

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-525032

(P2023-525032A)

(43)公表日 令和5年6月14日(2023.6.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705		4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全284頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-567472(P2022-567472)	(71)出願人	517351857		
(86)(22)出願日	令和3年5月7日(2021.5.7)		アルパイン イミューン サイエンス		
(85)翻訳文提出日	令和5年1月6日(2023.1.6)		インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/031432		アメリカ合衆国 9 8 1 0 2		
(87)国際公開番号	WO2021/226553		州 シアトル イースト ブレイン ストリ		
(87)国際公開日	令和3年11月11日(2021.11.11)		ート 1 8 8 スイート 2 0 0		
(31)優先権主張番号	63/022,373	(74)代理人	100102978		
(32)優先日	令和2年5月8日(2020.5.8)		弁理士 清水 初志		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100102118		
(31)優先権主張番号	63/034,361		弁理士 春名 雅夫		
(32)優先日	令和2年6月3日(2020.6.3)	(74)代理人	100160923		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝		
(31)優先権主張番号	63/080,643	(74)代理人	100119507		
			弁理士 刑部 俊		
		(74)代理人	100142929		
	最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 T細胞阻害タンパク質を伴うおよび伴わない、A P R I LおよびB A F F阻害免疫調節タンパク質、ならびにその使用方法

(57)【要約】

単独で、またはT細胞共刺激の阻害とも組合わせて、BAFFおよびAPRIL（またはBAFF/APRILヘテロ三量体）の中和活性を示す免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。本明細書において提供される免疫調節タンパク質は、B細胞成熟抗原（BCMA）単独のバリエーションドメイン、またはB細胞応答を阻害するほか、T細胞共刺激も阻害することができるマルチドメイン免疫調節タンパク質を含む。免疫調節タンパク質をコードする核酸分子も提供される。免疫調節タンパク質は、様々な免疫学的な疾患または状態に対する治療的有用性を提供する。そのようなタンパク質を作製および使用するための組成物および方法も提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(1) (i) T細胞刺激受容体、もしくは(ii) T細胞刺激受容体のリガンドに結合し、かつ/またはT細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのT細胞阻害分子(TIM)と;

(2) B細胞刺激受容体のリガンドに結合し、かつ/またはB細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのB細胞阻害分子(BIM)とを含む、免疫調節タンパク質。

【請求項 2】

TIMが、T細胞刺激受容体のリガンドに結合する、請求項1記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項 3】

T細胞刺激受容体が、CD28であり、かつ/またはT細胞刺激受容体のリガンドが、CD80もしくはCD86である、請求項2記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 4】

TIMが、CD80またはCD86に結合するCTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分である、請求項1～3のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 5】

CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分が、(i) SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に記載のアミノ酸配列; (ii) SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に対して少なくとも85%の配列同一性を有するバリエーションCTLA-4のアミノ酸配列; または(iii) IgVドメインを含む(i)もしくは(ii)の一部である、請求項4記載の免疫調節タンパク質。

20

【請求項 6】

CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:1に記載されている、請求項4または請求項5記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 7】

CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:1に対して少なくとも85%の配列同一性を有するバリエーションCTLA-4のアミノ酸配列、またはIgVドメインを含むその一部であり、バリエーションCTLA-4配列が、SEQ ID NO:1、またはIgVドメインを含むその一部に、1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項4または請求項5記載の免疫調節タンパク質。

30

【請求項 8】

バリエーションCTLA-4配列が、アミノ酸置換C122Sを含む、請求項7記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9】

CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:668に記載されている、請求項1～5、7および8のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 10】

バリエーションCTLA-4が、CD80およびCD86のエクトドメインに結合し、任意で、CD80およびCD86の一方または両方に対する結合親和性が、SEQ ID NO:1に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部と比較して増加している、請求項7～9のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項 11】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、L12F、R16H、G29W、T53S、M56T、N58S、L63P、L98QもしくはY105L、またはそれらの組合せから選択されるアミノ酸置換を含む、請求項7～8および10のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 12】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、G29W、L98QおよびY105Lを含む、請求項7～8

50

、10および11のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項13】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L、L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L、T53S/L63P/L98Q、またはG29W/L98Q/Y105Lである、請求項7～8および10～12のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項14】

CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:165もしくはSEQ ID NO:186のいずれか1つに記載されているか、またはIgVドメインを含むその一部である、請求項1～8および10～13のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項15】

B細胞刺激受容体のリガンドが、APRILもしくはBAFFであり、かつ/またはB細胞刺激受容体が、TACI、BCMAもしくはBAFF受容体である、請求項1～14のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項16】

BIMが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するTACI細胞外ドメインまたはその結合部分である、請求項1～15のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項17】

TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、(i) SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:709に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) APRIL、BAFF、もしくはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するCRD1ドメインおよびCRD2ドメインの一方もしくは両方を含む(i)もしくは(ii)の一部、として記載される、細胞外ドメイン配列である、請求項16記載の免疫調節タンパク質。

20

【請求項18】

TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、CRD1ドメインおよびCRD2ドメインを含む、請求項16または請求項17記載の免疫調節タンパク質。

【請求項19】

TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:516に記載の切断型の野生型TACI細胞外ドメインである、請求項16～18のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

30

【請求項20】

TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、システインリッチドメイン2(CRD2)を含むがシステインリッチドメイン1(CRD1)の全体を欠く切断型の野生型TACI細胞外ドメインである、請求項16または請求項17記載の免疫調節タンパク質。

【請求項21】

TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:709に記載の位置を基準として、アミノ酸残基71～104を含む、アミノ酸残基67～118内に含まれる連続配列からなる切断型の野生型TACI細胞外ドメインである、請求項16、請求項17または請求項20記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項22】

切断型の野生型TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、59、50または51アミノ酸長である、請求項20または請求項21記載の免疫調節タンパク質。

【請求項23】

TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:528に記載されている、請求項16、17および20～22のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項24】

50

TACI細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:709に記載の位置のナンバリングに対応する、40、59、60、61、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103の中から選択される位置で、参照TACIポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションTACIポリペプチドである、請求項16または請求項17記載の免疫調節タンパク質。

【請求項25】

参照TACIポリペプチドが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するTACIの細胞外ドメインまたはその特異的結合部分からなる切断型ポリペプチドである、請求項24記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項26】

参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列、またはAPRIL、BAFF、もしくはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するCRD1ドメインおよびCRD2ドメインの一方もしくは両方を含むその一部を含む、請求項24または請求項25記載の免疫調節タンパク質。

【請求項27】

参照TACIポリペプチドが、CRD1ドメインおよびCRD2ドメインを含む、請求項24～26のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項28】

参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:516に記載されている、請求項24～27のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

20

【請求項29】

参照TACIポリペプチドが、システインリッチドメイン2（CRD2）を含むがシステインリッチドメイン1（CRD1）の全体を欠く切断型の野生型TACI細胞外ドメインであり、バリエーションTACIポリペプチドが、該切断型の野生型TACI細胞外ドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項24～26のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項30】

切断型の野生型TACI細胞外ドメインが、SEQ ID NO:122に記載の位置を基準として、アミノ酸残基71～104を含む、アミノ酸残基67～118内に含まれる連続配列からなる、請求項29記載の免疫調節タンパク質。

