-Fc-GITRL、VISIG8-Fc-LIGHT、VISIG8-Fc-TL1A、及びVISIG8-Fc-TRAILの1つの一般構造を有する。

10

#### 【0074】

4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A、及びTRAILのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号7、9、11、13、15、17、21、及び23を含む。

#### 【0075】

実施形態において、キメラタンパク質は、それぞれ、配列番号8、10、12、14、16、18、22、及び24を含む、4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A、及びTRAILの1つの細胞外ドメインを含む。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、本明細書に記載の4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A、若しくはTRAIL、又はその変異体若しくは機能断片の細胞外ドメインを含み得る。例えば、キメラタンパク質は、本明細書に記載の4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A、又はTRAILの細胞外ドメインのアミノ酸配列と少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少なくとも約62%、又は少なくとも約63%、又は少なくとも約64%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約66%、又は少なくとも約67%、又は少なくとも約68%、又は少なくとも約69%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約81%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約83%、又は少なくとも約84%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約88%、又は少なくとも約89%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有する上に提供する4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A、若しくはTRAIL、又はその変異体若しくは機能断片の細胞外ドメインの配列を含み得る。

20

#### 【0076】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、本明細書に記載の細胞外ドメインの変異体を含み、細胞外ドメイン、例えば、ヒト細胞外ドメイン、例えば、配列番号2、4、8、10、12、14、16、18、20、22、及び24の1以上の既知のアミノ酸又は核酸配列と少なくとも約60%、又は少なくとも約61%、又は少なくとも約62%、又は少なくとも約63%、又は少なくとも約64%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約66%、又は少なくとも約67%、又は少なくとも約68%、又は少なくとも約69%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%

30

40

50

、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約81%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約83%、又は少なくとも約84%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約88%、又は少なくとも約89%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含み得る。

**【0077】**

10

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、V S I G 8 の細胞外ドメイン（配列番号2）を含む。

**【0078】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、O X 4 0 L の細胞外ドメイン（配列番号4）を含む。

**【0079】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、C D 4 0 L の細胞外ドメイン（配列番号12）を含む。

**【0080】**

20

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、V S I G 8 の細胞外ドメイン（配列番号2）及びO X 4 0 L の細胞外ドメイン（配列番号4）を含む。

**【0081】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、V S I G 8 の細胞外ドメイン（配列番号2）及びC D 4 0 L の細胞外ドメイン（配列番号12）を含む。

**【0082】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、ヒトIgG4抗体配列からのヒンジ-C H 2 - C H 3 ドメイン（配列番号25、26、又は27）を含む。

**【0083】**

実施形態において、キメラタンパク質は、図22に示すモジュラーリンカーを含む。

**【0084】**

30

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、リンカーとしてヒトIgG4抗体配列からのヒンジ-C H 2 - C H 3 ドメインを使用する、V S I G 8 の細胞外ドメイン及びO X 4 0 L の細胞外ドメインを含む（このV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラは配列番号5である）。

**【0085】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、リンカーとしてヒトIgG4抗体配列からのヒンジ-C H 2 - C H 3 ドメインを使用する、V S I G 8 の細胞外ドメイン及びC D 4 0 L の細胞外ドメインを含む（このV S I G 8 - F c - C D 4 0 L キメラは配列番号6である）。

**【0086】**

40

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫阻害シグナルをマスキングする一方で、免疫細胞（例えば、T細胞）に免疫刺激を送達する。実施形態において、キメラタンパク質は、免疫活性化（例えば、T細胞活性化）の最終結果を有するシグナルを送達する。

**【0087】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫活性化（例えば、腫瘍に対する）を促進でき、かつそれを促進することを含む方法で使用できる。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫阻害を抑制でき（例えば、腫瘍が生き残ることを可能にする）、かつそれを抑制することを含む方法で使用できる。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、構築物のキメラ性質によって提供されるシグナル伝達の近接性に起

50

因する免疫活性化の改善及び／又は免疫阻害の抑制の改善を提供する。

**【 0 0 8 8 】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫応答の増幅を調節すること、例えば、エフェクター出力のレベルを調節できるか、又はそれを調節することを含む方法で使用できる。実施形態において、例えば、癌及び／又は炎症性疾患の治療に使用される場合、本発明のキメラタンパク質は、サイトカインの生成、増殖又は標的殺傷能力のレベルの増加を刺激することを含むが、これらに限定されない、T細胞応答の増幅を増加させるために、免疫阻害と比較して免疫刺激の程度を変える。

**【 0 0 8 9 】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、阻害リガンドをマスクしその免疫阻害リガンドを免疫刺激リガンドに置き換えることができるか、又はそれをマスクし置き換えることを含む方法で使用される。例えば、(i) V S I G 8 の細胞外ドメイン及び(ii) O X 4 0 L の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質構築物は、阻害性 V I S T A / V S I G 8 シグナルの破壊及びそれを刺激性 O X 4 0 L / O X 4 0 シグナルと置換することを可能にする。したがって、本発明のキメラタンパク質は、実施形態において、阻害性免疫シグナルを低下させること若しくは除去すること、かつ／又は免疫刺激シグナルを増加すること若しくは活性化することができるか、又は阻害性免疫シグナルを低下させ若しくは除去するかつ／又は免疫刺激シグナルを増加することを含む方法で使用される。例えば、阻害シグナルを保有する（ひいては、免疫応答を回避する）リンパ球又は他の細胞は、次いで腫瘍細胞を攻撃できるT細胞上で結合する正のシグナルと置換され得る。したがって、実施形態において、阻害性免疫シグナルは、本発明の構築物によってマスクされ、刺激性免疫シグナルが活性化される。そのような有益な特性は、本発明のキメラタンパク質の単一構築アプローチによって増強される。例えば、シグナル置換をほぼ同時にを行うことができ、シグナル置換は臨床的に重要な部位（例えば、腫瘍微小環境）で局所的であるよう調整される。実施形態において、構築物は、これらの官能基を良好に連結するために、陽性免疫刺激シグナルを封鎖又は阻害シグナルの近くに局在化する。この局所的な連結効果は、例えば、V I S T A ブロッキング抗体とO X 4 0 アゴニスト抗体の組み合わせと比較して、V S I G 8 - F c - O X 4 0 L 構築物の優れた性能を説明し得る。

**【 0 0 9 0 】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、免疫調節を増強し、回復し、促進し、かつ／又は刺激できるか、又はそれを増強し、回復し、促進し、かつ／又は刺激することを含む方法で使用される。実施形態において、本明細書に記載の本発明のキメラタンパク質は、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラー（N K）細胞、ナチュラルキラーT（N K T）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M 1マクロファージ）、B細胞、及び樹状細胞を含むが、これらに限定されない腫瘍細胞に対する1以上の免疫細胞の活性又は活性化を回復し、促進し及び／又は刺激する。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、非限定的な例として、生存促進シグナル；オートクリン又はパラクリン成長シグナル；p 3 8 MAPK、E R K、S T A T、J A K、A K T若しくはP I 3 K媒介性シグナル；抗アポトーシスシグナル；並びに／又は炎症性サイトカイン生成若しくはT細胞移動若しくはT細胞腫瘍浸潤の1以上を促進しかつ／又はそれに必要なシグナルを含む、1以上のT細胞固有シグナルを活性化し及び／又は刺激することを含み、T細胞の活性及び／若しくは活性化を増強し、回復し、促進し並びに／又は刺激する。

**【 0 0 9 1 】**

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、腫瘍若しくは腫瘍微小環境中のT細胞（限定されないが、細胞傷害性Tリンパ球、Tヘルパー細胞、ナチュラルキラーT（N K T）細胞を含む）、B細胞、ナチュラルキラー（N K）細胞、ナチュラルキラーT（N K T）細胞、樹状細胞、単球、及びマクロファージ（例えば、M 1及びM 2のうちの1以上）の1以上の増加を引き起こすことができるか、又はそれを引き起こすことを含む方法で使用される。実施形態において、キメラタンパク質は、C D 8 + T細胞、特に、腫瘍

10

20

30

40

50

微小環境に浸潤したT細胞による腫瘍抗原の認識を強化する。

【0092】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、特に、腫瘍及び／若しくは腫瘍微小環境（TME）内で、免疫抑制細胞（例えば、骨髄由来のサブレッサー細胞（MDS））、制御性T細胞（Treg）、腫瘍関連好中球（TAN）、M2マクロファージ、及び腫瘍関連マクロファージ（TAM）の動員を阻害でき、かつ／又は動員の減少を引き起こすことができ、又はそれらの動員を阻害するかつ／又は動員の減少を引き起こすことを含む方法で使用される。実施形態において、本療法は、M1マクロファージを優先するように腫瘍部位及び／又はTMEでM1対M2マクロファージの比率を変更し得る。

【0093】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、本明細書に記載の有効量のキメラタンパク質を対象に投与することを含む、T細胞の不活性化及び／若しくは腫瘍に対する免疫耐性を阻害する並びに／又は低下させることができ、かつそれを阻害する並びに／又は低下させることを含む方法で使用できる。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、IFN、TNF、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-17F、及びIL-22の1以上を含むが、これらに限定されない様々なサイトカインの血清レベルを増加させることができる。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、治療対象の血清中のIL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-22、TNF又はIFNを増強できる。そのようなサイトカイン応答の検出は、示されたキメラタンパク質について最適な投与レジメンを決定するための方法を提供し得る。

10

【0094】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、抗腫瘍CD8+及び／又はCD4+T細胞の細胞死を阻害し、阻止し及び／若しくは低下させるか；又は腫瘍促進性T細胞の細胞死を刺激し、誘導し、及び／若しくは増加させる。T細胞枯渇は、増殖機能及びエフェクター機能の進行性喪失を特徴とするT細胞機能障害の状態であり、クローン欠失に至る。したがって、腫瘍促進性T細胞は、多くの慢性感染症、炎症性疾患、及び癌の間に生じるT細胞機能障害の状態を指す。この機能不全は、不十分な増殖機能及び／又はエフェクター機能、阻害性受容体の持続的発現及び機能性エフェクター又は記憶T細胞の転写状態とは異なる転写状態によって定義される。枯渇は、感染症及び腫瘍の最適な制御を妨げる。加えて、抗腫瘍CD8+及び／又はCD4+T細胞は、腫瘍に対する免疫応答を開始できるT細胞を指す。例示的な腫瘍促進性T細胞は、Treg、1以上のチェックポイント阻害受容体を発現するCD4+及び／又はCD8+T細胞、Th2細胞及びTh17細胞を含むが、これらに限定されない。チェックポイント阻害受容体は、制御されない免疫応答を防止又は阻害する免疫細胞上で発現する受容体を指す。

20

【0095】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、制御性T細胞に対するエフェクタ－T細胞の比を増加させることができ、それを含む方法で使用できる。例示的なエフェクタ－T細胞は、ICOS+エフェクタ－T細胞；細胞傷害性T細胞（例えば、TCR、CD3+、CD8+、CD45RO+）；CD4+エフェクタ－T細胞（例えば、TCR、CD3+、CD4+、CCR7+、CD62Lhi、IL-7R/CD127+）；CD8+エフェクタ－T細胞（例えば、TCR、CD3+、CD8+、CCR7+、CD62Lhi、IL-7R/CD127+）；エフェクタ－記憶T細胞（例えば、CD62L低、CD44+、TCR、CD3+、IL-7R/CD127+、IL-15R+、CCR7低）；中央記憶T細胞（例えば、CCR7+、CD62L+、CD27+；又はCCR7hi、CD44+、CD62Lhi、TCR、CD3+、IL-7R/CD127+、IL-15R+）；CD62L+エフェクタ－T細胞；初期エフェクタ－記憶T細胞（CD27+CD62L-）及び後期エフェクタ－記憶T細胞（CD27-CD62L-）（それぞれTemE及びTemL）を含むCD8+エフェクタ－記憶T細胞（TEM）；CD127(+)/CD25(低/-)エフェクタ－T細胞；CD127(-)/CD25(-)

30

40

50

エフェクターT細胞；CD8<sup>+</sup>幹細胞記憶エフェクター細胞(TSCM)(例えば、CD44(低)CD62L(高)CD122(高)scara(+))；TH1エフェクターT細胞(例えば、CXCR3<sup>+</sup>、CXCR6<sup>+</sup>及びCCR5<sup>+</sup>；又はTCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL-12R<sup>+</sup>、IFN-R<sup>+</sup>、CXCR3<sup>+</sup>)、TH2エフェクターT細胞(例えば、CCR3<sup>+</sup>、CCR4<sup>+</sup>及びCCR8<sup>+</sup>；又はTCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL-4R<sup>+</sup>、IL-33R<sup>+</sup>、CCR4<sup>+</sup>、IL-17RB<sup>+</sup>、CRTTH2<sup>+</sup>)；TH9エフェクターT細胞(例えば、TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>)；TH17エフェクターT細胞(例えば、TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL-23R<sup>+</sup>、CCR6<sup>+</sup>、IL-1R<sup>+</sup>)；CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>エフェクターT細胞、CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>(-)</sup>エフェクターT細胞；並びにIL-2、IL-4及び/又はIFN- $\gamma$ を分泌するエフェクターT細胞を含む。例示的な制御性T細胞は、ICOS<sup>+</sup>制御性T細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>制御性T細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>制御性T細胞、CD4<sup>+</sup>CD25高制御性T細胞、TIM-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>制御性T細胞、リンパ球活性化遺伝子-3(LAG-3)<sup>+</sup>制御性T細胞、CTLA-4/CD152<sup>+</sup>制御性T細胞、ニューロピリン-1(Nrp-1)<sup>+</sup>制御性T細胞、CCR4<sup>+</sup>CCR8<sup>+</sup>制御性T細胞、CD62L(Lセレクチン)<sup>+</sup>制御性T細胞、CD45RB低制御性T細胞、CD127低制御性T細胞、LRRC32/GARP<sup>+</sup>制御性T細胞、CD39<sup>+</sup>制御性T細胞、GITR<sup>+</sup>制御性T細胞、LAP<sup>+</sup>制御性T細胞、1B11<sup>+</sup>制御性T細胞、BTLA<sup>+</sup>制御性T細胞、1型制御性T細胞(Tr1細胞)、Tヘルパータイプ3(Th3)細胞、ナチュラルキラーT細胞表現型の制御性細胞(NK Treg)、CD8<sup>+</sup>制御性T細胞、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>制御性T細胞及び/又はIL-10、IL-35、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、ガレクチン-1、IFN- $\gamma$ 及び/又はMCP-1を分泌する制御性T細胞を含む。

#### 【0096】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、エフェクターT細胞(例えば、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞)の増加を引き起こす。実施形態において、キメラタンパク質は、制御性T細胞(例えば、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞)の減少を引き起こす。

#### 【0097】

実施形態において、キメラタンパク質は、例えば、再発を防止するか、又は再発から動物を保護し、かつ/又は転移を防止するか、若しくは転移の可能性を低下させることができる場合がある記憶応答をもたらす。そのため、キメラタンパク質で処置された動物は、後に、キメラタンパク質での初期の治療後に関連抗原に暴露された場合に、腫瘍細胞を攻撃し、かつ/又は腫瘍の発症を防ぐことができる。したがって、本発明のキメラタンパク質は、活性腫瘍破壊と、再発を防止できる記憶応答をプログラミングするのに不可欠である腫瘍抗原の免疫認識の両方を刺激する。

#### 【0098】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、約12時間、約24時間、約48時間、約72時間又は約96時間又は約1週間又は約2週間以下の間、一過的にエフェクター免疫細胞を刺激でき、かつそれを刺激することを含む方法で使用できる。実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、約12時間、約24時間、約48時間、約72時間又は約96時間又は約1週間又は約2週間以下の間、一過的に制御性細胞若しくは免疫阻害細胞を枯渇させること又は阻害することができ、かつそれを枯渇させること又は阻害することを含む方法で使用できる。実施形態において、エフェクターT細胞の一過性刺激及び/又は免疫阻害細胞の一過性枯渇若しくは阻害は実質的に、患者の血流において、又は、例えば、骨髄、リンパ節、脾臓、胸腺、粘膜関連リンパ組織(MALT)、非リンパ組織などのリンパ組織を含む特定の組織/位置において、又は腫瘍微小環境において生じる。

#### 【0099】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、限定されないが、使用の容易さ及び生成の容易さを含む利点を提供する。これは、2つの異なる免疫療法剤が、2つの独立した製造プロセスの代わりに単一の製造プロセスを可能にする单一生成物に組み合わされる

10

20

30

40

50

ためである。加えて、2つの別々の薬剤の代わりの単一薬剤の投与は、より容易な投与及びより多くの患者のコンプライアンスを可能にする。

#### 【0100】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、分泌可能で完全に機能する単一ポリペプチド鎖として哺乳動物宿主細胞中で生成可能である。

#### 【0101】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は予期せず、遅いオフ速度 ( $K_d$  又は  $K_{off}$ ) で、それらのそれぞれの結合パートナーへの細胞外ドメイン成分の結合を提供する。実施形態において、これは、受容体のリガンドへの予想外に長い相互作用を提供し、その逆も同様である。そのような効果は、持続的な負のシグナルマスキング効果を可能にする。また、実施形態において、これは、例えば、エフェクター細胞が抗腫瘍効果のために十分に刺激されることを可能にするために、より長い正のシグナル効果を送達する。例えば、本発明のキメラタンパク質は、例えば、長いオフ速度結合を介して、T 細胞増殖を提供し、抗腫瘍攻撃を可能にするのに十分なシグナル伝達を可能にする。さらなる例として、本発明のキメラタンパク質は、例えば、長いオフ速度結合を介して、例えば、サイトカインなどの刺激シグナルの放出を提供するのに十分なシグナル伝達を可能にする。

10

#### 【0102】

本発明の薬剤によって促進される細胞の安定なシナプス（例えば、負のシグナルを有する細胞と腫瘍を攻撃するために刺激され得る T 細胞）は、腫瘍細胞を攻撃するように T 細胞を位置付けることかつ / 又は本発明のキメラタンパク質によってマスクされたものを超える負のシグナルを含む、腫瘍細胞が負のシグナルを送達するのを立体的に防ぐことなどの、腫瘍の縮小を優先する空間的な向きを提供する。

20

#### 【0103】

実施形態において、これは、キメラタンパク質の血清  $T_{1/2}$  と比較して、より長いオントーゲット（例えば、腫瘍内）半減期 ( $t_{1/2}$ ) を提供する。そのような性質は、キメラタンパク質の全身分布に関連する、オフターゲット毒性を低下させる利点の組み合わせを有し得る。

#### 【0104】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、迅速な応答及び潜在応答を提供する、二相免疫効果を提供する。例えば、OX40 を介する直接的な T 細胞共刺激又は VSG8 を介するシグナル伝達の阻害は、T 細胞（又は他の免疫細胞）によって媒介される抗腫瘍活性の即時の増強をもたらし、腫瘍の増殖及び拒絶の短期的な制御を向上させ得る。実施形態において、免疫細胞と VSG8 - Fc - OX40L の間の初期の二重の相互作用は、免疫プライミングの強度又は品質を変更し、長寿命の記憶 T 細胞免疫の発生の増強に寄与する。そのような事象は、確立された腫瘍の増強された長期の対照、又は平衡により腫瘍モデルにおいて明らかになり得る。場合によって、VSG8 - Fc - OX40L で処理することによりプログラムされた免疫応答は、分子の投与後長期において、遅延された腫瘍拒絶反応に寄与し得る。

30

#### 【0105】

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

40

#### 【0106】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、オフサイト及び / 又は全身の毒性を低下させる可能性を提供する。

#### 【0107】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、現在の免疫療法、例えば、本明細書に記載のチェックポイント分子に対する抗体に対し、低減された副作用、例えば、G1合併症を提供する。例示的な G1 合併症は、腹痛、食欲不振、自己免疫効果、便秘、けいれん、脱水、下痢、摂食問題、疲労、鼓腸、腹水 (fluid in the abdomen) 又は腹水 (ascites)、消化管 (GI) 腸内毒素症、GI 粘膜炎、炎症性腸疾

50

患、過敏性腸症候群（I B S - D 及び I B S - C ）、吐き気、痛み、便又は尿の変化、潰瘍性大腸炎、嘔吐、保持液からの体重増加、及び／又は衰弱を含む。

#### 【 0 1 0 8 】

疾患；治療方法、及び患者選択

実施形態において、本発明は、癌及び／又は腫瘍、例えば、癌及び／若しくは腫瘍の治療又は予防に関する。本明細書の他の場所で説明するように、癌の治療は、実施形態において、免疫阻害よりも免疫刺激を優先するように本発明のキメラタンパク質で免疫系を調節することを伴い得る。

#### 【 0 1 0 9 】

癌又は腫瘍は、身体の器官及びシステムの正常な機能を妨げる細胞の制御不能な増殖並びに／又は異常に増加した細胞生存率並びに／又はアポトーシスの阻害を指す。良性及び悪性の癌、ポリープ、過形成、並びに休眠腫瘍又は微小転移が含まれる。免疫系によって妨げられない異常増殖を有する細胞（例えば、ウイルス感染細胞）も含まれる。癌は、原発性癌又は転移性癌であり得る。原発性癌は、臨床的に検出可能になる原発部位の癌細胞の領域であり、原発性腫瘍であり得る。対照的に、転移性癌は、ある器官又は部分から別の非隣接器官又は部分への疾患の広がりであり得る。転移性癌は、局所的な領域で周囲の正常組織に浸透及び浸潤する能力を獲得する癌細胞によって引き起こされ得、新しい腫瘍を形成し、それは局所的な転移であり得る。癌はまた、リンパ及び／又は血管の壁を貫通する能力を獲得する癌細胞によって引き起こされる可能性があり、その後、癌細胞は、体内の他の部位及び組織に血流を介して循環できる（それによって循環腫瘍細胞である）。癌は、リンパ性の又は血行性の広がりなどのプロセスに起因し得る。癌はまた、別の部位で停止し、血管又は壁を通って再浸透し、増殖し続け、最終的に別の臨床的に検出可能な腫瘍を形成する腫瘍細胞によって引き起こされ得る。癌は、この新しい腫瘍であり得、それは転移性（又は続発性）腫瘍であり得る。

10

20

30

#### 【 0 1 1 0 】

癌は、転移した腫瘍細胞によって引き起こされ得、それは続発性又は転移性腫瘍であり得る。腫瘍の細胞は、元の腫瘍中のものと同様であり得る。一例として、乳癌又は結腸癌が肝臓に転移した場合、続発性腫瘍は、肝臓に存在する間、異常な肝細胞からではなく、異常な乳房又は結腸細胞から構成される。肝臓中の腫瘍はそのため、肝臓癌ではなく、転移性乳癌又は転移性結腸癌であり得る。

#### 【 0 1 1 1 】

癌は、任意の組織からの起源を有し得る。癌は、黒色腫、結腸、乳房、又は前立腺に由来し、そのため、それぞれ、元は皮膚、結腸、乳房、又は前立腺であった細胞から構成され得る。癌はまた、血液学的悪性腫瘍であり得、それは白血病又はリンパ腫であり得る。癌は、肝臓、肺、膀胱、又は腸などの組織に侵入し得る。

#### 【 0 1 1 2 】

本発明の代表的な癌及び／又は腫瘍は、基底細胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨癌；脳及び中枢神経系の癌；乳癌；腸骨の癌；子宮頸癌；絨毛癌；結腸癌及び直腸癌；結合組織癌；消化器系の癌；子宮内膜癌；食道癌；眼癌；頭頸部癌；胃癌（消化管癌を含む）；神経膠芽腫；肝癌；肝腫；上皮内新生物；腎臓癌又は腎癌；喉頭癌；白血病；肝臓癌；肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺の扁平上皮癌）；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔癌（唇、舌、口、及び咽頭）；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸癌；呼吸器系の癌；唾液腺癌；肉腫；皮膚癌；扁平上皮癌；胃癌；精巣癌；甲状腺癌；子宮又は子宮内膜癌；尿系の癌；外陰癌；ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低グレード／濾胞非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む；小リンパ球（SL）NHL、中間グレード／濾胞性NHL；中間グレードの拡散性NHL；高グレードの免疫芽細胞NHL；高グレードのリンパ芽球性NHL；高グレードの小さい非正円形細胞NHL；巨大腫瘍病変NHL；マントル細胞リンパ腫；エイズ関連リンパ腫；及びウォルデンストロームのマクログロブリン血症；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髄芽球性

40

50

白血病；並びに他の癌腫及び肉腫；及び移植後リンパ増殖障害（P T L D）、並びに母斑症に関する異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍に関するものなど）、及びメイグス症候群を含むが、これらに限定されない。

#### 【0113】

実施形態において、キメラタンパク質は、治療 - 難治性癌を有する対象を治療するために使用される。実施形態において、キメラタンパク質は、1以上の免疫調節剤に難治性である対象を治療するために使用される。例えば、実施形態において、キメラタンパク質は、治療の12週間程度後に、治療に対する応答、或いはさらに進行を示さない対象を治療するために使用される。例えば、実施形態において、対象は、P D - 1及び／又はP D - L 1及び／又はP D - L 2剤に難治性であり、例えば、ニボルマブ（ONO - 4538 / BMS - 936558、MDX1106、OPDIVO、BRISTOL MYERS S QUIBB）、ペンプロリズマブ（KEYTRUDA、MERCK）、ピディリズマブ（CT - 011、CURE TECH）、MK - 3475（MERCK）、BMS 936559（BRISTOL MYERS SQUIBB）、イブルチニブ（PHARMACYC LICS / ABBVIE）、アテゾリズマブ（TECENTRIQ、GENENTECH）、及び／又はMPDL3280A（ROCHE）難治性患者を含む。例えば、実施形態において、対象は、抗CTLA - 4剤に対して難治性であり、例えば、イピリムマブ（ヤーボイ（YERVOY））難治性患者（例えば、黒色腫患者）である。したがって、実施形態において、本発明は、1以上の免疫調節剤の単剤療法を含む、様々な治療に応答しない患者を救済する癌治療の方法を提供する。

10

20

#### 【0114】

実施形態において、本方法は、追加の薬剤に難治性である患者にキメラタンパク質での治療を提供し、そのような「追加の薬剤」は本明細書の他の場所に記載されており、本明細書に記載の様々な化学療法剤を含むが、これらに限定されない。

#### 【0115】

実施形態において、キメラタンパク質は、1以上の炎症性の疾患又は状態を治療、調節する又は予防するために使用される。炎症性疾患の非限定的な例は、にきび、急性炎症、アレルギー性鼻炎、喘息、アテローム性動脈硬化症、アトピー性皮膚炎、自己免疫疾患、自己炎症性疾患、常染色体劣性痙性失調症、気管支拡張症、セリアック病、慢性胆囊炎、慢性炎症、慢性前立腺炎、大腸炎、憩室炎、家族性好酸球増加症（f e）、糸球体腎炎、グリセロールキナーゼ欠乏症、化膿性汗腺炎、過敏症、炎症、炎症性腸疾患、炎症性骨盤疾患、間質性膀胱炎、喉頭炎症性疾患、リー症候群、扁平苔癬、マスト細胞活性化症候群、マスト細胞症、眼炎症性疾患、耳炎、疼痛、骨盤炎症性疾患、再灌流傷害、呼吸器疾患、再狭窄、リウマチ熱、関節リウマチ、鼻炎、サルコイドーシス、敗血症性ショック、珪肺症及び他の肺炎、移植拒絶反応、結核、及び血管炎を含む。

30

#### 【0116】

様々な実施形態において、炎症性疾患は、多発性硬化症、糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、ギランバレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェーゲナー肉芽腫症、自己免疫性てんかん、ラスマッセン脳炎、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アジソン病、橋本甲状腺炎、線維筋痛、メニエール症候群；移植拒絶反応（例えば、同種移植片拒絶の予防）悪性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、及び他の自己免疫疾患などの自己免疫の疾患又は状態である。

40

#### 【0117】

態様において、本発明のキメラ薬剤は、例えば、OX40Lの細胞外ドメインを介してT細胞を活性化する方法において使用される。

#### 【0118】

いくつかの態様において、本発明のキメラ薬剤は、VSIG8の細胞外ドメインを介して、免疫抑制シグナルの細胞伝達を防止する方法において使用される。

50

**【 0 1 1 9 】****併用療法及びコンジュゲーション**

実施形態において、本発明は、対象に追加の薬剤を投与することをさらに含むキメラタンパク質及び方法を提供する。実施形態において、本発明は、共投与及び／又は共製剤化に関する。本明細書に記載の組成物はいずれも、共製剤化及び／又は共投与され得る。

**【 0 1 2 0 】**

実施形態において、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質は、別の薬剤と共に投与された場合に相乗的に作用し、そのような薬剤が単剤療法として使用される場合に一般的に使用される用量よりも低い用量で投与される。実施形態において、本明細書で参照される任意の薬剤は、本明細書に記載のキメラタンパク質のいずれかと組み合わせて使用され得る。

10

**【 0 1 2 1 】**

実施形態において、本明細書に記載の V S I G 8 の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質は、別のキメラタンパク質と同時に投与される。実施形態において、本明細書に記載の V I S I G 8 の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質は、別のキメラタンパク質、例えば、適応免疫応答を調節するものと同時に投与される。実施形態において、本明細書に記載の V S I G 8 の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質は、C S F 1 R、C D 4 0 L、P D - 1、G I T R L、4 - 1 B B L、S I R P、T I M 3、T I G I T、及びL I G H T の 1 以上を含むキメラタンパク質と一緒に投与される。理論に縛られることなく、適応免疫応答を誘導する本発明のキメラタンパク質及び自然免疫応答を誘導する 1 以上のキメラタンパク質の投与を含む併用レジメンは、相乗効果（例えば、相乗的抗腫瘍効果）を提供し得ると考えられる。

20

**【 0 1 2 2 】**

自然免疫応答を誘導する任意のキメラタンパク質が、本発明で利用され得る。例えば、キメラタンパク質は、自然免疫応答を誘導する米国特許第 6 2 / 4 6 4 , 0 0 2 号に開示されたキメラタンパク質のいずれかであり得る。そのような実施形態において、キメラタンパク質は、N 末端又はその近くに I 型膜貫通タンパク質の第 1 の細胞外ドメイン及び C 末端又はその近くに I I 型膜貫通タンパク質の第 2 の細胞外ドメインを含み、その全内容が参考により本明細書に組み込まれる米国特許第 6 2 / 4 6 4 , 0 0 2 号に開示されるように第 1 及び第 2 の細胞外ドメインの 1 つが免疫阻害性シグナルを提供し、第 1 及び第 2 の細胞外ドメインの 1 つが免疫刺激シグナルを提供する。例示的な実施形態において、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質は、N 末端に C S F 1 R の細胞外ドメイン及び C 末端に C D 4 0 L の細胞外ドメインを含むキメラタンパク質である。実施形態において、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質は、N 末端に S I R P の細胞外ドメイン及び C 末端に C D 4 0 L の細胞外ドメインを含むキメラタンパク質である。

30

**【 0 1 2 3 】**

実施形態において、V S I G 8 の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質は、自然免疫応答を刺激するためのキメラタンパク質（例えば、C S F 1 R ベースのキメラタンパク質）を以前に投与されたことのある患者に投与される。例えば、V S I G 8 の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質は、1 日後、又は 2 日後、又は 3 日後、又は 4 日後、又は 5 日後、又は 6 日後、又は 1 週間後、又は 2 週間後、又は 3 週間後、又は 4 週間後を含む、自然免疫応答を刺激するキメラタンパク質（例えば、C S F 1 R ベースのキメラタンパク質）の後に投与され得る。

40

**【 0 1 2 4 】**

実施形態において、限定されないが、癌適用を含み、本発明は、追加の薬剤としての化学療法剤に関する。化学療法剤の例は、チオテバ及び C Y T O X A N シクロスホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンなどのアルキルスルホン酸塩；ベンゾドーパ、カルボコーン、メツレドーパ、及びウレドーパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロロメラミンを含むエチレンイミン及びメチラ

50

メラミン；アセトゲニン（例えば、プラタシン及びプラタシノン）；カンプトテシン（合成アナログトポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリースタチン；C C - 1 0 6 5（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（例えば、クリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、K W - 2 1 8 9 及びC B - 1 - T M 1 を含む）；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコディクチン；スponジスタチン；クロラムプシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスターなどとのナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン（r an imnus t i n e ）などのニトロソウレア；エンジイン系抗生物質などの抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシンガンマII及びカリケアマイシンオメガII（例えば、A g new , C hem . I nt l . E d . E ngl . , 3 3 : 1 8 3 - 1 8 6 ( 1 9 9 4 ) ）を参照されたい；ダイネミシンAを含むダイネミシン；クロドロン酸塩などのビスホスホネート；エスペラミシン；並びにネオカルジノスタチン発色団及び関連色素タンパク質（c h r o m o p r o t e i n ）エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン（c h r o m o m y c i n i s ）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、アドリアマイシンドキソルビシン（モルフォリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシンCなどのマイトイマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ヅルビシン；メトレキサート及び5 - フルオロウラシル（5 - F U ）などの抗代謝産物；デノブテリン、メトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6 - メルカブトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、ドロモスタノロンプロピオン酸、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド（m i n o g l u t e t h i m i d e ）、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキサート；デメコルシン；ジアジクオン；エルホルミチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシン及びアンサミトシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン（n i t r a e r i n e ）；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドロジド；プロカルバジン；P S K 多糖類複合体（J H S N a t u r a l P r o d u c t s , E u g e n e , O r e g . ）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン（s i z o f u r a n ）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2 , 2 ' , 2 ' ' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類（例えば、T - 2 毒素、ベラキュリンA、ロリジンA及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「A r a - C 」）；シクロホスファミド；チオテバ；タキソイド、例えば、タキソール パクリタキセル（B r i s t o l - M y e r s S qu i b b O n c o l o g y , P r i n c e t o n , N . J . ）、アブラクサン クレモフォールを含まない、パクリタキセルのアルブミン処理ナノ粒子製剤（A m e r i c a n P h a r m a c e u t i c a l 10  
20  
30  
40  
50