30

【請求項31】

切断型の野生型TACI細胞外ドメインが、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、50または51アミノ酸長である、請求項29または請求項30記載の免疫調節タンパク質。

【請求項32】

参照TACIポリペプチドが、CRD2ドメインから本質的になる、請求項24～26および29～31のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項33】

参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に記載の配列を含む、請求項24～26および29～31のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項34】

参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に記載されている、請求項24～26および29～33のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項35】

バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:709に記載のナンバリングに対応する、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103の中から選択される位置に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項24～34のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項36】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、

50

E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S,
R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D,
Y102D, F103S, F103V, F103Y

またはその保存的アミノ酸置換から選択される、請求項35記載の免疫調節タンパク質。

【請求項37】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、E74V、K77E、Y79F、L82H、L82P、R84G、
R84L、R84Q、D85VまたはC86Yのうちの少なくとも1つを含む、請求項35または請
求項36記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項38】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、Q75E、K77E、F78Y、R84G、R84Q、A101D
およびY102D、またはそれらの任意の組合せからなる群より選択されるアミノ酸置換を
含む、請求項35～37のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項39】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、
D85E/K98T, I87L/K98T, L82P/I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y,
Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q,
Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101D または
I87M/A101D

20

である、請求項35～38のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項40】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、またはR8
4Gである、請求項35～39のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項41】

バリエーションTACIポリペプチドが、参照TACIポリペプチドと比較して、APRILおよび
BAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する、請求項35～40のいずれ
か一項記載の免疫調節タンパク質。

30

【請求項42】

BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性が、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍
、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を超えて
独立して増加している、請求項41記載の免疫調節タンパク質。

【請求項43】

バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:517～527、536、537、682～70
1のいずれか1つに記載の配列を含む、または

バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～68
1もしくは760～772のいずれか1つに記載の配列を含む、
請求項35～42のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項44】

バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:535、SEQ ID NO:541、SEQ ID N
O:542またはSEQ ID NO:688のいずれか1つに記載されている、請求項35～43のい
ずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項45】

BIMが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMA細胞外
ドメインまたはその結合部分である、請求項1～15のいずれか一項記載の免疫調節タン
パク質。

【請求項46】

BCMA細胞外ドメインまたはその結合部分が、(i) SEQ ID NO:356に記載のアミノ

50

酸配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDドメインを含む(i)もしくは(ii)の一部、として記載される、細胞外ドメイン配列である、請求項45記載の免疫調節タンパク質。

【請求項47】

BCMAポリペプチドまたはその結合部分が、SEQ ID NO:356に記載されている、請求項45または請求項46記載の免疫調節タンパク質。

【請求項48】

BCMA細胞外ドメインまたはその結合部分が、SEQ ID NO:710に記載のナンバリングに対応する、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置で、参照BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、バリエーションBCMAポリペプチドである、請求項45または請求項46記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項49】

バリエーションBCMAポリペプチドを含む免疫調節タンパク質であって、該バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:710に記載の位置のナンバリングに対応する、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置で、参照BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、免疫調節タンパク質。

【請求項50】

バリエーションBCMAポリペプチドと、Fc領域と、該BCMAポリペプチドと該Fc領域との間のリンカーとを含むバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質を含む、免疫調節タンパク質であって、

20

該バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:710に記載の位置を基準として、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置に対応する、参照BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、免疫調節タンパク質。

【請求項51】

参照BCMAポリペプチドが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMAの細胞外ドメインまたはその結合部分である、請求項48～50のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

30

【請求項52】

参照BCMAが、N末端メチオニンを欠く、請求項48～51のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項53】

参照BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列、またはCRDドメインを含むその一部を含む、請求項48～52のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項54】

参照BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に記載されている、請求項48～53のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項55】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、

S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A,
 H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S,
 H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L,
 Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L,
 N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G,
 T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y,
 S48G

10

またはその保存的アミノ酸置換から選択される、請求項48～54のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項56】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、H19F、H19K、H19L、H19M、H19RまたはH19Yから選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、請求項48～55のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項57】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、
 H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E; H19Y/T36A;
 H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D; S9D/H19Y;
 H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H;
 H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D;
 S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A;
 H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D;
 S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D;
 H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I;
 H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V;
 H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S;
 H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G;
 H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A;
 H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S;
 H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N;
 H19L/Q25H/N31D/L35S;またはH19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S

20

30

である、請求項48～56のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項58】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、
 H19F, H19L, H19K, H19M, H19R, H10Y, N11D/H19Y/N47D,
 H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q, S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y;もしくは
 Q10E/H19Y/A20T/T36S

であるか、または

50

H19F, H19L, H19K, H19M, H19R, H10Y, N11D/H19Y/N47D,
H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q, S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y;もしくは
Q10E/H19Y/A20T/T36S

を含む、請求項48～57のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項59】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、S16A/H19Y/R39Qであるか、またはS16A/H19Y/R39Qを含む、請求項48～58のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項60】

バリエーションBCMAポリペプチドが、参照TACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する、請求項48～59のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項61】

BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性が、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を超えて独立して増加している、請求項60記載の免疫調節タンパク質。

【請求項62】

バリエーションBCMAポリペプチドが、参照BCMAポリペプチドと比較して最大10個のアミノ酸置換を有する、請求項48～61のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項63】

バリエーションBCMAポリペプチドが、参照BCMAポリペプチドと比較して最大5個のアミノ酸置換を有する、請求項48～61のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項64】

バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項48～63のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項65】

バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項48～64のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項66】

バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列を含む、請求項48～65のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項67】

バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:357、377、380、381、390、391、396、402、405、406、407または411のいずれか1つに記載されている、請求項48～66のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項68】

バリエーションBCMAポリペプチドに連結された異種部分を含む、請求項49および51～67のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項69】

異種部分が、半減期延長部分、多量体化ドメイン、細胞の表面上の分子に結合する標的指向部分、または検出可能な標識である、請求項68記載の免疫調節タンパク質。

【請求項70】

半減期延長部分が、多量体化ドメイン、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、Pro/Ala/Ser (PAS)、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータサブユニットのC末端ペプチド (CTP)、ポリエチレングリコール (PEG)、アミノ酸の長い非構造化親水性配列 (XTEN)、ヒドロキシエチルデンブ (HES)、アルブミン結合小分子、またはそれらの組合せを含む、請求項69記載の免疫調節タンパク質。

【請求項71】

BCMA-Fc融合タンパク質であり、

10

20

30

40

50

バリエーションBCMAポリペプチドが、任意でリンカーを介して、免疫グロブリンのFc領域に連結されている、

請求項49および51～67のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項72】

リンカーがペプチドリナーを含み、ペプチドリナーが、

GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS (G4S; SEQ

ID NO: 593), GSGGGGS (SEQ ID NO: 590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO: 594),

GGGGSGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO: 595), GGGGSGGGSGGGSGGGGS

(4xGGGGS, SEQ ID NO: 600), GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (5xGGGGS, SEQ ID NO:

671), GGGGSSA (SEQ ID NO: 596)

10

、またはそれらの組合せから選択される、請求項50～71のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項73】

免疫調節タンパク質が、リンカーによって隔てられた少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含む単一ポリペプチド鎖である、請求項1～48および51～67のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項74】

少なくとも1つのTIMが、ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してアミノ末端側にある、請求項73記載の免疫調節タンパク質。

20

【請求項75】

少なくとも1つのTIMが、ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してカルボキシ末端側にある、請求項73記載の免疫調節タンパク質。

【請求項76】

リンカーがペプチドリナーを含み、ペプチドリナーが、

GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS (G4S; SEQ

ID NO: 593), GSGGGGS (SEQ ID NO: 590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO: 594),

GGGGSGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO: 595), GGGGSGGGSGGGSGGGGS

(4xGGGGS, SEQ ID NO: 600), GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (5xGGGGS, SEQ ID NO:

671), GGGGSSA (SEQ ID NO: 596), SEQ ID NO: 711 (1xEAAAK), SEQ ID NO: 712 (2xEAAAK),

SEQ ID NO: 713 (3xEAAAK), SEQ ID NO: 714 (4xEAAAK), SEQ ID NO: 715 (5xEAAAK), SEQ ID

NO: 665 (6xEAAAK)

30

、またはそれらの組合せから選択される、請求項73～75のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項77】

SEQ ID NO: 618～623もしくは703～708のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列、を含む、請求項1～48、51～67および73～76のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項78】

少なくとも1つのTIMまたは少なくとも1つのBIMが、二量体化を促進する多量体化部分に連結され、免疫調節タンパク質が二量体である、請求項1～48および51～67のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項79】

多量体化ドメインが免疫グロブリンFc領域である、請求項78記載の免疫調節タンパク

50

質。

【請求項 80】

免疫グロブリンFc領域がホモ二量体Fc領域であり、免疫調節タンパク質が、同じポリペプチドの2つの同一のコピーを含むホモ二量体である、請求項50～72および79のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 81】

免疫グロブリンFc領域がIgG2 Fcドメインであり、任意で、IgG2 Fcドメインが、SEQ ID NO:726もしくは822に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:726もしくは822に対して少なくとも95%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、請求項50～72、79および80のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項 82】

免疫グロブリンFc領域が、アミノ酸置換S228Pを含むIgG4 Fcドメインであり、任意で、該Fcドメインが、SEQ ID NO:728もしくは823に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:728もしくは823に対して少なくとも95%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む、請求項50～72、79および80のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 83】

免疫グロブリンFcが、IgG1 Fcドメインであるか；または、任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下および/もしくはエフェクター機能の低下を示すそのバリエーションである、請求項50～72、79および80のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

20

【請求項 84】

免疫グロブリンFcが、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列を含む、請求項50～72、79、80および83のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 85】

免疫グロブリンFcが、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションIgG1 Fcドメインである、請求項50～72、79、80および83のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 86】

免疫グロブリンFc領域が、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、G237Aを含む、請求項85記載の免疫調節タンパク質。

30

【請求項 87】

前記Fcが、SEQ ID NO:589またはSEQ ID NO:824に記載のアミノ酸配列を含むバリエーションFcである、請求項50～72、79、80、83、85および86のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 88】

BCMA-Fc融合タンパク質が、構造：

BCMAポリペプチド (BCMA) - リンカー - Fc領域

を含む、請求項50～72、80および83～87のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 89】

BCMA-Fc融合タンパク質が、SEQ ID NO:629に記載されている、請求項50～72、80および83～88のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項 90】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:629に記載のBCMA-Fc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節BCMA-Fc融合タンパク質。

【請求項 91】

BCMA-Fc融合タンパク質が、構造：

(BCMA) - リンカー - Fc領域 - リンカー - (BCMA)

を含む、請求項50～72、80および83～87のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

50

【請求項 9 2】

BCMA-Fc融合タンパク質が、SEQ ID NO:809またはSEQ ID NO:812に記載されている、請求項50～72、80、83～87および91のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9 3】

BCMA-Fc融合タンパク質が、構造：

(BCMA)-リンカー-(BCMA)-リンカー-Fc領域

を含む、請求項50～72、80および83～87のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9 4】

BCMA-Fc融合タンパク質が、SEQ ID NO:813に記載されている、請求項50～72、80、83～87および93のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9 5】

Fc融合タンパク質が、APRILおよびBAFFを中和する、請求項50～72、80および83～94のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9 6】

APRILを中和するためのIC50が、100pM未満、50pM未満、40pM未満、30pM未満、20pM未満、10pM未満、5pM未満もしくは1pM未満であるか、もしくは前述のいずれかの間の任意の値であり、および/または

BAFFを中和するためのIC50が、400pM未満、300pM未満、200pM未満、100pM未満、75pM未満、50pM未満、25pM未満もしくは10pM未満であるか、もしくは前述のいずれかの間の任意の値である、
請求項95記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9 7】

Fc融合タンパク質が、BCMAもしくはTACIに対するAPRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断し、および/または

Fc融合タンパク質が、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、もしくは循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる、
請求項50～72、80および83～96のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9 8】

ホモ二量体の各ポリペプチドが、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含み、少なくとも1つのTIMが、各ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してアミノ末端側にある、請求項80～87のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 9 9】

ホモ二量体の各ポリペプチドが、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含み、少なくとも1つのTIMが、各ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してカルボキシ末端側にある、請求項80～87のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 1 0 0】

SEQ ID NO:610～617、624～627、637、638、643、644、648、653 654、および759～792のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列、を含む、請求項1～44、78～87、98および99のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 1 0 1】

TIMが、野生型CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMが、SEQ ID NO:709に記載の位置に対応する、アミノ酸置換K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、またはR84Gを含むTACI細胞外ドメインまたはその結合部分であり、任意で、TIMが、SEQ ID NO:1に記載されており、BIMが、SEQ ID NO:535、541、542または688に記載されている、請求項1～44、78～87および98～100のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 102】

SEQ ID NO:611、SEQ ID NO:788、SEQ ID NO:789、SEQ ID NO:790またはSEQ ID NO:792に記載の配列を含む、請求項1～44、78～87および98～101のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 103】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:611に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

【請求項 104】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:788に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

10

【請求項 105】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:789に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

【請求項 106】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:790に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

【請求項 107】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:792に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

【請求項 108】

TIMが、野生型CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMが、CRD2ドメインを含む切断型TACI細胞外ドメインであり、任意で、TIMが、SEQ ID NO:1に記載されており、BIMが、SEQ ID NO:528に記載されている、請求項1～44、78～87および98～100のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

20

【請求項 109】

SEQ ID NO:759、SEQ ID NO:786、SEQ ID NO:787またはSEQ ID NO:791に記載の配列を含む、請求項1～44、78～87、98～100および108のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 110】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:759に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

30

【請求項 111】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:786に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

【請求項 112】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:787に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

【請求項 113】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:791に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

40

【請求項 114】

TIMが、SEQ ID NO:1に記載の位置に対応する、アミノ酸置換G29W/L98Q/Y105Lを含むCTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMが、SEQ ID NO:709に記載の位置に対応する、アミノ酸置換K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、またはR84Gを含むTACI細胞外ドメインまたはその結合部分であり、任意で、TIMが、SEQ ID NO:186に記載されており、BIMが、SEQ ID NO:535、541、542または688に記載されている、請求項1～44、78～87および98～100のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 115】

SEQ ID NO:610に記載の配列を含む、請求項1～44、78～87、98～100および11

50

4のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項116】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:610に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、免疫調節タンパク質。