Partners, Schaumberg, 111.)、及びタキソテール ドセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);クロランブシル;ジェムザール ゲムシタбин;6-チオグアニン;メルカブトプリン;メトトレキサート;シスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチンなどのプラチナ類似体;ビンプラスチン;プラチナ;エトポシド(VP-16);イホスファミド;ミトキサンtron;ビンクリスチン;ナベルбин ビノレルбин;ノバントロン;テニポシド;エダトレキサート;ダウノマイシン;アミノブテリン;ゼローダ;イバンドロネート;イリノテカン(カンプトサル、CPT-11)(5-FU及びロイコボリンとのイリノテカンの治療レジメンを含む);トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000;ジフルオロメチルオルニチン(DMFO);レチノイン酸などのレチノイド類;カペシタбин;コンブレタスタチン;ロイコボリン(LV);オキサリプラチン治療レジメン(FOLFOX)を含むオキサリプラチン;ラパチニブ(TYKERB);PKC-、Raf、H-Raf、EGFRの阻害剤(例えば、細胞増殖を低下させるエルロチニブ(Tarceva)及びVEGFA)並びに上記のいずれかの医薬として許容される塩、酸又は誘導体を含むが、これらに限定されない。加えて、本治療方法は、放射線の使用をさらに含んでよい。加えて、本治療方法は、光力学療法の使用をさらに含んでよい。

## 【0125】

実施形態において、限定されないが、癌適用を含み、本発明の追加の薬剤は、PD-1及びPD-L1又はPD-L2及び/又はPD-1とPD-L1若しくはPD-L2の結合を阻止、低減及び/又は阻害する薬剤(非限定的な例として、ニボルマブ(ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO、BRISTOL MYERS SQUIBB)、ペンプロリズマブ(KEYTRUDA、Merck)、ピディリズマブ(CT-011、CURE TECH)、MK-3475(MERCK)、BMS936559(BRISTOL MYERS SQUIBB)、アテゾリズマブ(テセントリク、GENENTECH)、MPDL3280A(ROCHE))、CD137(4-1BB)及び/又はCD137(4-1BB)と4-1BBリガンドの1以上の結合を増加及び/又は刺激する薬剤(非限定的な例として、ウレルマブ(BMS-663513及び抗4-1BB抗体)、並びにCTLA-4の活性及び/又はCTLA-4と、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2、及びPPP2R5Aの1以上の結合及び/又はOX40とOX40Lの結合を阻止、低減及び/又は阻害する薬剤(非限定的な例として、GBR830(GLENMARK)、MEDIMMUNE(MEDIMMUNE)から選択される1以上の免疫調節剤である。

## 【0126】

実施形態において、限定されないが、感染性疾患適用を含み、本発明は、追加の薬剤としての抗感染剤に関する。実施形態において、抗感染剤は、アバカビル、アシクロビル、アデフォビル、アンプレナビル、アタザナビル、シドフォビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エファビレンツ、エルビテグラビル、エムトリシタбин、エンフィルチド、エトラビリン、ファムシクロビル、及びホスカルネットを含むがこれらに限定されない抗ウイルス剤である。実施形態において、抗感染剤は、セファロスボリン系抗生物質(セファレキシン、セフロキシム、セファドロキシル、セファゾリン、セファロチン、セファクロール、セファマンドール、セフォキシチン、セフプロジル、及びセフトビプロール);フルオロキノロン抗生物質(シプロ、レバキン、フロキシン、テキン、アベロックス、及びノルフロックス);テトラサイクリン系抗生物質(テトラサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、及びドキシサイクリン);ペニシリン系抗生物質(アモキシシリン、アンピシリン、ペニシリンV、ジクロキサシリン、カルベニシリン、パンコマイシン、及びメチシリン);モノバクタム系抗生物質(アズトレオナム);及びカルバペネム系抗生物質(エルタペネム、ドリペネム、イミペネム/シラスタチン、及びメロペネム)を含むがこれらに限定されない抗菌剤である。実施形態において、抗感染剤は、抗マラリア剤(例えば、クロロキン、キニン、メフロキン、プリマキン、ドキシサイクリン、アルテメーター(artemether)/ルメファントリン、アトバコ

10

20

30

40

50

ン ( a t o v a q u o n e ) / プログアニル及びスルファドキシン / ピリメタミン) 、メトロニダゾール、チニダゾール、イベルメクチン、ピランテルパモ酸塩、及びアルベンダゾールを含む。

#### 【 0 1 2 7 】

実施形態において、限定されないが、自己免疫適用を含み、追加の薬剤は、免疫抑制剤である。実施形態において、免疫抑制剤は、ステロイド系抗炎症剤又は非ステロイド系抗炎症剤 ( N S A I D ) などの抗炎症剤である。ステロイド、特に、副腎コルチコステロイド及びその合成類似体は、当技術分野で周知である。本発明に有用なコルチコステロイドの例は、ヒドロキシルトリアムシノロン、アルファ - メチルデキサメタゾン、ベータ - メチルベタメタゾン、ベクロメタゾンジプロピオン酸、ベタメタゾンベンゾエート、ベタメタゾンジプロピオン酸、ベタメタゾンバレレート、クロベタゾールバレレート、デソニド、デソキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフロラゾンジアセテート、ジフルコルトロンバレレート、フルアドレノロン、フルクロロロロンアセトニド、フルメタゾンピバレート、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルコルチンブチルエステル、フルオコルトロン、フルプレドニデン ( フルプレドニリデン ) アセテート、フルランドレノロン、ハルシノニド、ヒドロコルチゾンアセテート、ヒドロコルチゾンブチレート、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロンアセトニド、コルチゾン、コルトドキソン、フルセトニド、フルドロコルチゾン、ジフルオロゾンジアセテート、フルラドレノロンアセトニド、メドリゾン、アムシナフェル、アムシナフィド、ベタメタゾン及びそのエステル類のバランス、クロロブレドニゾン、クロコルテロン、クレシノロン、ジクロリゾン、ジフルブレドナート、フルクロロニド、フルニソリド、フルオロメタロン、フルペロロン、フルブレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、メブレドニゾン、パラメタゾン、ブレドニゾロン、ブレドニゾン、ベクロメタゾンジプロピオン酸塩を含むが、これらに限定されない。本発明で使用され得る ( N S A I D ) は、サリチル酸、アセチルサリチル酸、メチルサリチル酸、グリコールサリチル酸、サリチルアミド ( s a l i c y l m i d e ) 、ベンジル - 2 , 5 - ジアセトキシベンゾイン酸、イブプロフェン、スリンダク ( f u l i n d a c ) 、ナプロキセン、ケトプロフェン、エトフェナメート、フェニルブタゾン、及びインドメタシンを含むが、これらに限定されない。実施形態において、免疫抑制剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬 ( 例えば、アザチオプリン、メトレキサート ) 、細胞傷害性抗生物質、抗体 ( 例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブ、及びムロモナブ ) 、抗イムノフィリン ( 例えば、シクロスボリン、タクロリムス、シロリムス ) 、インターフェロン ( i n t e f e r o n ) 、オピオイド、 T N F 結合タンパク質、ミコフェノレート、及び小さな生物学的薬剤 ( 例えば、フィンゴリモド、ミリオシン ) などの細胞分裂阻害剤であり得る。

#### 【 0 1 2 8 】

実施形態において、本明細書に記載のキメラタンパク質 ( 及び / 又は追加の薬剤 ) は、修飾される誘導体、すなわち、共有結合が組成物の活性を防止しないような、組成物への任意の種類の分子の共有結合によって修飾される誘導体を含む。例えば、限定されないが、誘導体は、特に、グリコシリ化、脂質化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基 / ブロック基による誘導体化、タンパク質溶解切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などによって修飾された組成物を含む。多数の化学修飾のいずれも、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツリカマイシンの代謝合成などを含むが、これらに限定されない、既知の技術によって行うことができる。さらに、誘導体は、1 以上の非古典的アミノ酸を含有し得る。実施形態において、本明細書に記載のキメラタンパク質 ( 及び / 又は追加の薬剤 ) は、例示的な実施形態において、毒素、化学療法剤、放射性同位体、及びアポトーシス若しくは細胞死を引き起こす薬剤を含む、細胞傷害性薬剤をさらに含む。そのような薬剤は、本明細書に記載の組成物にコンジュゲートされ得る。

#### 【 0 1 2 9 】

本明細書に記載のキメラタンパク質 ( 及び / 又は追加の薬剤 ) はしたがって、化学リンカーなどのエフェクター部分、例えば、蛍光色素、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質などの検出可能な部分、及び化学発光部分、又は、例えば、ストレプトアビジン、アビ

10

20

30

40

50

ジン、ビオチン、サイトトキシン、細胞傷害性薬剤、及び放射性物質などの機能的部分を付加するために翻訳後に修飾され得る。

#### 【0130】

##### 製剤

本明細書に記載のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、医薬として許容される塩を形成するために、無機酸若しくは有機酸と反応できる十分に基本的な官能基、又は無機塩基若しくは有機塩基と反応できるカルボキシル基を保有できる。医薬として許容される酸添加塩は、当技術分野で周知の医薬として許容される酸から形成される。そのような塩は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977) 並びに医薬塩のハンドブック；性質、選択、及び使用 (The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use), P. H. Stahl 及び C. G. Wermuth (編集), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002 に列挙される医薬として許容される塩を含む。

10

#### 【0131】

実施形態において、本明細書に記載の組成物は、医薬として許容される塩の形態である。

#### 【0132】

また、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、医薬として許容される担体又はビヒクルを含む組成物の成分として対象に投与できる。そのような組成物は、必要に応じて、適切な投与のための形態を提供するように、適量の医薬として許容される賦形剤を含んでよい。医薬用賦形剤は、水並びにピーナッツ油、大豆油、鉱物油、及びゴマ油などの、石油、動物、野菜、又は合成起源のものを含む油類などの、液体であり得る。医薬賦形剤は、例えば、生理食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、及び尿素などであり得る。加えて、補助剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤、及び着色剤を使用できる。実施形態において、医薬として許容される賦形剤は、対象に投与される場合に無菌である。水は、本明細書に記載の任意の薬剤が静脈内投与される場合に有用な賦形剤である。生理食塩水溶液及び水性デキストロース及びグリセロール溶液がまた、特に注射可能な溶液のために、液体賦形剤として使用できる。適切な医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、及びエタノールなども含む。本明細書に記載の任意の薬剤は、必要に応じて、微量の湿潤剤又は乳化剤、又は pH 緩衝剤も含んでよい。

20

#### 【0133】

実施形態において、本明細書に記載の組成物は、生理食塩水緩衝液 (TBS、及び PBSなどを含むが、これらに限定されない) に懸濁される。

#### 【0134】

実施形態において、キメラタンパク質は、半減期を延長するか、又はそうでなければ、薬物力学的及び薬物動態学的性質を改善するために別の薬剤とコンジュゲート並びに／又は融合され得る。実施形態において、キメラタンパク質は、PEG、XEN (例えば、rPEG として)、ポリシアル酸 (POLYXEN)、アルブミン (例えば、ヒト血清アルブミン又は HAS)、エラスチン様タンパク質 (ELP)、PAS、HAP、GLK、CTP、及びトランスフェリンなどのうちの 1 以上と融合又はコンジュゲートされ得る。実施形態において、個々のキメラタンパク質のそれぞれは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる *BioDrugs* (2015) 29: 215~239 に記載の薬剤のうちの 1 以上に融合される。

30

#### 【0135】

##### 投与、投薬、及び治療レジメン

本発明は、記載のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）を様々な製剤中に含む。

40

50

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、溶液、懸濁液、エマルション、液滴、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル、液体含有カプセル、粉末、徐放性製剤、坐剤、エマルション、エアロゾル、スプレー、懸濁液の形態、又は使用に適する任意の他の形態をとり得る。タンパク質配列をコードするDNA又はRNA構築物も使用され得る。実施形態において、組成物は、カプセルの形態にある（例えば、米国特許第5、698、155号を参照されたい）。適切な医薬賦形剤の他の例は、参照により本明細書に組み込まれるレミントンの薬学（Remington's Pharmaceutical Sciences）1447-1676（Alfonso R. Gennaro編集、第19版、1995）に記載されている。

## 【0136】

10

適宜、キメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）を含む製剤は、可溶化剤も含んでよい。また、薬剤は、当技術分野で公知の適切なビヒクリ又は送達装置により送達できる。本明細書に概説される併用療法は、単一の送達ビヒクリ又は送達装置で共送できる。投与のための組成物は、必要に応じて、注射部位での痛みを軽減するために、例えば、リグノカインなどの局所麻酔薬を含んでよい。

## 【0137】

本発明のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）を含む製剤は、単位剤形で都合よく提示され、薬学の当技術分野で周知の方法のいずれかによって調製され得る。そのような方法は、一般に、1以上の付属成分を構成する担体と治療薬を結合させる工程を含む。典型的には、製剤は、液体担体、細かく分割された固体担体、又はその両方と治療薬を均一かつ密接に結合させ、必要に応じて、所望の製剤の剤形に生成物を形成する（例えば、湿式又は乾燥造粒、粉末ブレンドなど、その後、当技術分野で公知の従来の方法を用いて打錠する）ことによって調製される。

20

## 【0138】

実施形態において、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、本明細書に記載の投与様式に適合した組成物として日常的な手順に従って製剤化される。

## 【0139】

投与経路は、例えば、皮内、腫瘍内、筋肉内、経皮内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、経口、舌下、鼻腔内、脳内、腔内、経皮、直腸、吸入による投与、又は局所的に、特に、耳、鼻、目、若しくは皮膚への投与を含む。実施形態において、投与は、経口又は非経口注射によってなされる。場合によって、投与は、血流への本明細書に記載の任意の薬剤の放出をもたらすか、或いは、薬剤は、活発な疾患部位に直接投与される。

30

## 【0140】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、経口投与できる。そのようなキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）はまた、任意の他の便利な経路によって、例えば、静脈内注入又はボーラス注射によって、上皮又は粘膜内層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を介した吸収によって投与でき、かつ別の生物学的活性剤と共に投与できる。投与は、全身的又は局所的であり得る。様々な送達システム、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、カプセルなどへの封入が知られており、投与のために使用できる。

40

## 【0141】

特定の実施形態において、治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましい場合がある。実施形態において、例えば、癌の治療において、キメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、腫瘍微小環境（例えば、腫瘍血管系；腫瘍浸潤リンパ球；線維芽細胞網状細胞；内皮前駆細胞（EPC）；癌関連線維芽細胞；周皮細胞；他の間質細胞；細胞外マトリックス（ECM）の構成成分；樹状細胞；抗原提示細胞；T細胞；制御性T細胞；マクロファージ；好中球；及び腫瘍に近位に位置する他の免疫細胞を含む腫瘍細胞を取り囲み、かつ／若しくは腫瘍細胞に栄養を与える、例えば、細胞、分子、細胞外マトリックス並びに／又は血管）又はリンパ節に投与され、かつ／又は腫瘍微小環境若しくはリン

50

パ節を標的とする。実施形態において、例えば、癌の治療において、キメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、腫瘍内に投与される。

#### 【0142】

実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、従来の免疫療法（例えば、オプジーボ（O P D I V O）、キイトルーダ（K E Y T R U D A）、ヤーボイ（Y E R V O Y）及びテセントリク（T E C E N T R I Q）の1以上での治療）に見られる副作用よりも少ない副作用をもたらす二重効果を可能にする。例えば、本発明のキメラタンパク質は、低血圧、大腸炎、肝炎、肺炎、発疹、及びリウマチ性疾患などの、皮膚、消化管、腎臓、末梢神経系及び中枢神経系、肝臓、リンパ節、目、脾臓、及び内分泌系を含む様々な組織並びに器官に影響を与える一般的に観察される免疫関連有害事象を低減又は予防する。また、本発明の局所投与、例えば腫瘍内投与は、標準的な全身投与、例えば、従来の免疫療法（例えば、オプジーボ、キイトルーダ、ヤーボイ、及びテセントリクの1以上での治療）で使用されるようなI V注入で見られる有害事象を未然に防ぐ。

10

#### 【0143】

非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、及び関節内への注射並びに注入）に適する剤形には、例えば、溶液、懸濁液、分散剤、及びエマルションなどを含む。それらはまた、使用直前に無菌注射培地に溶解又は懸濁できる無菌固体組成物（例えば、凍結乾燥組成物）の形態で製造され得る。それらは、例えば、当技術分野で公知の懸濁剤又は分散剤を含有し得る。