【請求項117】

SEQ ID NO:601~609、631~636、645~647、649~652、655~659のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列、を含む、請求項1~15、45~48、51~67、78~87、98および99のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項118】

TIMが、野生型CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMが、SEQ ID NO:710に記載の位置に対応する、アミノ酸置換H19Lを含むBCMA細胞外ドメインまたはその結合部分であり、任意でTIMが、SEQ ID NO:1に記載されており、BIMが、SEQ ID NO:406に記載されており、さらに任意で、免疫調節タンパク質が、SEQ ID NO:602に記載の配列を含む、請求項1~15、45~48、51~67、78~87、98、99および117のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項119】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:602に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

20

【請求項120】

TIMが、SEQ ID NO:1に記載の位置に対応する、アミノ酸置換G29W/L98Q/Y105Lを含むCTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMが、SEQ ID NO:710に記載の位置を基準として、アミノ酸置換H19Lを含むBCMA細胞外ドメインまたはその結合部分であり、任意で、TIMが、SEQ ID NO:186に記載されており、BIMが、SEQ ID NO:406に記載されており、さらに任意で、免疫調節タンパク質が、SEQ ID NO:601に記載の配列を含む、請求項1~15、45~48、51~67、78~87、98、99および117のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項121】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:601に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質。

30

【請求項122】

免疫グロブリンFc領域がヘテロ二量体Fc領域であり、免疫調節タンパク質が、第1および第2のポリペプチドを含むヘテロ二量体であり、第1のポリペプチドが、少なくとも1つのBIMまたは少なくとも1つのTIMの一方を含み、第2のポリペプチドが、少なくとも1つのBIMおよび少なくとも1つのTIMの他方を含む、請求項79記載の免疫調節タンパク質。

【請求項123】

ヘテロ二量体Fcが、ポリペプチド間のヘテロ二量体形成をもたらすために、野生型Fcドメインに1つまたは複数のアミノ酸改変を含み、任意で、野生型Fc領域がIgG1 Fc領域である、請求項122記載の免疫調節タンパク質。

40

【請求項124】

前記もう1つのアミノ酸改変が、電荷反発に起因する自己会合を低減または防止するために、ノブ・イントゥ・ホール改変および電荷変異から選択される、請求項123記載の免疫調節タンパク質。

【請求項125】

ヘテロ二量体Fc領域が、任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性低下のためのおよび/またはエフェクター機能低下のための、1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、請求項122~124のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

50

【請求項 1 2 6】

1つまたは複数のアミノ酸置換が、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される、請求項125記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 1 2 7】

免疫グロブリンFc領域が、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、G237Aを含む、請求項125または請求項126記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 1 2 8】

ヘテロ二量体が、SEQ ID NO:662または663に記載のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、SEQ ID NO:660に記載のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む、請求項122～127のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

10

【請求項 1 2 9】

免疫調節タンパク質が、BCMAもしくはTACIに対するAPRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断し、および/または

免疫調節タンパク質が、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、もしくは循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる、

請求項1～128のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 1 3 0】

B細胞の成熟、分化、および/または増殖を、低減または阻害する、請求項1～129のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

20

【請求項 1 3 1】

免疫調節タンパク質が、共刺激受容体へのCD80もしくはCD86の結合を遮断し、任意で、共刺激受容体がCD28であり、および/または

免疫調節タンパク質が、T細胞共刺激を低減もしくは阻害する、

請求項1～48、51～87および98～130のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質。

【請求項 1 3 2】

請求項1～131のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質をコードする、核酸分子。

【請求項 1 3 3】

請求項132記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 1 3 4】

発現ベクターである、請求項133記載のベクター。

30

【請求項 1 3 5】

哺乳動物発現ベクターまたはウイルスベクターである、請求項133または請求項134記載のベクター。

【請求項 1 3 6】

請求項132記載の核酸、または請求項133～135のいずれか一項記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 1 3 7】

免疫調節タンパク質を産生する方法であって、宿主細胞に、請求項132記載の核酸分子、または請求項133～135のいずれか一項記載のベクターを、該細胞内で該タンパク質を発現する条件下で導入する工程を含む、方法。

40

【請求項 1 3 8】

前記細胞から免疫調節タンパク質を単離または精製する工程をさらに含む、請求項137記載の方法。

【請求項 1 3 9】

請求項137または請求項138記載の方法によって産生される、免疫調節タンパク質。

【請求項 1 4 0】

請求項1～131および139のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 4 1】

50

薬学的に許容される賦形剤を含む、請求項140記載の薬学的組成物。

【請求項142】

バイアルまたは容器内に、請求項140または請求項141のいずれか一項記載の薬学的組成物を含む、製造物品。

【請求項143】

請求項142記載の製造物品と、使用説明書とを備える、キット。

【請求項144】

対象の免疫応答を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、請求項1～131のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質、または請求項140もしくは請求項141記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項145】

B細胞免疫応答が対象において低下し、それにより、B細胞の成熟、分化、および/または増殖が、低減または阻害される、請求項144記載の方法。

【請求項146】

APRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の循環レベルが、対象において低下する、請求項144または請求項145記載の方法。

【請求項147】

T細胞免疫応答が対象において低下し、それにより、T細胞共刺激が低減または阻害される、請求項144～146のいずれか一項記載の方法。

【請求項148】

免疫応答を低下させることにより、対象における疾患、障害または状態が処置される、請求項144～147のいずれか一項記載の方法。

【請求項149】

対象におけるAPRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の循環レベルを低下させる方法であって、請求項1～131のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質、または請求項140もしくは請求項141記載の薬学的組成物を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項150】

対象における疾患、障害または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、請求項1～131のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質、または請求項140もしくは請求項141記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項151】

疾患、障害または状態が、自己免疫疾患、および炎症状態、B細胞がん、抗体によって媒介される病態、腎疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病、またはウイルス感染である、請求項148または請求項150記載の方法。

【請求項152】

疾患、障害または状態が、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、強皮症、多発性硬化症、糖尿病、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、IgA腎症、IgA血管炎、視神経炎、アミロイドーシス、抗リン脂質抗体症候群（APS）、多腺性自己免疫症候群II型（APS II）、自己免疫性甲状腺疾患（AITD）、グレーブス病、自己免疫性副腎炎および尋常性天疱瘡からなる群より選択される、請求項148、請求項150または請求項151記載の方法。

【請求項153】

疾患、障害または状態がB細胞がんであり、該がんが骨髓腫である、請求項148および150～152のいずれか一項記載の方法。

【請求項154】

対象の免疫応答を低下させるのに使用するための、請求項140または請求項141記載の薬学的組成物。

【請求項155】

対象の免疫応答を低下させるための医薬の製造における、請求項1～131のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質の使用、または請求項140もしくは請求項141記載の薬学

10

20

30

40

50

的組成物の使用。

【請求項156】

免疫応答がB細胞免疫応答であり、免疫応答を低下させることが、B細胞の成熟、分化、および/または増殖を、低減または阻害する、請求項154記載の使用のための薬学的組成物、または請求項155記載の使用。

【請求項157】

免疫応答を低下させることが、対象におけるAPRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の循環レベルを低下させる、請求項154～156のいずれか一項記載の、使用のための薬学的組成物、または使用。

【請求項158】

T細胞免疫応答が対象において低下し、それにより、T細胞共刺激が低減または阻害される、請求項154～157のいずれか一項記載の、使用のための薬学的組成物、または使用。

【請求項159】

免疫応答を低下させることにより、対象における疾患、障害または状態が処置される、請求項154～158のいずれか一項記載の、使用のための薬学的組成物、または使用。

【請求項160】

対象における疾患、障害または状態を処置するのに使用するための、請求項140または請求項141記載の薬学的組成物。

【請求項161】

対象における疾患、障害または状態を処置するための医薬の製造における、請求項1～131のいずれか一項記載の免疫調節タンパク質の使用、または請求項140もしくは請求項141記載の薬学的組成物の使用。

【請求項162】

疾患、障害または状態が、自己免疫疾患、炎症状態、B細胞がん、抗体によって媒介される病態、腎疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病またはウイルス感染である、請求項160記載の使用のための薬学的組成物、または請求項161記載の使用。

【請求項163】

疾患、障害または状態が、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、強皮症、多発性硬化症、糖尿病、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、IgA腎症、IgA血管炎、視神経炎、アミロイドーシス、抗リン脂質抗体症候群（APS）、多腺性自己免疫症候群II型（APS II）、自己免疫性甲状腺疾患（AITD）、グレーブス病、自己免疫性副腎炎および尋常性天疱瘡からなる群より選択される、請求項159～162のいずれか一項記載の、使用のための薬学的組成物、または使用。

【請求項164】

疾患、障害または状態がB細胞がんであり、該がんが骨髄腫である、請求項159～162のいずれか一項記載の、使用のための薬学的組成物、または使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その各々の内容全体が、あらゆる目的のために参照により組み入れられる、2020年5月8日に出願された「APRIL AND BAFF INHIBITORY IMMUNOMODULATORY PROTEINS WITH AND WITHOUT A T CELL INHIBITORY PROTEIN AND METHODS OF USE THEREOF」と題する米国仮出願第63/022,373号、2020年6月3日に出願された「APRIL AND BAFF INHIBITORY IMMUNOMODULATORY PROTEINS WITH AND WITHOUT A T CELL INHIBITORY PROTEIN AND METHODS OF USE THEREOF」と題する米国仮出願第63/034,361号、および2020年9月18日に出願された「APRIL AND BAFF INHIBITORY IMMUNOMODULATORY PROTEINS WITH AND WITHOUT A T CELL INHIBITORY PROTEIN AND METHOD

10

20

30

40

50

S OF USE THEREOF」 と題する米国仮出願第 63/080,643 号の優先権を主張する。

【0002】

配列表の参照による組み込み

本出願は、電子形式の配列表とともに出願されている。配列表は、2021年5月4日に作成された761612002340SeqList.TXTと題するファイルとして提供され、そのサイズは992,602バイトである。配列表の電子形式の情報は、その全体が参照により組み入れられる。

【0003】

分野

本開示は、単独で、またはT細胞共刺激の阻害とも組合わせて、BAFFおよびAPRIL（またはBAFF/APRILヘテロ三量体）の中和活性を示す、免疫調節タンパク質を提供する。免疫調節タンパク質は、B細胞成熟抗原（BCMA）のバリエーションドメインを単独で、および、B細胞応答を阻害するほかT細胞共刺激も阻害することができるマルチドメインを含む。本開示はまた、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子を提供する。免疫調節タンパク質は、様々な免疫学的な疾患または状態に対する治療的有用性を提供する。そのようなタンパク質を作製および使用するための組成物および方法が提供される。

【背景技術】

【0004】

背景

可溶性リガンドとその受容体との間の相互作用を伴うプロセスに介入することによる免疫応答の調節について、医学的関心が高まっている。現時点で、免疫応答を増強または抑制するために使用される生物製剤は、一般に、抗体（例えば抗PD-1抗体）、または、単一の細胞表面分子に対する可溶性受容体（例えばFc-CTLA-4）に限定されている。免疫応答、特にB細胞免疫応答、および場合によってはT細胞免疫応答も調節することができる改善された治療剤が必要とされている。そのような必要性を満たす態様が提供される。

【発明の概要】

【0005】

概要

T細胞刺激受容体またはT細胞刺激受容体のリガンドに結合し、T細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのT細胞阻害分子（TIM）と；B細胞刺激受容体のリガンドに結合し、かつ/またはB細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのB細胞阻害分子（BIM）と、を含む、免疫調節タンパク質が、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、T細胞刺激受容体もしくはT細胞刺激受容体のリガンドに結合するか、またはT細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのT細胞阻害分子（TIM）と；B細胞刺激受容体のリガンドに結合し、かつ/またはB細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのB細胞阻害分子（BIM）と、を含む。

【0006】

任意の態様のいくつかでは、TIMは、T細胞刺激受容体のリガンドに結合する。任意の態様のいくつかでは、T細胞刺激受容体はCD28であり、T細胞刺激受容体のリガンドはCD80またはCD86である。任意の態様のいくつかでは、T細胞刺激受容体はCD28であるか、またはT細胞刺激受容体のリガンドはCD80もしくはCD86である。

【0007】

任意の態様のいくつかでは、TIMは、CD80またはCD86に結合するCTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分である。任意の態様のいくつかでは、CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分は、SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に記載のアミノ酸配列、SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に対して少なくとも85%の配列同一性を有するバリエーションCTLA-4のアミノ酸配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる。任意の態様のいくつかでは、CTLA-4細胞外ドメインは、SEQ ID NO:1に記載のアミノ酸配列からなる。任意の態様のいくつかでは、CTLA-4細胞外ドメインは、SEQ ID NO:1に対

して少なくとも85%の配列同一性を有するバリエーションCTLA-4のアミノ酸配列、またはIgVドメインを含むその一部からなり、バリエーション配列は、SEQ ID NO:1、またはIgVドメインを含むその一部に、1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

【0008】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4配列は、アミノ酸置換C122Sを含む。いくつかの態様では、CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分は、SEQ ID NO:668に記載されている。

【0009】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4は、CD80およびCD86のエクトドメインに結合し、任意で、CD80およびCD86の一方または両方に対する結合親和性は、SEQ ID NO:1に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部と比較して、増加している。

【0010】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4ポリペプチド内の1つまたは複数のアミノ酸置換は、L12F、R16H、G29W、T53S、M56T、N58S、L63P、L98QもしくはY105L、またはそれらの組合せから選択されるアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、G29W、L98QおよびY105Lを含む。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105Lである。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105Lである。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、G29W/L98Q/Y105Lである。

【0011】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4ポリペプチドは、バリエーションCTLA-4ポリペプチドがSEQ ID NO:1に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

【0012】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4ポリペプチドは、バリエーションCTLA-4ポリペプチドがSEQ ID NO:2に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

【0013】

いくつかの態様では、CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分は、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:165もしくはSEQ ID NO:186のいずれか1つに記載されているか、またはIgVドメインを含むその一部である。

【0014】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4は、SEQ ID NO:92に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4は、SEQ ID NO:113に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4は、SEQ ID NO:165に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションCTLA-4は、SEQ ID NO:186に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる。