20

#### 【0144】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）の投薬量並びに投薬スケジュールは、治療される疾患、対象の全体的な健康、及び投与する医師の裁量を含むが、これらに限定されない様々なパラメータに依存し得る。本明細書に記載の任意のキメラタンパク質は、それを必要とする対象への追加の薬剤の投与の前（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間前）か、追加の薬剤の投与と同時に、又はその後（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間後）に投与できる。実施形態において、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質及び追加の薬剤は、1分間隔、10分間隔、30分間隔、1時間未満の間隔、1時間間隔、1時間～2時間間隔、2時間～3時間間隔、3時間～4時間間隔、4時間～5時間間隔、5時間～6時間間隔、6時間～7時間間隔、7時間～8時間間隔、8時間～9時間間隔、9時間～10時間間隔、10時間～11時間間隔、11時間～12時間間隔、1日間隔、2日間隔、3日間隔、4日間隔、5日間隔、6日間隔、1週間間隔、2週間間隔、3週間間隔、又は4週間間隔で投与される。

30

#### 【0145】

実施形態において、本発明は、V S I G 8の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質及び自然免疫応答を誘導する別のキメラタンパク質の同時投与に関する。そのような実施形態において、本発明のキメラタンパク質は、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質の投与前、投与と同時に、又は投与後に投与され得る。例えば、キメラタンパク質は、1分間隔、10分間隔、30分間隔、1時間未満の間隔、1時間間隔、1時間～2時間間隔、2時間～3時間間隔、3時間～4時間間隔、4時間～5時間間隔、5時間～6時間間隔、6時間～7時間間隔、7時間～8時間間隔、8時間～9時間間隔、9時間～10時間間隔、10時間～11時間間隔、11時間～12時間間隔、1日間隔、2日間隔、3日間隔、4日間隔、5日間隔、6日間隔、1週間間隔、2週間間隔、3週間間隔、又は4週間間隔で投与され得る。例示的な実施形態において、V S I G 8の細胞外ドメインを含む本発明のキメラタンパク質及び自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質は、1週間間隔で投与されるか、又は隔週で投与される（すなわち、自然免疫応答を誘導するキメラタンパク質の投与は、その1週間後に、V S I G 8の細胞外ドメインを含む本発明のキメラ

40

50

タンパク質などの投与を伴う)。

**【0146】**

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質(及び/又は追加の薬剤)の投薬量は、病態の重症度、病態が治療又は予防されるか否か、並びに治療される対象の年齢、体重、及び健康を含むいくつかの要因に依存し得る。さらに、特定の対象についての薬物ゲノムの(薬物動態、薬理力学的又は治療の有効性プロファイルに対する遺伝子型の影響の)情報が、使用される投薬量に影響を与える可能性がある。また、正確な個々の投薬量は、投与される薬剤の特定の組み合わせ、投与時間、投与経路、製剤の性質、排出速度、治療される特定の疾患、障害の重症度、及び障害の解剖学的位置を含む様々な要因に依存して、幾分か調節できる。投薬量のいくつかのバリエーションが予想される。

10

**【0147】**

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質(及び/又は追加の薬剤)の非経口注射による投与について、投薬量は、1日あたり約0.1mg～約250mg、1日あたり約1mg～約20mg、又は1日あたり約3mg～約5mgであり得る。一般に、経口又は非経口投与の場合、本明細書に記載の任意の薬剤の投薬量は、1日あたり約0.1mg～約1500mg、又は1日あたり約0.5mg～約10mg、又は1日あたり約0.5mg～約5mg、又は1日あたり約200～約1,200mg(例えば、1日あたり約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1,000mg、約1,100mg、約1,200mg)であり得る。

20

**【0148】**

実施形態において、本明細書に記載のキメラタンパク質(及び/又は追加の薬剤)の投与は、治療あたり約0.1mg～約1500mg、又は治療あたり約0.5mg～約10mg、又は治療あたり約0.5mg～約5mg、又は治療あたり約200～約1,200mg(例えば、治療あたり約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1,000mg、約1,100mg、約1,200mg)の投薬量での非経口注射によるものである。

**【0149】**

実施形態において、キメラタンパク質(及び/又は追加の薬剤)の適切な投薬量は、対象の体重の約0.01mg/kg～約100mg/kg、又は約0.01mg/kg～約10mg/kgの範囲であり、例えば、その間の全ての値と範囲を含む約0.01mg/kg体重、約0.02mg/kg体重、約0.03mg/kg体重、約0.04mg/kg体重、約0.05mg/kg体重、約0.06mg/kg体重、約0.07mg/kg体重、約0.08mg/kg体重、約0.09mg/kg体重、約0.1mg/kg体重、約0.2mg/kg体重、約0.3mg/kg体重、約0.4mg/kg体重、約0.5mg/kg体重、約0.6mg/kg体重、約0.7mg/kg体重、約0.8mg/kg体重、約0.9mg/kg体重、約1mg/kg体重、約1.1mg/kg体重、約1.2mg/kg体重、約1.3mg/kg体重、約1.4mg/kg体重、約1.5mg/kg体重、約1.6mg/kg体重、約1.7mg/kg体重、約1.8mg/kg体重、約1.9mg/kg体重、約2mg/kg体重、約3mg/kg体重、約4mg/kg体重、約5mg/kg体重、約6mg/kg体重、約7mg/kg体重、約8mg/kg体重、約9mg/kg体重、約10mg/kg体重である。

30

**【0150】**

実施形態において、送達は、小胞中で、特にリポソーム中であり得る(Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treatら, 感染性疾患及び癌の治療におけるリポソーム(Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and cancer), Lopez-Berestein及びFidler(編), Liss, New York, pp. 353-365(1989)を参照されたい)。

40

**【0151】**

50

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、制御放出手段若しくは持続放出手段によるか、又は当業者に周知の送達装置によって投与できる。例は、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第3、845、770号、同第3、916、899号、同第3、536、809号、同第3、598、123号、同第4、008、719号、同第5、674、533号、同第5、059、595号、同第5、591、767号、同第5、120、548号、同第5、073、543号、同第5、639、476号、同第5、354、556号、及び同第5、733、556号に記載のものを含むが、これらに限定されない。そのような剤形は、様々な割合で所望の放出プロファイルを提供するために、例えば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマー・マトリックス、ゲル、透過膜、浸透圧系、多層コーティング、微粒子、リポソーム、微小球、又はそれらの組み合わせを用いる1以上の活性成分の制御放出又は持続放出を提供するのに有用であり得る。活性成分の制御放出又は持続放出は、pHの変化、温度の変化、光の適切な波長による刺激、酵素の濃度又は利用可能性、水の濃度又は利用可能性、又は他の生理学的条件若しくは化合物を含むが、これらに限定されない、様々な条件によって刺激できる。

#### 【0152】

実施形態において、ポリマー材料を使用できる（制御放出の医学的用途（*Medical Applications of Controlled Release*），Langer及びWise（編），CRC Press., Boca Raton, Florida（1974）；制御される薬物バイオアベイラビリティ、医薬品の設計と性能（*Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*），Smolen and Ball（編），Wiley, New York（1984）；Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61を参照されたい；Levyら, 1985, *Science* 228: 190；Duringら, 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351；Howardら, 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105も参照されたい）。

#### 【0153】

実施形態において、制御放出システムは、治療される標的領域の近くに配置でき、したがって、全身用量のほんの一部を必要とする（例えば、Goodson、上記の*Medical Applications of Controlled Release*, 2巻, pp. 115 - 138（1984）を参照されたい）。Langer, 1990, *Science* 249: 1527 - 1533による概説で説明されている他の制御放出システムが使用され得る。

#### 【0154】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）の投与は、独立して、1日に1～4回、又は月に1～4回、又は年に1～6回、又は2年、3年、4年若しくは5年に1回であり得る。投与は、1日又は1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年の期間であり得、さらには対象の寿命の間であり得る。

#### 【0155】

本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）を利用する投薬量レジメンは、対象の種類、種、年齢、体重、性別及び病状；治療される病態の重症度；投与経路；対象の腎機能又は肝機能；個人の薬理ゲノミクス構造；及び使用される本発明の特定の化合物を含む様々な要因に従って選択できる。本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、毎日の単回用量で投与でき、又は総1日投薬量は、1日2回、3回又は4回の分割用量で投与できる。また、本明細書に記載の任意のキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）は、投薬量レジメン全体を通して断続的ではなく、連続的に投与できる。

#### 【0156】

細胞及び核酸

10

20

30

40

50

実施形態において、本発明は、本明細書に記載のキメラタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。実施形態において、発現ベクターは、DNA又はRNAを含む。実施形態において、発現ベクターは、哺乳動物発現ベクターである。

#### 【0157】

原核生物ベクターと真核生物ベクターの両方が、キメラタンパク質の発現に使用できる。原核生物ベクターは、大腸菌配列に基づく構築物を含む（例えば、Makrides, Microbiol Rev 1996, 60: 512-538を参照されたい）。大腸菌での発現に使用できる調節領域の非限定的な例は、lac、trp、lpp、phoA、recA、tac、T3、T7及びPLを含む。原核生物発現ベクターの非限定的な例は、gt11などのgtベクターシリーズ(Huynhら、「DNAクローニング技術(DNA Cloning Techniques)」, I巻:実用的なアプローチ(A Practical Approach)」, 1984, (D. Glover, 編), pp. 49-78, IRL Press, Oxford)、及びpETベクターシリーズ(Studierら, Methods Enzymol 1990, 185: 60-89)を含み得る。しかしながら、原核生物宿主ベクター系は、哺乳動物細胞の翻訳後処理の多くを行うことができない。そのため、真核生物宿主ベクター系が、特に有用であり得る。様々な調節領域を、哺乳動物宿主細胞におけるキメラタンパク質の発現に使用できる。例えば、SV40初期及び後期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、及びラウス肉腫ウイルスの長末端反復(RSV-LTR)プロモーターを使用できる。哺乳動物細胞に有用であり得る誘導性プロモーターは、限定されないが、メタロチオネインII遺伝子に関連するプロモーター、マウス乳癌ウイルスグルココルチコイド応答性長末端反復(MMTV-LTR)、-インターフェロン遺伝子、及びhsp70遺伝子を含む(Williamsら, Cancer Res 1989, 49: 2735-42; 及びTaylorら, Mol Cell Biol 1990, 10: 165-75を参照されたい)。ヒートショックプロモーター又はストレスプロモーターもまた、組換え宿主細胞におけるキメラタンパク質の発現を促進するのに有利であり得る。

#### 【0158】

実施形態において、本発明の発現ベクターは、哺乳動物細胞において機能的である、発現制御領域、若しくはその補体に作動可能に連結されたキメラタンパク質（及び／若しくは追加の薬剤）又はその補体をコードする核酸を含む。発現制御領域は、発現ベクターで形質転換されたヒト細胞でプロッキング剤及び／又は刺激剤が生成されるように、作動可能に連結されたプロッキング剤及び／又は刺激剤をコードする核酸の発現を促進できる。

#### 【0159】

発現制御領域は、作動可能に連結された核酸の発現に影響を与える、プロモーター及びエンハンサーなどの調節ポリヌクレオチド（本明細書でエレメントと呼ばれることがある）である。本発明の発現ベクターの発現制御領域は、ヒト細胞中で作動可能に連結されたコード核酸を発現できる。実施形態において、細胞は腫瘍細胞である。実施形態において、細胞は非腫瘍細胞である。実施形態において、発現制御領域は、作動可能に連結された核酸に調節可能な発現を与える。シグナル（刺激と呼ばれることがある）は、そのような発現制御領域に作動可能に連結された核酸の発現を増減させることができる。シグナルに応答して発現を増加させるそのような発現制御領域は、多くの場合、誘導性と呼ばれる。シグナルに応答して発現を減少させるそのような発現制御領域は、多くの場合、抑制可能と呼ばれる。典型的には、そのようなエレメントによって与えられる増減の量は、存在するシグナルの量に比例し、シグナルの量が多いほど、発現の増減が大きくなる。

#### 【0160】

実施形態において、本発明は、合図に応答して一過的に高レベルの発現をもたらすことができる誘導性プロモーターの使用を企図する。例えば、腫瘍細胞の近くにある場合、そのような発現制御配列を含むキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）用の発現ベクターで形質転換された細胞は、形質転換細胞を適切な合図に暴露することによって高レベルの薬剤を一過的に生成するように誘導される。例示的な誘導性発現制御領域は、低分子化

10

20

30

40

50

学化合物などの合図で刺激される誘導性プロモーターを含むものを含む。特定の例は、例えば、それらの各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5、989、910号、同第5、935、934号、同第6、015、709号、及び同第6、004、941号の中で見つけることができる。

#### 【0161】

発現制御領域及び遺伝子座制御領域は、天然のプロモーター及びエンハンサーエレメントなどの全長プロモーター配列、並びに全長若しくは非バリアンド機能の全て又は一部を保持するサブ配列又はポリヌクレオチドバリアントを含む。本明細書で使用する用語「機能的」及びその文法的異形は、核酸配列、サブ配列又は断片を参照して使用される場合に、配列が天然核酸配列（例えば、非バリアント又は非改変配列）の1以上の機能を有することを意味する。

10

#### 【0162】

本明細書で使用する「作動可能な連結」は、それらが意図される様式で機能することを可能にすると説明される構成成分の物理的な並置を指す。核酸との作動可能な連結における発現制御エレメントの例では、関係は、制御エレメントが核酸の発現を調節するようなものである。典型的には、転写を調節する発現制御領域は、転写される核酸の5'末端（すなわち「上流」）付近に並置される。発現制御領域はまた、転写される配列の3'末端（すなわち、「下流」）又は転写物内（例えば、イントロン）に配置できる。発現制御エレメントは、転写される配列から離れた距離（例えば、核酸から100～500、500～1000、2000～5000、又はそれより多くのヌクレオチド）に配置できる。発現制御エレメントの具体的な例はプロモーターであり、それは転写される配列の5'側に通常は位置する。発現制御エレメントの別の例はエンハンサーであり、それは転写される配列の5'側若しくは3'側又は転写される配列内に配置できる。

20

#### 【0163】

ヒト細胞で機能する発現系は、当技術分野で周知であり、かつウイルス系を含む。一般的に、ヒト細胞中で機能的なプロモーターは、哺乳動物RNAポリメラーゼに結合しmRNAへのコード配列の下流（3'）転写を開始できる任意のDNA配列である。プロモーターは、コード配列の5'末端に通常位置する、転写開始領域及び典型的には、転写開始部位の25～30塩基対上流に位置するTATAボックスを有する。TATAボックスは、正しい部位でRNA合成を開始するようにRNAポリメラーゼIIに指示すると考えられている。プロモーターはまた、典型的には、TATAボックスの100～200塩基対上流に典型的に位置する、上流プロモーターエレメント（エンハンサーエレメント）を含有する。上流プロモーターエレメントは、転写が開始される速度を決定し、いずれかの方向に作用できる。ウイルス遺伝子は高度に発現される場合が多く広い宿主範囲を有するので、プロモーターとして特に使用されるのは、哺乳動物ウイルスゲノム由来のプロモーターである。例は、SV40初期プロモーター、マウス乳癌ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーター、及びCMVプロモーターを含む。

30

#### 【0164】

典型的には、哺乳動物細胞によって認識される転写終結配列及びポリアデニル化配列は、翻訳停止コドンの3'側に位置する調節領域であり、そのため、プロモーターエレメントと共に、コード配列に隣接する。成熟mRNAの3'末端は、部位特異的な翻訳後切断及びポリアデニル化によって形成される。転写ターミネータ及びポリアデニル化シグナルの例は、SV40由来のものを含む。イントロンも、発現構築物中に含まれ得る。

40

#### 【0165】

生存細胞に核酸を導入するために利用可能な様々な技術がある。インピトロでの哺乳動物細胞への核酸の導入に適する技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ポリマーベースのシステム、DEAE-デキストラン、ウイルス形質導入、リン酸カルシウム沈殿法などの使用を含む。インビオ遺伝子導入に関しては、リポソーム；キトサン及びゼラチンなどの天然ポリマー系送達ビヒクルを含むいく

50

つかの技術及び試薬を用いてもよい。ウイルスベクターも、インビオ形質導入に適する。場合によっては、腫瘍細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体又はリガンドなどの標的剤を提供することが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、例えば、特定の細胞型を指向するカプシドタンパク質又はその断片、循環中に内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在を標的とし、細胞内半減期を増強するタンパク質を標的化し、かつ／又はその取り込みを促進するために使用され得る。受容体媒介性エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら, J. Biol. Chem. 262, 4429 - 4432 (1987)；及びWagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3410 - 3414 (1990)によって記載されている。