【0015】

任意の態様のいくつかでは、B細胞刺激受容体のリガンドは、APRILまたはBAFFであり、B細胞刺激受容体は、TACI、BCMAまたはBAFF受容体である。任意の態様のいくつかでは、B細胞刺激受容体のリガンドは、APRILもしくはBAFFであるか、またはB細胞刺激受容体は、TACI、BCMAもしくはBAFF受容体である。

【0016】

任意の態様のいくつかでは、BIMは、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三

10

20

30

40

50

量体に結合するTACI細胞外ドメインまたはその結合部分からなる、TACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、(i) SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:709に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) APRIL、BAFF、もしくはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するCRD1ドメインおよびCRD2ドメインの一方もしくは両方を含む(i)もしくは(ii)の一部、として記載される細胞外ドメイン配列を有する、TACI細胞外ドメインまたはその結合部分である。いくつかの態様では、BIMは、CRD1ドメインおよびCRD2ドメインを含む、TACI細胞外ドメインまたはその結合部分である。

【0017】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:516に記載の配列からなる切断型の野生型TACI細胞外ドメインであるものである。

【0018】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、切断型の野生型TACI細胞外ドメインであるか、またはそのバリエーションであり、切断型の野生型TACI細胞外ドメインは、システインリッチドメイン2 (CRD2) を含むが、システインリッチドメイン1 (CRD1) の全体を欠き、かつ/またはバリエーションTACIポリペプチドは、切断型の野生型TACI細胞外ドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

【0019】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、切断型の野生型TACI細胞外ドメインであるか、またはそのバリエーションであり、切断型の野生型TACI細胞外ドメインは、SEQ ID NO:709に記載の位置を基準として、アミノ酸残基71~104を含む、アミノ酸残基67~118内に含まれる連続配列からなり、バリエーションTACIポリペプチドは、切断型の野生型TACI細胞外ドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

【0020】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、切断型の野生型TACI細胞外ドメインが、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50または51アミノ酸長であるものである。任意の態様のいくつかでは、切断型の野生型TACI細胞外ドメインは、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸残基68~110からなる。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドは、SEQ ID NO:528に記載のアミノ酸配列からなる；または、SEQ ID NO:528に記載の配列に1つもしくは複数のアミノ酸置換を含むそのバリエーションである。

【0021】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に記載の配列からなる切断型の野生型TACI細胞外ドメインであるものである。

【0022】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、切断型のTACIポリペプチドまたはそのバリエーションが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するものである。

【0023】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、TACIポリペプチドがバリエーションTACIポリペプチドであるものであり、バリエーションTACIポリペプチドは、切断型のTACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する。

【0024】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:709に記載のナンバリングに対応する、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103の中から選択される位置で、参照TACIポリペプチドの細胞外ドメイン (ECD) またはその特異的結合断片に1つま

10

20

30

40

50

たは複数のアミノ酸置換を含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、E74V、Q75E、Q75R、G76S、K77E、F78Y、Y79F、L82H、L82P、L83S、R84G、R84L、R84Q、D85E、D85V、C86Y、I87L、I87M、S88N、I92V、Q95R、P97S、K98T、Q99E、A101D、Y102D、F103S、F103V、F103Y、またはその保存的アミノ酸置換から選択される。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、E74V、K77E、Y79F、L82H、L82P、R84G、R84L、R84Q、D85VまたはC86Yのうちの少なくとも1つを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、D85E/K98T、I87L/K98T、L82P/I87L、G76S/P97S、K77E/R84L/F103Y、Y79F/Q99E、L83S/F103S、K77E/R84Q、K77E/A101D、K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、Q75R/R84G/I92V、K77E/A101D/Y102D、R84Q/S88N/A101D、R84Q/F103V、K77E/Q95R/A101DまたはI87M/A101Dである。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、K77E/F78Y/Y102Dである。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、Q75E/R84Qである。いくつかの態様では、TACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:541に記載のバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、TACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:542に記載のバリエーションTACIポリペプチドである。

10

【0025】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:709に記載の位置のナンバリングに対応する、40、59、60、61、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103の中から選択される位置で、参照TACIポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションTACIポリペプチドであるものである。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、W40R、Q59R、R60G、T61P E74V、Q75E、Q75R、G76S、K77E、F78Y、Y79F、L82H、L82P、L83S、R84G、R84L、R84Q、D85E、D85V、C86Y、I87L、I87M、S88N、I92V、Q95R、P97S、K98T、Q99E、A101D、Y102D、F103S、F103V、F103Y、またはその保存的アミノ酸置換から選択される。

20

【0026】

任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、E74V、K77E、Y79F、L82H、L82P、R84G、R84L、R84Q、D85VまたはC86Yのうちの少なくとも1つを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換K77Eを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換R84Gを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換R84Qを含む。

30

【0027】

任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するTACIの細胞外ドメインまたはその特異的結合部分からなる、切断型ポリペプチドである。

【0028】

任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、(i) SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:709に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) APRIL、BAFF、もしくはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するCRD1ドメインおよびCRD2ドメインの一方もしくは両方を含む(i)もしくは(ii)の一部を含む。任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、N末端メチオニンを欠く。任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、CRD1ドメインおよびCRD2ドメインを含む。任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、SEQ ID NO:516に記載の配列を含む。任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、SEQ ID NO:516に記載の配列からなる。任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、CRD2ドメインから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、

40

50

、参照TACIポリペプチドは、SEQ ID NO:528に記載の配列を含む。任意の態様のいくつかでは、参照TACIポリペプチドは、SEQ ID NO:528に記載の配列からなる。

【0029】

任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、D85E/K98T、I87L/K98T、R60G/Q75E/L82P、R60G/C86Y、W40R/L82P/F103Y、W40R/Q59R/T61P/K98T、L82P/I87L、G76S/P97S、K77E/R84L/F103Y、Y79F/Q99E、L83S/F103S、K77E/R84Q、K77E/A101D、K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、Q75R/R84G/I92V、K77E/A101D/Y102D、R84Q/S88N/A101D、R84Q/F103V、K77E/Q95R/A101DまたはI87M/A101Dである。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、K77E/F78Y/Y102Dである。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、Q75E/R84Qである。

10

【0030】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:709に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

【0031】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:719に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

20

【0032】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:718に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

【0033】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:516に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

30

【0034】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

【0035】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、参照TACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有するものである。任意の態様のいくつかでは、バリエーションTACIポリペプチドは、APRILに対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションTACIポリペプチドは、BAFFに対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションTACIポリペプチドは、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を超えて独立して増加している。

40

【0036】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに記載

50

の配列を含むものである。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:529～535、538～550、または673～681のいずれか1つに記載の配列を含むものである。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:517～527、536、537、682～701のいずれか1つに記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるものである。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681のいずれか1つに記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるものである。

【0037】

任意の態様のいくつかでは、BIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:535、SEQ ID NO:541、SEQ ID NO:542またはSEQ ID NO:688のいずれか1つに記載されているTACIポリペプチドである。

【0038】

任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:535に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるものである。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:541に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるものである。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:542に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるものである。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:688に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるものである。任意の態様のいくつかでは、TACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:535に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるものである。

【0039】

任意の態様のいくつかでは、BIMは、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMA細胞外ドメインまたはその結合部分からなるBCMAポリペプチドである。任意の態様のいくつかでは、BCMA細胞外ドメインまたはその結合部分は、(i) SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDドメインを含む(i)もしくは(ii)の一部、として記載される、細胞外ドメイン配列である。

【0040】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に記載の配列からなる。任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:710に記載のナンバリングに対応する、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置で、参照BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)、または特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、バリエーションBCMAポリペプチドである。

【0041】

バリエーションBCMAポリペプチドを含む免疫調節タンパク質が本明細書において提供され、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:710に記載の位置のナンバリングに対応する、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置で、参照BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン(ECD)またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMAの細胞外ドメインまたはその特異的結合部分からなるポリペプチドである。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、(i) SEQ ID NO:710に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:710に対して少なくとも95%の37a配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i)もしくは(ii)の一部を含む。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAは、N末

10

20

30

40

50

端メチオニンを欠く。

【0042】

任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、(i) SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i)もしくは(ii)の一部を含む。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に記載の配列を含む。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に記載の配列からなる。

【0043】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C,

H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T,

H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M,

Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M,

N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N,

T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G

またはその保存的アミノ酸置換から選択される。

【0044】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、19位に少なくとも1つの置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの置換は、H19A、H19C、H19D、H19E、H19F、H19G、H19I、H19K、H19L、H19M、H19N、H19P、H19Q、H19R、H19S、H19T、H19V、H19W、H19Yから選択される。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Lを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Kを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Rを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Yを含む。

【0045】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、25位に少なくとも1つの置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの置換は、Q25E、Q25F、Q25G、Q25H、Q25I、Q25K、Q25L、Q25M、Q25S、Q25V、Q25Yから選択される。

【0046】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、31位に少なくとも1つの置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの置換は、N31D、N31G、N31H、N31K、N31L、N31M、N31P、N31S、N31V、N31Yから選択される。

【0047】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、35位に少なくとも1つの置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの置換は、L35A、L35M、L35P、L35S、L35V、L35Yから選択される。

【0048】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、36位に少なくとも1つの置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの置換は、T36A、T36G、T36N、T36M、T36S、T36Vから選択される。

【0049】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、

H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E; H19Y/T36A;
 H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D; S9D/H19Y;
 H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H;
 H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D;
 S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A;
 H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D;
 S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D;
 H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I;
 H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V;
 H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S;
 H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G;
 H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A;
 H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S;
 H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N;
 H19L/Q25H/N31D/L35S; または H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S

10

20

である。

【0050】

任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、H19F、H19L、H19K、H19M、H19R、H10Y、N11D/H19Y/N47D、H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q、S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; または Q10E/H19Y/A20T/T36Sを含む。任意の態様のいくつかでは、BCMAポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸置換は、S16A/H19Y/R39Qを含む。

【0051】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:710に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

30

【0052】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有し、記載されている1つまたは複数のアミノ酸置換を含むものである。

【0053】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照BCMAポリペプチドと比較して最大10個のアミノ酸置換を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照BCMAポリペプチドと比較して最大5個のアミノ酸置換を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に対して少なくとも90%の配列同一性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。

40

【0054】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照BCMAポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、APRILに対して

50

増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、BAFFに対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を超えて独立して増加している。

【0055】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357~435のいずれか1つに記載の配列を含む。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357~435のいずれか1つに記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:377に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:380に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:381に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:390に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:391に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:396に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:402に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:405に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:406に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:407に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:411に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:405に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:406に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。

【0056】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、少なくとも1つのBCMAポリペプチドに連結された異種部分を含む。任意の態様のいくつかでは、異種部分は、半減期延長部分、多量体化ドメイン、細胞の表面上の分子に結合する標的指向部分、または検出可能な標識である。任意の態様のいくつかでは、半減期延長部分は、多量体化ドメイン、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、Pro/Ala/Ser (PAS)、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータサブユニットのC末端ペプチド (CTP)、ポリエチレングリコール (PEG)、アミノ酸の長い非構造化親水性配列 (XTEN)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、アルブミン結合小分子、またはそれらの組合せを含む。

【0057】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、少なくとも1つのBCMAポリペプチドに連結された、免疫グロブリンのFc領域を含む。

【0058】

任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのTIMは、1つのTIMのみを含む。任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのTIMは、2、3、4または5つのTIMを含み、任意で、各TIMは同じである。任意の態様のいくつかでは、各TIMは、直接的に、またはリンカーを介して間接的に連結され、任意で、リンカーはペプチドリinkerである。任意の

態様のいくつかでは、少なくとも1つのBIMは、1つのBIMのみを含む。任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのBIMは、2、3、4または5つのBIMを含み、任意で、各BIMは同じである。任意の態様のいくつかでは、各BIMは、直接的に、またはリンカーを介して間接的に連結され、任意で、リンカーはペプチドリンカーである。

【0059】

任意の態様のいくつかでは、リンカーはペプチドリンカーであり、ペプチドリンカーは、
GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO: 593), GSGGGGS (SEQ ID NO: 590),
GGGSGGGGS (2xGGGS; SEQ ID NO: 594), GGGSGGGSGGGGS (3xGGGS; SEQ ID NO:
595), GGGSGGGSGGGSGGGGS (4xGGGS, SEQ ID NO:600),
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (5xGGGS, SEQ ID NO: 671), GGGSSA (SEQ ID NO: 596)

10

、またはそれらの組合せから選択される。

【0060】

任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMは、直接的に、またはリンカーを介して間接的に連結され、任意で、リンカーは、ペプチドリンカーおよび/または多量体化部分を含む。任意の態様のいくつかでは、リンカーはペプチドリンカーを含み、ペプチドリンカーは、
GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO: 593),
GSGGGGS (SEQ ID NO: 590), GGGSGGGGS (2xGGGS; SEQ ID NO: 594),
GGGSGGGSGGGGS (3xGGGS; SEQ ID NO: 595), GGGSGGGSGGGSGGGGS
(4xGGGS, SEQ ID NO:600), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (5xGGGS, SEQ ID NO:
671), GGGSSA (SEQ ID NO: 596)

20

、またはそれらの組合せから選択される。任意の態様のいくつかでは、リンカーはペプチドリンカーを含み、ペプチドリンカーは、SEQ ID NO:711 (1xEAAK)、SEQ ID NO:712 (2xEAAK)、SEQ ID NO:713 (3xEAAK)、SEQ ID NO:714 (4xEAAK)、SEQ ID NO:715 (5xEAAK)、SEQ ID NO:665 (6xEAAK) から選択される。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、単量体であり、および/または単一ポリペプチド鎖を含む。

30

【0061】

任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのTIMは、ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してアミノ末端側にある。任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのTIMは、ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してカルボキシ末端側にある。

【0062】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、検出可能な標識をさらに含み、任意で、検出可能な標識は、Flagタグ、Hisタグまたはmycタグである。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:618~623のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列を含む。

40

【0063】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:703~708のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列を含む。

【0064】

いくつかの態様では、TIMおよびBIMは、多量体化ドメインによって連結される。任

50

意の態様のいくつかでは、多量体化ドメインは、二量体化、三量体化、四量体化または五量体化を促進する。任意の態様のいくつかでは、多量体化ドメインは免疫グロブリンFc領域である。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は二量体である。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域はホモ二量体Fc領域である。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域はヘテロ二量体Fc領域である。