10

#### 【0166】

適宜、例えば、組み込み配列などの遺伝子送達作用因子を用いることもできる。多数の組み込み配列が当技術分野で公知である（例えば、Nunes-Dubyら, Nucleic Acids Res. 26: 391 - 406, 1998；Sadwoski, J. Bacteriol., 165: 341 - 357, 1986；Bestor, Cell, 122(3): 322 - 325, 2005；Plasterkら, TIG 15: 326 - 332, 1999；Kootstraら, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43: 413 - 439, 2003を参照されたい）。これらは、リコンビナーゼ及びトランスポサーを含む。例は、Cre (Sternberg及びHamilton, J. Mol. Biol., 150: 467 - 486, 1981)、Lambda (Nash, Nature, 247, 543 - 545, 1974), Flp (Broach, ら, Cell, 29: 227 - 234, 1982), R (Matsuzaki, ら, J. Bacteriology, 172: 610 - 618, 1990), cpc31（例えば、Grothら, J. Mol. Biol. 335: 667 - 678, 2004を参照されたい）、スリーピングビューティー (sleeping beauty)、マリナーファミリーのトランスポサー (Plasterkら、上記)、及びAAV、レトロウイルスなどのウイルスを組み込むための構成成分、並びにレトロウイルス又はレンチウイルスのLTR配列及びAAVのITR配列などのウイルス組み込みを提供する構成成分を有するアンチウイルス (Kootstraら, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43: 413 - 439, 2003) を含む。加えて、直接的及び標的遺伝子組み込み戦略が、CRISPR/CAS9、亜鉛フィンガー、TALEN、及びメガヌクレアーゼ遺伝子編集技術を含むキメラタンパク質をコードする核酸配列を挿入するために使用され得る。

20

#### 【0167】

一態様において、本発明は、ウイルスベクターであるキメラタンパク質（及び／又は追加の薬剤）の発現用の発現ベクターを提供する。遺伝子治療に有用な多くのウイルスベクターが公知である（例えば、Lundstrom, Trends Biotechnol., 21: 117, 122, 2003を参照されたい）。例示的なウイルスベクターは、アンチウイルス (LV)、レトロウイルス (RV)、アデノウイルス (AV)、アデノ随伴ウイルス (AAV)、及びウイルスから選択されるものを含むが、他のウイルスベクターも使用され得る。インビオ使用の場合、宿主ゲノムに組み込まれないウイルスベクターが、ウイルス及びアデノウイルスなどの使用に適する。ウイルスの例示的な種類は、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎 (VEE) ウィルス、及びセムリキフォレストウイルス (SFV) を含む。インビトロ使用の場合、レトロウイルス、AAV、及びアンチウイルスなどの、宿主ゲノムに組み込むウイルスベクターが適する。実施形態において、本発明は、インビオでヒト細胞を形質導入する方法であって、インビオで固形腫瘍を本発明のウイルスベクターと接触させることを含む方法を提供する。

30

#### 【0168】

実施形態において、本発明は、本明細書に記載のキメラタンパク質を含む発現ベクターを含む、宿主細胞を提供する。

40

#### 【0169】

50

発現ベクターは、本発明のキメラタンパク質を生成するための宿主細胞に導入できる。細胞は、例えば、インビトロで培養されるか、又は遺伝子操作され得る。有用な哺乳動物宿主細胞は、限定されないが、ヒト、サル、及びげっ歯類に由来する細胞を含む（例えば、「遺伝子導入及び発現：実験室マニュアル（Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual）」1990、New York, Freeman & Co. を参照されたい）。これらは、SV40によって形質転換されたサル腎臓細胞株（例えば、COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚性腎臓株（例えば、293、293-E BNA、又は懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Grahamら, J Gen Virol 1977, 36: 59）；ベビーハムスター腎臓細胞（例えば、BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞DHFR（例えば、CHO、Ur laub及びChasin, Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77: 4216）；DG44 CHO細胞、CHO-K1細胞、マウスセルトリ細胞（Mather, Biol Repr od 1980, 23: 243-251）；マウス線維芽細胞（例えば、NIH-3T3）、サル腎臓細胞（例えば、CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（例えば、HELA、ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（例えば、MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝細胞（例えば、BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（例えば、W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（例えば、Hep G2、HB 8065）；及びマウス乳癌細胞（例えば、MMT 060562、ATCC CCL 51）を含む。本明細書に記載のキメラタンパク質を発現させるための例示的癌細胞型は、マウス線維芽細胞株、NIH 3T3、マウスルイス肺癌細胞株、LLC、マウス肥満細胞株、P815、マウスリンパ腫細胞株、EL4 及びそのオブアルブミン形質移入体、E.G7、マウス黒色腫細胞株、B16F10、マウス線維肉腫細胞株、MC57、及びヒト小細胞肺癌細胞株、SCLC #2 及びSCLC #7を含む。

#### 【0170】

宿主細胞は、健康なヒト、癌患者、及び感染症患者を含む健常又は罹患している患者、民間研究室預託、アメリカンタイプカルチャーコレクションなどの公共の培養物コレクション、又は商業サプライヤーから入手できる。

#### 【0171】

インビトロ、エクソビオ、及び／又はインビオで本発明のキメラタンパク質の生成に使用できる細胞は、限定されないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞；様々な幹細胞又は前駆細胞、特に、造血幹細胞又は前駆細胞（例えば、骨髄から得られるもの）、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などを含む。細胞型の選択は、治療若しくは予防される腫瘍の種類又は感染症に依存し、当業者が決定できる。

#### 【0172】

##### 対象及び／又は動物

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

#### 【0173】

実施形態において、対象及び／又は動物は、ヒトである。実施形態において、ヒトは小児のヒトである。実施形態において、ヒトは、成人のヒトである。実施形態において、ヒトは、老人のヒトである。実施形態において、ヒトは、患者と呼ばれ得る。

#### 【0174】

ある実施形態において、ヒトは、生後約0ヶ月～約6ヶ月、生後約6ヶ月～約12ヶ月

10

20

30

40

50

、生後約6ヶ月～約18ヶ月、生後約18ヶ月～約36ヶ月、約1歳～約5歳、約5歳～約10歳、約10歳～約15歳、約15歳～約20歳、約20歳～約25歳、約25歳～約30歳、約30歳～約35歳、約35歳～約40歳、約40歳～約45歳、約45歳～約50歳、約50歳～約55歳、約55歳～約60歳、約60歳～約65歳、約65歳～約70歳、約70歳～約75歳、約75歳～約80歳、約80歳～約85歳、約85歳～約90歳、約90歳～約95歳、又は約95歳～約100歳の範囲の年齢を有する。

#### 【0175】

実施形態において、対象は非ヒト動物であり、したがって、本発明は獣医学での使用に関する。特定の実施形態において、非ヒト動物は家庭用ペットである。別の特定の実施形態において、非ヒト動物は家畜動物である。

10

#### 【0176】

##### キット

本発明は、本明細書に記載の任意の薬剤の投与を簡素化できるキットを提供する。本発明の例示的なキットは、本明細書に記載の任意の組成物を単位剤形で含む。実施形態において、単位剤形は、殺菌できる予め充填された注射器などの容器であり、本明細書に記載の任意の薬剤及び医薬として許容される担体、希釈剤、賦形剤、又はビヒクルを含有する。キットは、本明細書に記載の任意の薬剤の使用を説明するラベル又は印刷された説明書をさらに含んでよい。キットはまた、蓋スペキュラム、局所麻酔薬、及び投与場所のための洗浄剤を含み得る。キットはまた、本明細書に記載の1以上の追加の薬剤をさらに含んでよい。実施形態において、キットは、本明細書に記載のものなどの、有効量の本発明の組成物及び有効量の別の組成物を含有する容器を含む。

20

#### 【0177】

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

#### 【0178】

本発明は、特許請求の範囲に記載の本発明の範囲を限定しない以下の実施例でさらに説明される。

#### 【0179】

##### 実施例

実施例1：ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のコンピューターシミュレーション予測二次構造

30

603個のアミノ酸残基を有するヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のコンピューターシミュレーション構造予測を行い、p値は $5.36 \times 10^{-16}$ であった。単量体タンパク質の分子量は約68.1kDaであると予測された。キメラタンパク質の構造を図1Aに提供する。図1Bは、腫瘍細胞とT細胞の間で、キメラタンパク質によって形成されたシナプスを示す。

#### 【0180】

キメラタンパク質の配列全体の二次構造予測は、タンパク質が0%の-H-ヘリックス(H)、58%の-S-シート(E)、及び41%のコイル(C)の組成を有することを示した。絶対グローバル品質のGDT(グローバル距離検定)及びuGDT(非正規化GDT)も、キメラタンパク質について計算され、362(60)の全体的なuGDT(GDT)を得た。タンパク質残基の溶媒アクセスibilityに関する3つの状態予測は、33%の露出(E)、47%の中間(M)、及び19%の埋没(B)であった。

40

#### 【0181】

実施例2：ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質の特徴付け

ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質を、詳細な説明で上に記載されるように、かつ内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第62/464,002号のように構築した。キメラタンパク質を、キメラタンパク質の各ドメインに対する、すなわち、抗V S I G 8、抗F C、及び抗O X 4 0 L 抗体によるウェスタンプロット分析を行うことにより特徴付けた。

50

## 【0182】

ウェスタンプロットは、非還元レーン（メルカプトエタノール又はP N Gアーゼを含まない；図2、各プロットのレーン2）における優勢な二量体バンドの存在を示し、これは、還元剤（-メルカプトエタノール）の存在下で、グリコシル化単量体バンドに還元された（図2、各プロットのレーン3）。図2、各プロットのレーン4に示すように、キメラタンパク質は、還元剤（-メルカプトエタノール）とエンドグリコシダーゼペプチド：Nグリコシダーゼ（P N Gアーゼ）の両方の存在下で、約68.1 k D aの予測分子量で単量体として移動した。

## 【0183】

実施例3：E L I S Aを用いるヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性の特徴付け

酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）アッセイを、ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L の異なるドメインの、それぞれのh I g G又は組換えO X 4 0 Lに対する結合親和性を実証するために開発した。具体的には、キメラタンパク質のF c部分を、プレート結合ヒトI g Gへ捕捉しH R Pコンジュゲート抗ヒトI g G抗体により検出した（図3の左パネル）。キメラタンパク質のO X 4 0 ドメインを、プレート結合組換えO X 4 0 タンパク質へ捕捉し、抗O X 4 0 特異的抗体により検出した（図3の右パネル）。E L I S Aアッセイにおいて、中央F c領域を用いてキメラタンパク質を検出すると、試料中の実際のタンパク質含有量を過小評価する傾向があることが観察された。したがって、このアッセイにおける標準物質と比較して低レベルのh V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質が検出された。

## 【0184】

実施例4：ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のインビトロ細胞結合親和性の特徴づけ

細胞結合アッセイを行って、哺乳動物細胞膜の表面上のそれらのそれぞれの結合パートナーに対するヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性を実証した。

## 【0185】

細胞結合アッセイのために、不死化細胞株を、ヒトO X 4 0（J u r k a t / h O X 4 0）を安定に発現するように工学処理した。漸増濃度のV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質を、過剰発現（J u r k a t / h O X 4 0）細胞株と2時間インキュベートした。細胞を収集し、洗浄し、フローサイトメトリーによるキメラタンパク質結合の検出のための抗体で染色した。

## 【0186】

図4に示すように、V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質は、濃度依存的にかつ低いn Mの親和性で、細胞表面上に存在するO X 4 0に結合した。具体的には、図4に示すように、細胞結合アッセイは、V S I G 8 - F c - O X 4 0 L が、約30 n Mの親和性（E C<sub>50</sub>計算による）でO X 4 0に結合することを実証した。

## 【0187】

実施例5：表面プラズモン共鳴（S P R）によるヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質の結合親和性の特徴付け

ヒトV S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のO X 4 0 L ドメインの結合親和性を、B i o R a d P r o t e O n X P R 3 6 0 システムを用いる表面プラズモン共鳴（S P R）によって測定した。具体的には、ヒトO X 4 0に対するキメラタンパク質の親和性を決定し、組換え対照タンパク質及びタボリクマブ（抗ヒトO X 4 0抗体）と比較した。結果を図5及び以下の表に示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

試料 ID	リガンド	濃度 [nM]	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	KD (nM)
Fc-OX40L	hDX40-His	222.2	4.17E+04	2.54E-03	<b>61</b>
タボリクマブ	hDX40-His	66.7	3.32E+05	5.03E-05	<b>0.152</b>
VSIG8-Fc-OX40L	hDX40-His	117.6	3.31E+05	2.54E-04	<b>0.767</b>

## 【0188】

V SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質は、高い親和性で hOX40 に結合することが判明した。特に、h V SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質のオフ速度は、対照の Fc - OX40L タンパク質よりもはるかに遅いことが認められた。例えば、OX40L のキメラタンパク質のオフ速度は、Fc - OX40L タンパク質より 10 倍遅かった。

10

## 【0189】

## 実施例 6 . インビトロでのOX40シグナル伝達の誘導

ヒトOX40の活性化は、NF - B と NIK の両方の活性化を伴うシグナル伝達カスケードの誘導をもたらす。図6は、ヒトV SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質を用いるインビトロ NF - B / NIK シグナル伝達アッセイからの例示的データを示す。ディスカバーX (Discover X) NIK シグナル伝達アッセイからの U2OS 細胞を、市販の片面 hFc - OX40L、抗OX40L 抗体（オキセルマブ）、抗OX40 抗体（タボリクマブ）、又はヒトV SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質のいずれかの滴定と培養した。相対ルシフェラーゼ単位 (RLU) は、示されるレジメンでの処理後に活性化された NF - B / NIK シグナル伝達の相対強度を示す。V SIG8 - Fc - OX40L は、NF - B 及び NIK を介し及び他の示されるレジメンのいずれかよりも大きな程度に強力に活性化されるシグナル伝達を有することが示される。

20

## 【0190】

## 実施例 7 : スーパー抗原サイトカイン放出アッセイにおけるヒトV SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質の機能的活性

ヒトV SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質の機能活性を特徴付けるために行った別の機能アッセイは、スーパー抗原サイトカイン放出アッセイである。このアッセイでは、200ng/ml のブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB) を用いて、様々な濃度の試験剤、すなわち、片面ヒトFc - OX40L、市販の片面V SIG8 - Fc、2つの片面分子の組み合わせ、又はヒトV SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質の存在下でヒト末梢血白血球を活性化した。3日後に、上清を、ヒトIL2 に特異的なELISA を用いて評価した。

30

## 【0191】

図7に示すように、培養上清中に分泌されるIL-2の量を、抑制性シグナル伝達事象を阻止するか、又は免疫活性化シグナルを共刺激する試験剤の能力の機能的読み出しとして監視した。0.5nmを超える濃度で、V SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質は、任意の他の試験剤又は薬剤の組み合わせよりも高いレベルで、かつ任意の濃度で（最大50nM）で IL-2 の分泌を誘導した。培地及び IgG 対照を使用した。まとめると、これらの結果は、h V SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質が、インビトロで初代ヒト白血球細胞を機能的に活性化することを示唆する。

40

## 【0192】

## 実施例 8 : ELISA を使用する V SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパクの異なるドメインの結合親和性の特徴付け

ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）アッセイを、マウスV SIG8 - Fc - OX40L の異なるドメインの、それらのそれぞれの結合パートナー（すなわち、VISTA、ヒトIgG（hIgG）、又はOX40）に対する結合親和性を実証するために開発した。具体的には、mV SIG8 - Fc - OX40L キメラタンパク質のV SIG8 ドメイ

50

ンを、プレート結合組換えマウスVISTAタンパク質へ捕捉し、OX40L特異的抗体を用いて検出した。キメラタンパク質のFc部分を、プレート結合hIgGへ捕捉し、HRPコンジュゲート抗hIgG抗体により検出した。キメラタンパク質のOX40Lドメインを、プレート結合組換えマウスOX40タンパク質へ捕捉し、OX40L特異的抗体により検出した。

#### 【0193】

図8に示すように、mVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の異なるドメインは、高い親和性でそれらのそれぞれの結合パートナーと効果的に相互作用した。それにもかかわらず、ELISAアッセイにおいて、中央Fc領域を用いてキメラタンパク質を検出することは、試料中の実際のタンパク質含有量を過小評価する傾向があることが観察された。したがって、低レベルのVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質が、このアッセイにおいて標準物質と比較して検出された。バンドのサイズは、予想単量体分子量が約68.1kDaであると確認され、キメラタンパク質の天然状態がグリコシル化二量体であることを示唆する。

10

#### 【0194】

実施例9：マウスVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパクの特徴付け

マウスVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質を、詳細な説明で上に記載されるように、かつ内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第62/464,002号のように構築した。