【0065】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質はホモ二量体であり、二量体の各ポリペプチドは同じである。任意の態様のいくつかでは、各ポリペプチドは、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含み、少なくとも1つのTIMは、各ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してアミノ末端側にある。任意の態様のいくつかでは、各ポリペプチドは、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含み、少なくとも1つのTIMは、各ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してカルボキシ末端側にある。

10

【0066】

任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域はIgG2 Fcドメインである。いくつかの態様では、IgG2 Fcドメインは、SEQ ID NO:729もしくは853に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:729もしくは853に対して少なくとも95%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、IgG2 Fcドメインは、SEQ ID NO:729に記載されている。いくつかの態様では、IgG2 Fcドメインは、SEQ ID NO:853に記載されている。

20

【0067】

任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域はIgG4 Fcドメインである。任意の態様のいくつかでは、IgG4 Fcドメインは、アミノ酸置換S228Pを含むバリエーションIgG4 Fcドメインである。いくつかの態様では、IgG4 Fcドメインは、SEQ ID NO:731もしくは854に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:731もしくは854に対して少なくとも95%の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、IgG4 Fcドメインは、SEQ ID NO:731に記載されている。いくつかの態様では、IgG4 Fcドメインは、SEQ ID NO:854に記載されている。

【0068】

任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFcは、IgG1 Fcドメインであるか、または任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下および/もしくはエフェクター機能の低下を示すバリエーションFcである。いくつかの態様では、免疫グロブリンFcはIgG1 Fcドメインであり、Fcは、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列を含む。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFcは、野生型または改変のいずれかであるIgG4 Fcドメインである。

30

【0069】

任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFcは、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションIgG1 Fcドメインである。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域は、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、G237A、またはEUナンバリングによる、アミノ酸置換R292C、N297GおよびV302Cを含む。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:589に記載のアミノ酸配列を含むバリエーションFcである。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:855に記載のアミノ酸配列を含むバリエーションFcである。

40

【0070】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質はBCMA-Fc融合タンパク質である。任意の態様のいくつかでは、BCMA-Fc融合タンパク質は、構造：

BCMAポリペプチド (BCMA) - リンカー - Fc領域

を含む。いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:629に記載されている。

50

【0071】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:629に記載のBCMA-Fc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節BCMA-Fc融合タンパク質も本明細書において提供される。

【0072】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、構造：

(BCMA) - リンカー - Fc領域 - リンカー - (BCMA)

を有する、BCMA-Fc融合タンパク質である。いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:809に記載されている。いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:812に記載されている。

10

【0073】

任意の態様のいくつかでは、BCMA-Fc融合タンパク質は、構造：

(BCMA) - リンカー - (BCMA) - リンカー - Fc領域

を有する。いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:813に記載されている。

【0074】

任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含む免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:610~617、624~627、637、638、643、644、648、653および654のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列を含む。

20

【0075】

いくつかの態様では、TIMは、野生型CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMは、SEQ ID NO:709に記載の位置に対応する、アミノ酸置換K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、またはR84Gを含むTACI細胞外ドメインまたはその結合部分である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載されており、BIMは、SEQ ID NO:535、541、542または688に記載されている。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:611、SEQ ID NO:788、SEQ ID NO:789、SEQ ID NO:790またはSEQ ID NO:792に記載の配列を含む。

30

【0076】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:611に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

【0077】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:788に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

【0078】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:789に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

40

【0079】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:790に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

【0080】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:792に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

50

【0081】

任意の態様のいくつかでは、TIMは、野生型CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMは、CRD2ドメインを含む切断型TACI細胞外ドメインである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載されており、BIMは、SEQ ID NO:528に記載されている。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:759、SEQ ID NO:853、SEQ ID NO:854またはSEQ ID NO:791に記載の配列を含む。

【0082】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:759に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

10

【0083】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:853に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

【0084】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:854に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

【0085】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:791に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

20

【0086】

任意の態様のいくつかでは、TIMは、SEQ ID NO:1に記載の位置に対応する、アミノ酸置換G29W/L98Q/Y105Lを含むCTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMは、SEQ ID NO:709に記載の位置に対応する、アミノ酸置換K77E/F78Y/Y102D、Q75E/R84Q、またはR84Gを含むTACI細胞外ドメインまたはその結合部分である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:186に記載されており、BIMは、SEQ ID NO:535、541、542または688に記載されている。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:610に記載の配列を含む。

30

【0087】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:610に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、免疫調節タンパク質が、本明細書において提供される。

【0088】

任意の態様のいくつかでは、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含む免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:601～609、631～636、645～647、649～652、655～659のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列を含む。

40

【0089】

任意の態様のいくつかでは、TIMは、野生型CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMは、SEQ ID NO:710に記載の位置に対応する、アミノ酸置換H19Lを含むBCMA細胞外ドメインまたはその結合部分である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載されており、BIMは、SEQ ID NO:406に記載されている。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:602に記載の配列を含む。

【0090】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:602に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

50

【0091】

任意の態様のいくつかでは、TIMは、SEQ ID NO:1に記載の位置に対応する、アミノ酸置換G29W/L98Q/Y105Lを含むCTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分であり、BIMは、SEQ ID NO:710に記載の位置を基準として、アミノ酸置換H19Lを含むBCMA細胞外ドメインまたはその結合部分である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:186に記載されており、BIMは、SEQ ID NO:406に記載されている。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、SEQ ID NO:601に記載の配列を含む。

【0092】

共有ジスルフィド結合によって連結された、SEQ ID NO:601に記載のFc融合タンパク質の2つの同一のコピーを含む、ホモ二量体である免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。

【0093】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質はヘテロ二量体であり、二量体の各ポリペプチドは、野生型Fcドメインに1つまたは複数のアミノ酸改変を個別に含む免疫グロブリンFcドメインに連結されて、ポリペプチド間のヘテロ二量体形成をもたらす。任意の態様のいくつかでは、野生型免疫グロブリンFcはIgG1 Fcドメインである。任意の態様のいくつかでは、前記もう1つのアミノ酸改変は、電荷反発に起因する自己会合を低減または防止するために、ノブ・イントゥ・ホール (knob-into-hole) 改変および電荷変異から選択される。任意の態様のいくつかでは、Fc領域は、任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性を低下させるための、および/またはエフェクター機能を低下させるための、1つまたは複数のアミノ酸置換を、さらに含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域は、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、G237A、またはEUナンバリングによる、アミノ酸置換R292C、N297GおよびV302Cを含む。

【0094】

任意の態様のいくつかでは、ヘテロ二量体は、SEQ ID NO:662または663に記載のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと；SEQ ID NO:660に記載のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドと、を含む。

【0095】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、BCMAまたはTACIに対するAPRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断し、免疫調節タンパク質は、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、または循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、BCMAもしくはTACIに対するAPRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断するか、または免疫調節タンパク質は、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、もしくは循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、B細胞の成熟、分化、および増殖を、低減または阻害する。

【0096】

任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、共刺激受容体へのCD80またはCD86の結合を遮断し、任意で、共刺激受容体はCD28であり、免疫調節タンパク質は、T細胞共刺激を低減または阻害する。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、B細胞の成熟、分化または増殖を低減または阻害する。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、共刺激受容体へのCD80もしくはCD86の結合を遮断し、任意で、共刺激受容