20

#### 【0195】

図9A～図9Cは、マウスVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の異なるドメインの、それらのそれぞれの結合パートナーに対する結合親和性を実証するELISAアッセイを示す。具体的には、mVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質のVSG8ドメインを、プレート結合組換えマウスVISTAタンパク質（VSG8の結合パートナー）へ捕捉し、HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体により検出した（図9A）。市販のmVSG8-Fcの標準物質は利用できないため、標準曲線を作成しなかった。キメラタンパク質のFc部分を、プレート結合マウスIgGへ捕捉し、HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体により検出した（図9B）。キメラタンパク質のOX40Lドメインを、プレート結合組換えマウスOX40タンパク質へ捕捉し、OX40L特異的抗体により検出した（図9C）。図9A～図9Cは、mVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の異なるドメインが、高い親和性でそれらのそれぞれの結合パートナーと効果的に相互作用したことを示す。それにもかかわらず、ELISAアッセイにおいて、中央Fc領域を用いてキメラタンパク質を検出することは、試料中の実際のタンパク質含有量を過小評価する傾向があることが観察された。したがって、このアッセイにおいて、標準物質と比較して低レベルのmVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質が検出された。

30

#### 【0196】

実施例10：VSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質のインビトロ細胞結合親和性の特徴付け

40

細胞結合アッセイを行って、哺乳動物細胞膜の表面上のそれらのそれぞれの結合パートナーに対するマウスVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の異なるドメインの結合親和性を実証した。

#### 【0197】

細胞結合アッセイのために、不死化細胞株を、マウスVISTA（EL4-mVISTA）及びマウス受容体OX40（CHOK1-mOX40）を安定に発現するように工学処理した。漸増濃度のmVSG8-Fc-OX40Lを、各親細胞株（対照）及び過剰発現細胞株と2時間インキュベートした。細胞を収集し、洗浄し、フローサイトメトリーによるキメラタンパク質結合の検出のための抗体で染色した。

#### 【0198】

図10A及び図10Bに示すように、mVSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク

50

質は、濃度依存的にかつ低いnMの親和性で、細胞表面上に存在するmVISTA及びmOX40に結合した。具体的には、図10Aに示すように、EL4親細胞株（下の曲線）は、それがVISTAを過剰発現しなかったので、漸増濃度のmVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質に応答しなかった。比較して、mVISTAを過剰発現するように工学処理したEL4-mVISTA細胞株（上の曲線）は、濃度依存的にmVSIG8-Fc-OX40Lに結合した。同様に、図10Bに示すように、CHOK1親細胞株（下の曲線）は、それがmOX40を過剰発現しなかったので、漸増濃度のmVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質に応答しなかった。対照的に、mOX40を過剰発現するように工学処理したCHOK1-mOX40細胞株（上の曲線）は、濃度依存的にmVSIG8-Fc-OX40Lに結合した。細胞結合アッセイはまた、mVSIG8-Fc-OX40Lが16nMの親和性でmOX40に結合すること、及び56nMの親和性でmVISTAに結合することを示した（EC<sub>50</sub>計算による）。

#### 【0199】

実施例11：表面プラズモン共鳴（SPR）によるマウスVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の結合親和性の特徴付け

マウスVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質のOX40Lドメインの結合親和性を、BioRad ProteOn XPR 360システムを用いる表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定した。具体的には、マウスOX40のキメラタンパク質の親和性を決定し、市販の組換え対照タンパク質（mFc-OX40L）と比較した。結果を図11に示す。mVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質は、高い親和性でmOX40に結合することが判明した。

#### 【0200】

実施例12：インビトロでのOX40シグナル伝達の誘導

マウスOX40の活性化は、NF-BとNIKの両方の活性化を伴うシグナル伝達力スケードの誘導をもたらす。図12は、マウスVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質を用いたインビトロNF-B/NIKシグナル伝達アッセイからの例示的データを示す。ディスカバーX（Discover X）NIKシグナル伝達アッセイからのU2OS細胞を、無関係のタンパク質、市販の片面hFc-OX40L、又はmVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質のいずれかの滴定と培養した。相対ルシフェラーゼ単位（RLU）は、示されるレジメンでの処理後に活性化されたNF-B/NIKシグナル伝達の相対的強度を示す。VSIG8-Fc-OX40Lは、NF-B及びNIKを介して及び他の示されるレジメンのいずれよりも大きな程度に強力に活性化されるシグナル伝達を有することが示される。

#### 【0201】

実施例13：VSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の機能アッセイ

インビオ機能アッセイを行って、マウスVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の機能活性を実証した。マウスに、0日目にCT26腫瘍を接種した。腫瘍が触知可能であり、直径が少なくとも4~6mmになった時に、マウスを150μgのmVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質の2回用量で処置した。免疫表現型検査を、腫瘍移植後13日目に、マウスから収集した様々な組織で行った。

#### 【0202】

図13A~図13Cは、インビオでの機能アッセイからの結果を示す。免疫プロファイリングを、mVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質で処置した腫瘍担持マウスで行った。図13Aに示すように、mVSIG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質で処置したマウスは、未処置の対照マウスと比較した場合、脾臓、末梢リンパ節、及び腫瘍においてより高い割合の総CD4+T細胞を示した。脾臓及び腫瘍内で、CD4+T細胞集団のこの増加は、ほとんどCD4+CD25+エフェクターT細胞の増加に起因し、非制御性T細胞の活性化が関与していることを示唆した（図13B）。処置マウスはまた、より低い割合のCD4+CD25+制御性T細胞を示し、制御性T細胞がキメラタンパク質によって抑制され得ることを示唆した（図13B）。

10

20

30

40

50

**【0203】**

C D 8 + T 細胞による腫瘍抗原の認識を刺激するキメラタンパク質の能力も分析した。具体的には、図 13 C は、C T 2 6 腫瘍により天然に発現される A H 1 腫瘍抗原を認識した C D 8 + T 細胞の画分を決定するための四量体染色分析を示す。脾臓内において、未処理の対照マウスと比較した場合、より高い割合の C D 8 + T 細胞が、m V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質で処置したマウスにおいて A H 1 腫瘍抗原を認識することが見出された。特に、未処置対照マウスと比較した場合、はるかにより高い割合の A H 1 四量体陽性 C D 8 + T 細胞が、キメラタンパク質で処置したマウスの腫瘍浸潤リンパ球(T I L)内で観察された。

**【0204】**

実施例 14 : V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパクのインビオ抗腫瘍活性の特徴付け

V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のインビオ抗腫瘍活性を、C T 2 6 マウス結腸直腸腫瘍モデルを用いて分析した。

**【0205】**

一組の実験で、B a l b / c マウスに、0 日目に C T 2 6 腫瘍細胞を接種し、かつ／又は 3 0 日目に C T 2 6 腫瘍細胞の 2 回目の接種を行った。腫瘍成長の 4 日後に、腫瘍が直径 4 ~ 5 mm に達すると、マウスを、対照抗体又は 1 5 0 μ g のマウス V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質のいずれかで処置した。処置を 7 日目に繰り返した。腫瘍接種後 4 5 日間にわたって腫瘍サイズの発達の分析を行った。

**【0206】**

図 14 A に示すように、未処置マウスは大きな腫瘍を発症し、一方で m V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質で処置したマウスのほとんどは、検出可能なサイズの腫瘍を発症しなかった。図 14 B は、腫瘍接種後 5 0 日にわたるマウスの全生存率を示す。未処置マウスの全ては腫瘍接種後 2 1 日以内に死亡したが、m V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質で処置したマウスは、腫瘍接種後 3 0 日目で 1 0 0 % の生存率を示した。腫瘍接種後 5 0 日目に、m V S I G 8 - F c - O X 4 0 L 処置マウスの 7 5 % 超が生存したままであった。図 14 C は、各グループの治療結果をまとめたものである。図 14 C に示すように、キメラタンパク質での処置はまた、対照抗体での処置よりも有意に高い腫瘍拒絶をもたらした。特に、幾匹かのマウスは、腫瘍成長と抗腫瘍免疫の間の平衡効果と一致して、長期の腫瘍安定化を示した。この期間は、キメラタンパク質の最後の処理を十分に超えて延長し、記憶免疫が活性化された可能性を示唆する。興味深いことに、免疫平衡が観察された一部のマウスは、完全な腫瘍拒絶が遅れた。より具体的には、キメラタンパク質での処置は、原発性腫瘍の拒絶及び再負荷中に投与される腫瘍細胞の完全な拒絶をもたらし、記憶 T 細胞が関与し得ることを示唆した。

**【0207】**

上記のデータは、V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質での処置がインビオで免疫記憶効果をもたらすことを示唆する。そのため、処置した動物は、キメラタンパク質での最初の処置後の再負荷時に、腫瘍細胞を後に攻撃し、かつ／又は腫瘍の発生を防止できる。

**【0208】**

実施例 15 : マウス V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質の E L I S A ベースの抗薬物抗体アッセイ

E L I S A ベースの抗薬物抗体(A D A)アッセイを、マウス V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質を用いて行った。高結合 E L I S A プレートを、動物血清(青い線；出発の未希釈「ニート」)、次いで、1 : 2、1 : 4、及び 1 : 8 の希釈)又は組換えマウス F c (黒線；5 μ g / mL から出発し、次いで、1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 1 6、及び 1 : 3 2 の希釈)のいずれかでコーティングし、1 0 μ g / mL の m V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質でプローブした。血清を、原発性と続発性の両方の C T 2 6 腫瘍を拒絶したマウスから採取し、次いで、9 1 日目に腹腔内(I P)注射に

10

20

30

40

50

より 150 μg の m V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質を第 3 の用量で負荷した。血清を、98 日目の 1 週間後に採取した。キメラタンパク質を、ヤギ抗マウス O X 4 0 L 抗体、続いて抗ヤギ H R P 三次抗体を用いて検出した。吸光度の値 (O D 4 5 0) 及び各曲線の非線形フィットを、図 15 に示す。

#### 【 0 2 0 9 】

実施例 16：キメラタンパク質の機能性へのリンカー中の F c ドメインの寄与の特徴付け  
この実施例において、本発明のキメラタンパク質の機能性へのリンカー中の F c ドメインの寄与をアッセイした。ここで、P D 1 - F c - O X 4 0 L を F c 含有キメラタンパク質のモデルとして用いた。そのため、以下に示すデータは、本発明のキメラタンパク質に関連する。

10

#### 【 0 2 1 0 】

天然状態では、P D 1 は単量体として存在し、一方で O X 4 0 L は、O X 4 0 L ドメイン間の静電相互作用により二量体化する傾向がある。F c ドメインは、ジスルフィド結合を介して互いに結合する。まとめると、いくつかの分子間相互作用は、P D 1 - F c - O X 4 0 L の四次構造に寄与し得る。少なくとも、P D 1 - F c - O X 4 0 L の 4 つの潜在的な構造があり、キメラタンパク質は単量体、二量体、三量体、又は六量体として存在する。図 16 を参照されたい。

#### 【 0 2 1 1 】

キメラタンパク質の単量体及び二量体の構造の存在を、キメラタンパク質を還元条件及び非還元条件に暴露し、その後 SDS - P A G E でタンパク質を泳動することによって試験した。非還元条件下（還元：「-」）では、キメラタンパク質は、SDS - PAGE で約 200 k D a の位置に移動した。ここで、ウェスタンプロットを、P D 1、F c、又は O X 4 0 L に対する抗体でプローブし、それぞれ、図 17 の左、真ん中、及び右のプロットに示した。キメラタンパク質の予測単量体分子量は 57.6 k D a であるので、200 k D a 種は、少なくとも二量体であると予想された。しかしながら、ジスルフィド結合（例えば、F c ドメイン間の）を還元する還元条件下（還元：「+」）では、キメラタンパク質は、SDS - PAGE で約 100 k D a の位置に移動した。100 k D a 種は予想よりも大きかったので、余分な質量はグリコシル化によるものと予測された。最後に、キメラタンパク質をペプチド - N - グリコシダーゼ F (PNG アーゼ F 「+」) で処理し、還元条件下で SDS - PAGE で泳動した。これらの条件下で、キメラタンパク質は約 57.6 k D a の位置に移動した。これらのデータは、キメラタンパク質がグリコシル化され、少なくとも二量体として天然に存在することを示唆しており、二量体化は、F c ドメイン間のジスルフィド結合に起因する可能性が高い。

20

#### 【 0 2 1 2 】

SDS - PAGE ゲル法は、高電荷及び / 又は大きな分子量のタンパク質について分子量を正確に予測しない。そのため、キメラタンパク質を次に、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて特徴付けた。負電荷 SDS がペプチド間の電荷ベースの相互作用を低下させる SDS - PAGE とは異なり、SEC は界面活性剤又は還元剤を使用しない。P D 1 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質を SEC にかけると、約 200 k D a 付近にピークはなかった。これは、天然では、キメラタンパク質は二量体として存在しないことを示唆する。代わりに、670 k D a を超えるサイズを有するピークが検出された。図 18 を参照されたい。このデータ及び以前のデータは、P D 1 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質がその天然状態で六量体として存在することを示唆する。

30

#### 【 0 2 1 3 】

上に示したように、非還元条件下又は還元条件下にて SDS - PAGE で泳動すると、試料及び / 又は泳動緩衝液中の SDS は、還元剤の有無にかかわらず、六量体の P D 1 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質をそれぞれ優勢な二量体又は単量体に変換する。図 19 (左ゲル) を参照されたい。SDS を欠くネイティブ PAGE 上で泳動すると、還元剤の非存在下で、キメラタンパク質は六量体として存在する。しかしながら、還元剤 (ジスルフィド結合を低下させる) の存在下で、ネイティブ PAGE で泳動すると、キメラタン

40

50

パク質は予想よりも重く移動した。図19に示すように(右ゲル、レーン#2)、キメラタンパク質は、実質的に、ローディングウェルから移動できなかった。このデータは、キメラタンパク質が、より高次のタンパク質にオリゴマー化したことを示唆する。そのため、キメラタンパク質において、ジスルフィド結合は、より高次のオリゴマー化を制御するのに重要であると思われる。

#### 【0214】

これをさらに確認するために、Fcドメインを欠くキメラタンパク質、例えば、「PD1-No-Fc-OX40L」を構築した。そのようなキメラタンパク質は、前述のキメラタンパク質中のFcドメイン間で生じるジスルフィド結合を有しない。図20に示すように、Fcドメインを欠くキメラタンパク質をネイティブPAGEで泳動すると、実質的にどのタンパク質もそのローディングウェルから移動せず(レーン#1~#4は、漸増ローディング濃度のPD1-No-Fc-OX40Lを示す)、再び、「Fcを含まない」キメラタンパク質は、多数のタンパク質を含むコンカテマー様複合体を形成したことを示唆する。そのため、キメラタンパク質中のFcドメインの除去は、タンパク質凝集体の形成をもたらす。これらのデータは、例えば、異なるキメラタンパク質上のFcドメイン間の、ジスルフィド結合が、キメラタンパク質を安定化しかつ、それらが高次タンパク質/コンカテマーとしてではなく、六量体としてそれぞれ存在することを保証することを示す。言い換えれば、Fcドメインは、驚くべきことに、キメラタンパク質複合体に秩序をもたらす。レーン#1~#4はそれぞれ、PD1-No-Fc-OX40Lを2.5μg、PD1-No-Fc-OX40Lを5μg、PD1-No-Fc-OX40Lを7.5μg、及びPD1-No-Fc-OX40Lを10μg含む。

10

20

#### 【0215】

図21に示すのは、上記のデータをまとめ、本発明のキメラタンパク質から六量体及びコンカテマーが形成される方法を示すモデルである。例示的なキメラタンパク質(PD1-Fc-OX40L)は、自然に六量体を形成する(OX40Lドメイン間の静電相互作用とFcドメインによる二量体化による)。しかしながら、PD1-Fc-OX40Lタンパク質について還元条件下で、Fcドメイン間のジスルフィド結合の制御効果が存在せず、かつPD1-No-Fc-OX40L中にFcドメインが存在しないために、これらの後者のキメラタンパク質はコンカテマーを形成する。

30

#### 【0216】

さらに、Fcドメイン(本明細書に記載の)がフィコリン(キメラタンパク質間のジスルフィド結合に必要なシステイン残基を欠く)と置換されたキメラタンパク質を構築した。Fcを含まないキメラタンパク質及びFcを含みネイティブPAGEで還元剤の存在下で泳動したキメラタンパク質(両方ともゲル中に移動しない凝集体を形成した)と同様に、フィコリンを含むキメラタンパク質もまた、高次格子を形成するように見え、ゲル中に移動しなかった。これらのデータは、ジスルフィド結合が本発明のキメラタンパク質の適切な折りたたみ及び機能にとって重要であるという結論を強化する。

#### 【0217】

最後に、キメラタンパク質を、コイル状Fcドメイン(CCDFc)を用いて調製した。機能評価において、ほとんどの精製タンパク質は送達されなかった。

40

#### 【0218】

したがって、キメラタンパク質のリンカー中にFcドメインを含めること(これはキメラタンパク質間のジスルフィド結合を形成できる)は、不溶性で、おそらく非機能的なタンパク質コンカテマー及び/又は凝集体の形成を回避するのに役立つ。

#### 【0219】

実施例17：他のII型タンパク質の細胞外ドメインを含む追加VSG8含有キメラタンパク質の生成

この実施例で、本発明の追加のキメラタンパク質を記載する。そのような追加のキメラタンパク質は、VSG8-Fc-OX40Lキメラタンパク質が作製される方法と同じように、例えば、詳細な説明で上に記載されるように、かつ内容が参照によりその全体が

50

本明細書に組み込まれる米国特許第 6 2 / 4 6 4 , 0 0 2 号のように作製される。

#### 【 0 2 2 0 】

これらの追加のキメラタンパク質は、一般式：E C D 1 - 結合リンカー 1 - F c ドメイン - 結合リンカー 2 - E C D 2 を有し、式中、E C D 1 は V S I G 8 の細胞外ドメインであり、E C D 2 は、O X 4 0 L 以外の I I 型タンパク質の細胞外ドメインである。例示的な I I 型タンパク質は、4 - 1 B B L 、 C D 3 0 L 、 C D 4 0 L 、 F a s L 、 G I T R L 、 L I G H T 、 T L 1 A 及び T R A I L を含む。これらのキメラタンパク質は、結合リンカーの一方又は両方を欠く場合がある。例示的な結合リンカー 1 、 F c ドメイン、及び結合リンカー 2 は、上の表 1 に記載されている。キメラタンパク質を形成するのに有用で、かつ特異的結合リンカー 1 、 F c ドメイン、及び結合リンカー 2 を含むモジュラーリンカーを、図 2 2 に示す。

10

#### 【 0 2 2 1 】

或いは、追加のキメラタンパク質は、一般式：N 末端 - ( a ) - ( b ) - ( c ) - C 末端（式中、( a ) は V S I G 8 であり、( b ) は、F c ドメインの少なくとも一部を含むリンカーであり、( c ) は、O X 4 0 L 以外の I I 型タンパク質の細胞外ドメインである）を有する融合タンパク質である。例示的な I I 型タンパク質は、4 - 1 B B L 、 C D 3 0 L 、 C D 4 0 L 、 F a s L 、 G I T R L 、 L I G H T 、 T L 1 A 及び T R A I L を含む。例示的なリンカーを、上の表 1 に記載する。キメラタンパク質を形成するのに有用で、特異的結合リンカー 1 、 F c ドメイン、及び結合リンカー 2 を含むモジュラーリンカーを、図 2 2 に示す。

20

#### 【 0 2 2 2 】

4 - 1 B B L 、 C D 3 0 L 、 C D 4 0 L 、 F a s L 、 G I T R L 、 L I G H T 、 T L 1 A 及び T R A I L のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 7 、 9 、 11 、 13 、 15 、 17 、 21 、及び 23 を含む。4 - 1 B B L 、 C D 3 0 L 、 C D 4 0 L 、 F a s L 、 G I T R L 、 L I G H T 、 T L 1 A 及び T R A I L の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 8 、 10 、 12 、 14 、 16 、 18 、 22 、及び 24 を含む。V S I G 8 のアミノ酸配列は配列番号 1 を含み、V S I G 8 の細胞外ドメインは、配列番号 2 を含む。キメラタンパク質は、上記配列の変異体、例えば、上記の配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を含み得る。

30

#### 【 0 2 2 3 】

したがって、本発明は、（例えば、癌の治療及び／又は炎症性疾患の治療において）追加のキメラタンパク質：V S I G 8 - F c - 4 - 1 B B L 、 V S I G 8 - F c - C D 3 0 L 、 V S I G 8 - F c - C D 4 0 L 、 V S I G 8 - F c - F a s L 、 V S I G 8 - F c - G I T R L 、 V S I G 8 - F c - L I G H T 、 V S I G 8 - F c - T L 1 A 、及び V S I G 8 - F c - T R A I L を用いる、以下の追加のキメラタンパク質及び方法をさらに含む。

#### 【 0 2 2 4 】

追加のキメラタンパク質を、V S I G 8 - F C - O X 4 0 L を特徴付けるのに必要というよりむしろ追加のキメラタンパク質に特異的である試薬（例えば、結合パートナー、組換え標的細胞、及び癌細胞型／腫瘍型）と共にであるが、実施例 1 ~ 1 5 で C S F 1 R - F c - C D 4 0 L について上に記載のように特徴付ける。そのため、例として V S I G 8 - F c - 4 - 1 B B L を使用して、実施例 2 と同様の V S I G 8 - F c - 4 - 1 B B L の特徴付けを、V S I G 8 - F c - O X 4 0 L に必要な抗 V S I G 8 、抗 F c 、及び抗 O X 4 0 L 抗体よりむしろ、抗 V S I G 8 、抗 F c 、及び抗 4 - 1 B B L 抗体を用いて行うことができる。

40

#### 【 0 2 2 5 】

V S I G 8 - F c - O X 4 0 L キメラタンパク質と同様に、追加のキメラタンパク質は、4 - 1 B B L 、 C D 3 0 L 、 C D 4 0 L 、 F a s L 、 G I T R L 、 L I G H T 、 T L 1 A 、及び T R A I L の 1 つの受容体／リガンドの活性化により、V S I G 8 を遮断し（免疫阻害性シグナル伝達を阻害し）、免疫刺激シグナルの伝達を増強、増加、及び／若しくは刺激することによる癌の治療並びに／又は炎症性疾患の治療に有効である。さらに、追

50

加のキメラタンパク質は、複数の抗体、例えば、VISTAプロッキング抗体及び4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A、及びTRAILの1つの受容体／リガンドに対するアゴニスト抗体を含む治療に起因する毒性なしに、癌及び／又は炎症性疾患を治療することにおいてに有効である。

(付記)

本開示は以下の態様を含む。

<1> (a) Vセットの一部及びVSIG8リガンドに結合できる免疫グロブリンドメイン含有タンパク質8(VSIG8)を含む第1のドメイン；

(b) OX40L受容体に結合できるOX40リガンド(OX40L)の一部を含む第2のドメイン；並びに

(c) 前記第1のドメイン及び前記第2のドメインを連結するリンカーを含む異種キメラタンパク質。

<2> 前記第1のドメインが、VSIG8の細胞外ドメインの実質的に全てを含みかつ前記第2のドメインが、OX40Lの細胞外ドメインの実質的に全てを含む、<1>に記載の異種キメラタンパク質。

<3> 前記異種キメラタンパク質が、免疫抑制シグナルを阻害できる、<1>又は<2>に記載の異種キメラタンパク質。

<4> 前記異種キメラタンパク質が、

(a) VSIG8の一部がそのリガンドに結合した時に免疫阻害シグナルを低減、破壊、若しくは除去できかつ／又は

(b) OX40Lの一部がその受容体に結合した時に免疫刺激シグナルを増加、刺激、若しくは活性化できる、

<1>又は<2>に記載の異種キメラタンパク質。

<5> 前記VSIG8リガンドが、T細胞活性化のV領域免疫グロブリン含有サプレッサー(VISTA)である、<1>～<4>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<6> 前記OX40L受容体が、OX40である、<1>～<5>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<7> 前記異種キメラタンパク質が、VSIG8リガンド及びOX40L受容体に同時に結合でき、VSIG8リガンドが、VISTAでありかつOX40L受容体が、OX40である、<1>～<6>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<8> 前記キメラタンパク質が、組換えヒトOX40及びヒトVISTAにインピトロで同時に結合できる、<1>～<7>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<9> 前記リンカーが、柔軟なアミノ酸配列、IgGヒンジ領域、又は抗体配列から選択されるポリペプチドである、<1>～<8>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<10> 前記リンカーが、IgG4由来のヒンジ-CH2-CH3Fcドメインを含む、<9>に記載の異種キメラタンパク質。

<11> 前記ヒンジ-CH2-CH3Fcドメインが、ヒトIgG4由来である、<1>～<10>に記載の異種キメラタンパク質。

<12> 前記キメラタンパク質が、分泌可能で機能的な単一ポリペプチド鎖として哺乳動物宿主細胞により発現される、<1>～<11>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<13> 前記VSIG8の一部が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である、<1>～<12>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<14> 前記OX40Lの一部が、配列番号3又は配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である、<1>～<13>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

<15> 前記リンカーが、配列番号25、配列番号26、又は配列番号27のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、<1>～<14>のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

10

20

30

40

50

< 1 6 > 前記リンカーが、配列番号 2 8 ~ 7 4 から独立して選択される結合リンカーなど、1以上の結合リンカーを含む、< 1 > ~ < 1 5 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 1 7 > 前記リンカーが、各々配列番号 2 8 ~ 7 4 から独立して選択される 2 以上の結合リンカーを含み、1つの結合リンカーが、ヒンジ - C H 2 - C H 3 F c ドメインの N 末端でありかつ別の結合リンカーが、ヒンジ - C H 2 - C H 3 F c ドメインの C 末端である、< 1 6 > に記載の異種キメラタンパク質。

< 1 8 > 前記キメラタンパク質が、組換え融合タンパク質である、< 1 > ~ < 1 7 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 1 9 > 前記キメラタンパク質が、C D 8 + T 細胞による腫瘍抗原の認識を増強する、< 1 > ~ < 1 8 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。 10

< 2 0 > 前記キメラタンパク質が、必要に応じて血清中で、V I S T A を枯渇させる、< 1 > ~ < 1 9 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 2 1 > 前記キメラタンパク質が、O X 4 0 アゴニスト抗体及び/又はV S I G 8 アンタゴニスト抗体と比較して増強された抗腫瘍効果を示す、< 1 > ~ < 2 0 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 2 2 > 前記異種キメラタンパク質が、C D 4 + 及び/又はC D 8 + T 細胞の亜集団を増加させることができる又はC D 4 + 及び/又はC D 8 + T 細胞の亜集団の低下を防止できる、< 1 > ~ < 2 1 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 2 3 > 前記異種キメラタンパク質が、T 細胞による腫瘍殺傷活性を増強できる、< 1 > ~ < 2 2 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。 20

< 2 4 > 前記異種キメラタンパク質が、持続的な免疫調節効果を提供できる、< 1 > ~ < 2 3 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 2 5 > 前記異種キメラタンパク質が、抗原提示細胞の活性化を引き起こすことができる、< 1 > ~ < 2 4 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 2 6 > 前記異種キメラタンパク質が、抗原を提示する抗原提示細胞の能力を増強できる、< 1 > ~ < 2 5 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 2 7 > 前記キメラタンパク質が、腫瘍を保護する細胞とは反対に腫瘍を死滅させることができると優先して免疫細胞の比をシフトさせる、< 1 > ~ < 2 6 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 2 8 > 前記キメラタンパク質が、制御性 T 細胞に対するエフェクター T 細胞の比を増加させる、< 1 > ~ < 2 7 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。 30

< 2 9 > 前記キメラタンパク質が、免疫阻害シグナルの持続的なマスキング効果を提供する、< 1 > ~ < 2 8 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 0 > 前記キメラタンパク質が、前記キメラタンパク質の血清  $t_{1/2}$  と比較してより長いオントーゲット（例えば、腫瘍内）の半減期（ $t_{1/2}$ ）を提供する、< 1 > ~ < 2 9 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 1 > 前記キメラタンパク質が、V S I G 8 及びO X 4 0 に対する抗体での治療と比較して毒性を低減する、< 1 > ~ < 3 0 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 2 > 前記キメラタンパク質が、細胞間で安定なシナプスを形成できる、< 1 > ~ < 3 1 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。 40

< 3 3 > 前記細胞間で安定なシナプスが、腫瘍縮小に有利である空間的配向を提供する、< 3 2 > に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 4 > 前記空間的配向が、腫瘍細胞を攻撃するよう T 細胞を位置づけかつ/又は本発明のキメラタンパク質によってマスクされるもの以外の負のシグナルを含む、負のシグナルの送達から腫瘍細胞を立体的に防ぐ、< 3 2 > 又は< 3 3 > に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 5 > そのそれぞれの結合パートナーへの細胞外ドメインのいずれか又は両方の結合が、受容体とそのリガンドの長い相互作用を提供する遅いオフ速度（ $K_{off}$ ）で生じる、< 1 > ~ < 3 4 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 6 > 前記長い相互作用が、より長い正のシグナル効果を送達する、< 3 5 >に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 7 > 前記より長い正のシグナル効果が、抗腫瘍効果のためにエフェクター細胞が十分に刺激されることを可能にする、< 3 6 >に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 8 > 前記長い相互作用が、T細胞増殖を提供しつつ抗腫瘍攻撃を可能にする、< 3 6 >又は< 3 7 >に記載の異種キメラタンパク質。

< 3 9 > 前記長い相互作用が、刺激シグナルの放出を提供するのに十分なシグナル伝達を可能にする、< 3 6 > ~ < 3 8 >のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 4 0 > 前記刺激シグナルが、サイトカインである、< 3 9 >に記載の異種キメラタンパク質。

< 4 1 > < 1 > ~ 4 0 >のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質をコードする核酸を含む、発現ベクター。

< 4 2 > < 4 1 >に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

< 4 3 > < 1 > ~ 4 0 >のいずれか一項に記載の治療有効量の異種キメラタンパク質を含む、医薬組成物。

< 4 4 > 癌又は炎症性疾患を治療する方法であって、それを必要とする対象に< 4 3 >に記載の有効量の医薬組成物を投与することを含む、方法。

< 4 5 > 患者の免疫応答を調節する方法であって、それを必要とする対象に< 4 3 >に記載の有効量の医薬組成物を投与することを含む、方法。

< 4 6 > 前記患者のT細胞が、活性化される、< 4 4 >又は< 4 5 >に記載の方法。

< 4 7 > 前記患者が、腫瘍を有しつつ1以上の腫瘍細胞が、免疫抑制シグナルを伝達することを防止される、< 4 4 >又は< 4 5 >に記載の方法。

< 4 8 > それを必要とする対象に有効量の医薬組成物を投与することを含む癌又は炎症性疾患を治療する方法であって、前記医薬組成物が、

( a ) V S I G 8 リガンドに結合できるコロニー-刺激因子1受容体(V S I G 8)の一部を含む第1のドメイン、

( b ) O X 4 0 L受容体に結合できるC D 4 0 リガンド(O X 4 0 L)の一部を含む第2のドメイン、並びに

( c ) 前記第1のドメイン及び前記第2のドメインを連結するリンカーを含む異種キメラタンパク質を含む、方法。

< 4 9 > 前記対象のT細胞が、前記異種キメラタンパク質の第2のドメインが結合した時に活性化されかつ、

( a ) 1以上の腫瘍細胞が前記異種キメラタンパク質の第1のドメインが結合した時に免疫抑制シグナルを伝達することを防止され、

( b ) 前記対象の末梢血中の定量可能なサイトカイン応答が達成され、かつ/又は、

( c ) 腫瘍成長がO X 4 0 ブロッキング抗体及び/若しくはV I S T A ブロッキング抗体で治療された対象と比較してそれを必要とする対象において低減される、

< 4 8 >に記載の方法。

< 5 0 > 前記方法が、O X 4 0 シグナル伝達を刺激しつつ抗原提示細胞を活性化する、< 4 4 > ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

< 5 1 > 前記方法が、未治療対象又はO X 4 0 / O X 4 0 L及びV I S T A / V S I G 8の1つを標的とする薬剤で治療された対象と比較して制御性T細胞(T r e g)の量又は活性を低下させる、< 4 4 > ~ < 5 0 >のいずれか一項に記載の方法。

< 5 2 > 前記方法が、未治療対象又はO X 4 0 / O X 4 0 L及びV I S T A / V S I G 8の1つを標的とする薬剤で治療された対象と比較して前記対象の流入領域リンパ節におけるエフェクターT細胞のプライミングを増加させる、< 4 4 > ~ < 5 1 >のいずれか一項に記載の方法。

< 5 3 > 前記方法が、未治療対象又はO X 4 0 / O X 4 0 L及びV I S T A / V S I G 8の1つを標的とする薬剤で治療された対象と比較して免疫抑制細胞の全体的な減少及びより炎症性の腫瘍環境へのシフトを引き起こす、< 4 4 > ~ < 5 2 >のいずれか一項に記

10

20

30

40

50

載の方法。

< 5 4 > 医薬としての使用のための < 1 > ~ < 4 0 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 5 5 > 癌の治療での使用のための < 1 > ~ < 4 0 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 5 6 > 炎症性疾患の治療での使用のための < 1 > ~ < 4 0 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質。

< 5 7 > 薬剤の製造における < 1 > ~ < 4 0 > のいずれか一項に記載の異種キメラタンパク質の使用。

< 5 8 > N末端 - ( a ) - ( b ) - ( c ) - C末端の一般構造を含む組換え融合タンパク質であって、式中、

( a )は、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一でありかつV S I G 8リガンドに結合できるV S I G 8の細胞外ドメインを含む第1のドメインであり、

( b )は、前記第1のドメイン及び前記第2のドメインを連結しかつヒトIgG4に由来するヒンジ - C H 2 - C H 3 Fcドメイン、及び必要に応じて配列番号28~74の結合リンカー配列を含むリンカーであり、かつ

( c )は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも95%同一でありかつOX40L受容体に結合できるCD40リガンド(OX40L)の細胞外ドメインを含む第2のドメインである、

組換え融合タンパク質。

< 5 9 > 前記リンカーが、配列番号25、配列番号26、又は配列番号27のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である配列を含む、< 5 8 >に記載の組換え融合タンパク質。

< 6 0 > 薬剤としての使用のための、< 5 8 >又は< 5 9 >に記載の組換え融合タンパク質。

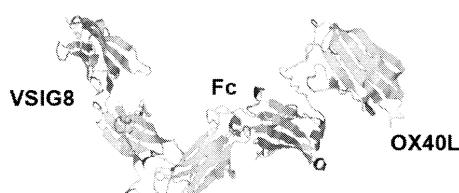
< 6 1 > 癌の治療での使用のための < 5 8 > ~ < 6 0 > のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。

< 6 2 > 炎症性疾患の治療での使用のための、< 5 8 > ~ < 6 0 > のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。

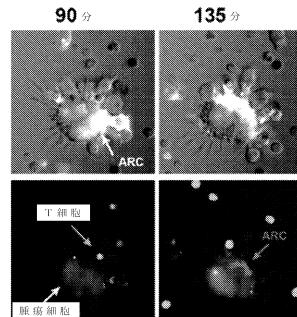
< 6 3 > 薬剤の製造における、< 5 8 > ~ < 6 0 > のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質の使用。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

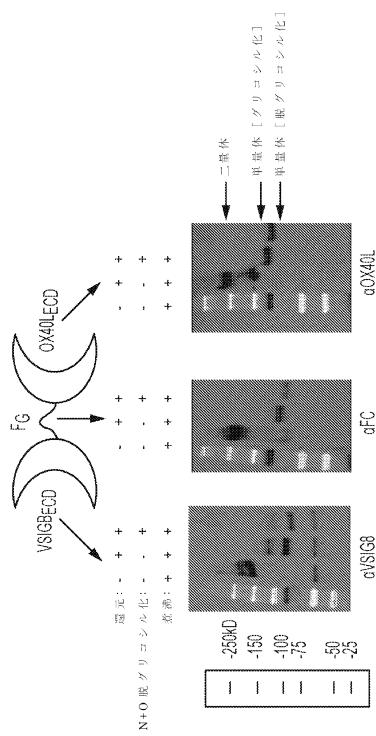
20

30

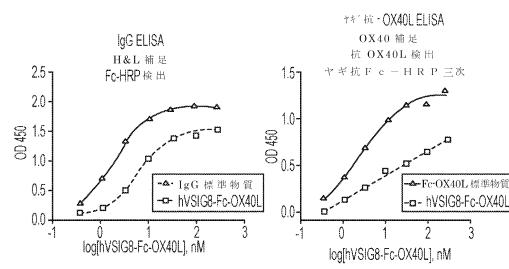
40

50

【図2】



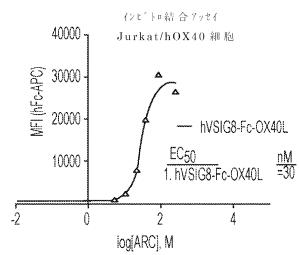
【図3】



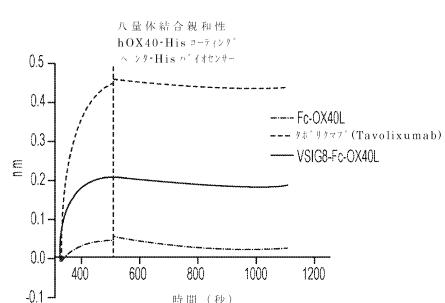
10

20

【図4】



【図5】

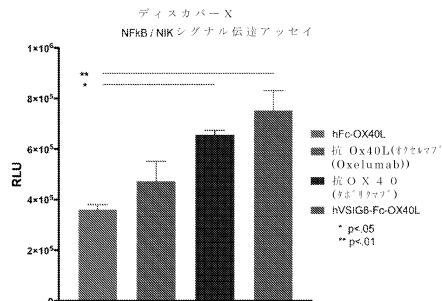


30

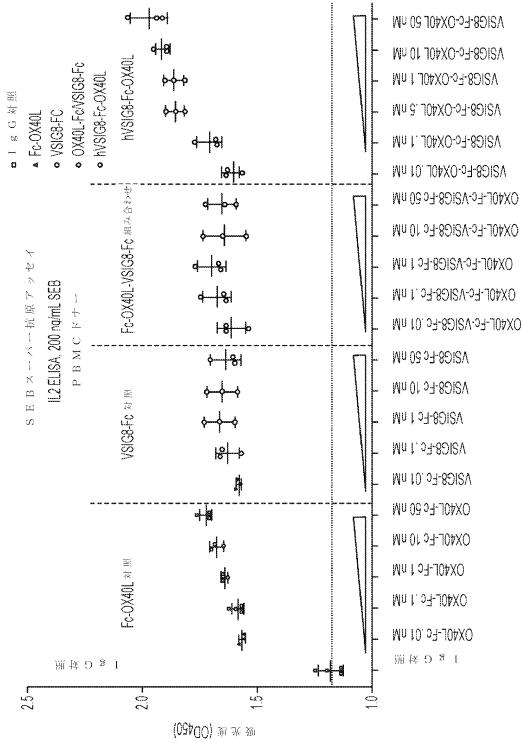
40

50

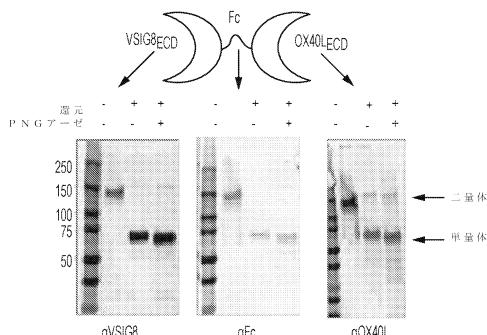
【 四 6 】



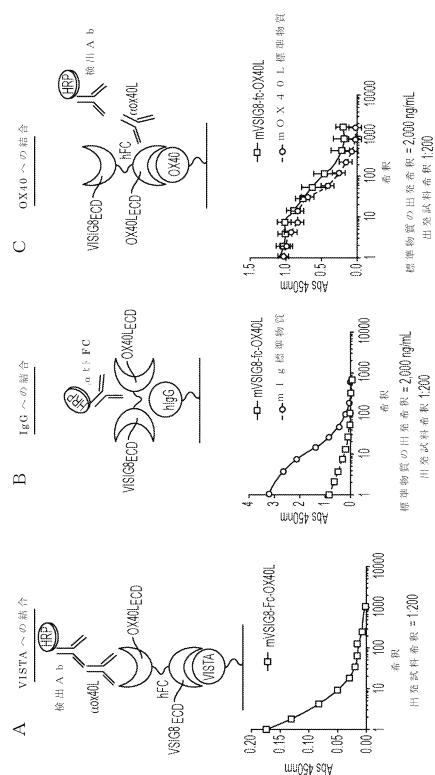
【図7】



【 図 8 】



【図 9 A - C】



10

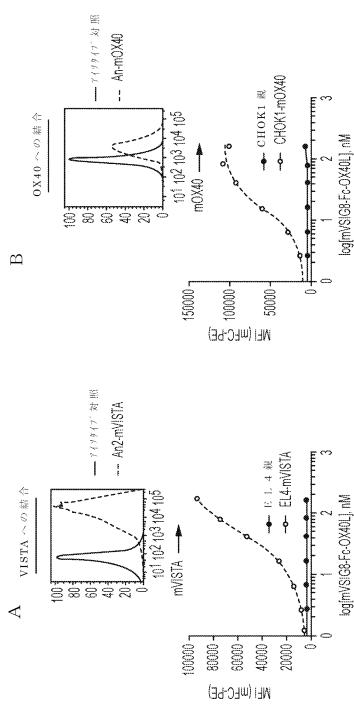
20

30

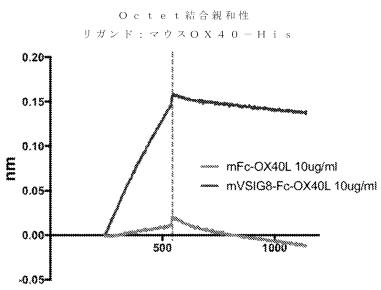
40

50

【図 10 A - B】



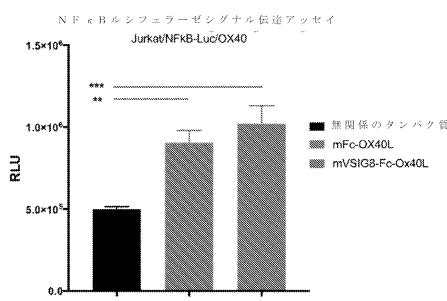
【図 11】



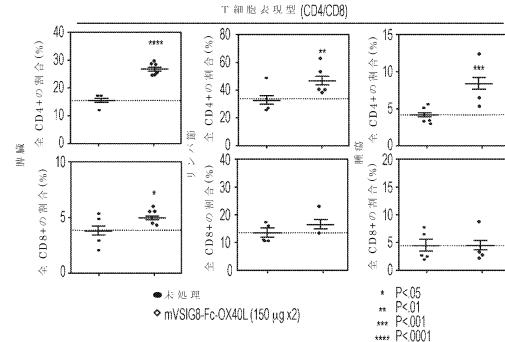
10

20

【図 12】



【図 13 A】

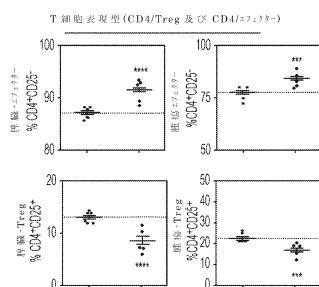


30

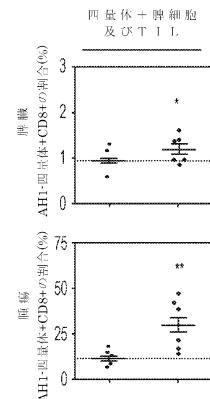
40

50

【図 13 B】

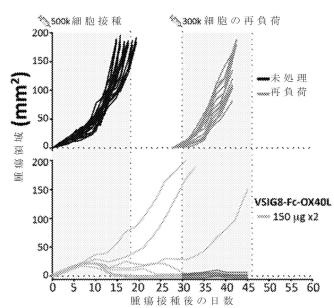


【図 13 C】

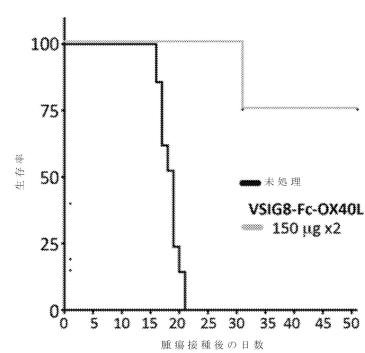


10

【図 14 A】



【図 14 B】

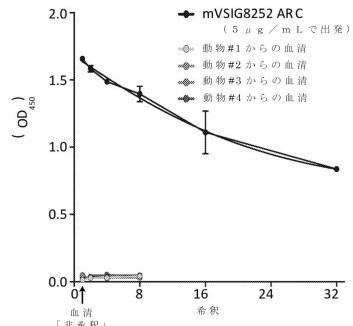


20

【図 14 C】

グループ	合計,N	短期間,N (免疫 2 ヶ月付)	長期間,N (腫瘍増殖/ 生存)	拒絶率 (原発腫瘍)	拒絶率 (再負荷)
未処理	33	12	21	0.0	0.0
VSIG8-Fc-OX40L (150 $\mu\text{g}$ x2)	16	8	8	75.0	100

【図 15】

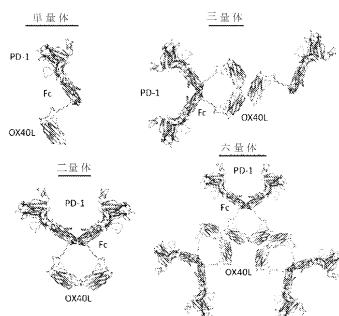


30

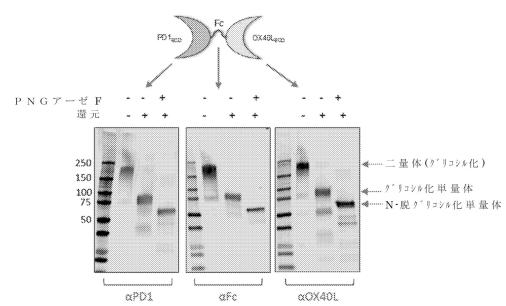
40

50

【図 16】

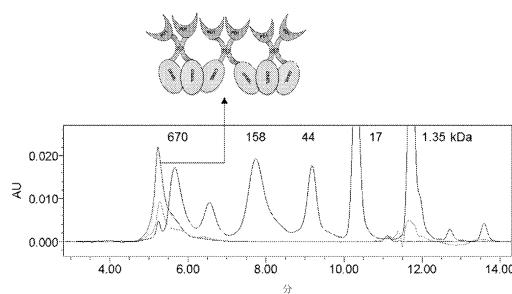


【図 17】

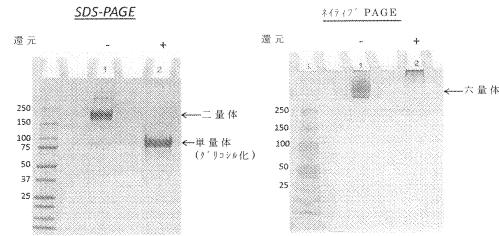


10

【図 18】

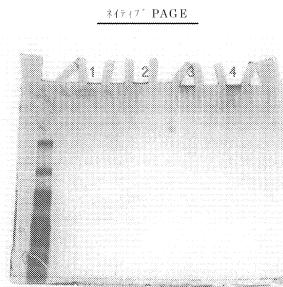


【図 19】

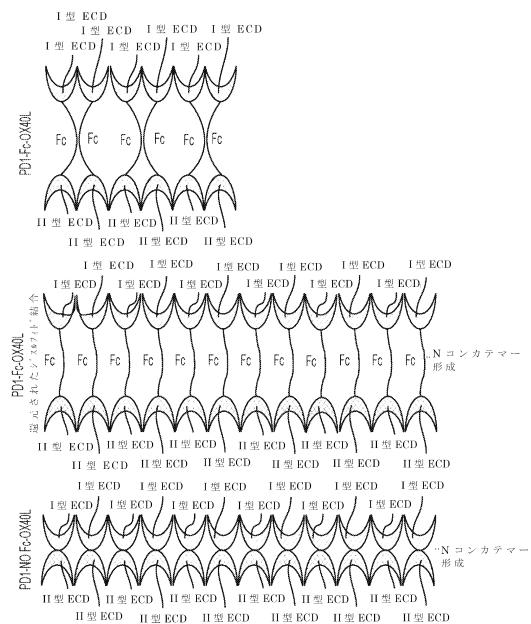


20

【図 20】



【図 21】



30

40

50

【図 2 2 - 1】

組合リソースー1	Fc	組合リソースー2	リンクマークー2
SKIGP22C2 [AI 列番号 : 28]	APELGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE DEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV VIL2SEEMKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC ZENKTPPPUSSEFTISLUTLUDNOMENSC SYTHEARAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 23]	TEGMID [AI 列番号 : 31] SKIGP22C2AEPGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE QCEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV SUTKOMENKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC VAKSNGEETSCUHLERAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 76]	リンクマークー2+Re+割合マークー2
SKIGP22C2 [AI 列番号 : 28]	APELGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE DEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV VIL2SEEMKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC ZENKTPPPUSSEFTISLUTLUDNOMENSC SYTHEARAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 27]	TEGMID [AI 列番号 : 31] SKIGP22C2AEPGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE QCEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV SUTKOMENKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC VAKSNGEETSCUHLERAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 77]	リンクマークー2+Re+割合マークー2

【図 2 2 - 2】

SKIGP22C2 [AI 列番号 : 29]	APELGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE DEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV VIL2SEEMKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC ZENKTPPPUSSEFTISLUTLUDNOMENSC SYTHEARAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 25]	TEGMID [AI 列番号 : 31] SKIGP22C2AEPGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE QCEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV SUTKOMENKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC VAKSNGEETSCUHLERAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 78]
SKIGP22C2 [AI 列番号 : 29]	APELGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE DEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV VIL2SEEMKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC ZENKTPPPUSSEFTISLUTLUDNOMENSC SYTHEARAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 27]	TEGMID [AI 列番号 : 31] SKIGP22C2AEPGEISTELEPERKOMSISPEFCWIDOWSE QCEPENMYDCEHARAKTHERENQESTATIVSILV SUTKOMENKOCISCEGEGESTUINGESPEFATENSC VAKSNGEETSCUHLERAHYQSUSLUR [AI 列番号 : 79]

【配列表】  
0007244428000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/65
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02

(72)発明者 デ シルヴァ , サレシユ

アメリカ合衆国 , テキサス州 78703 , オースティン , 3317 ボーマン アベニュー

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第2017/059168 (WO , A1 )

国際公開第2016/090347 (WO , A1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )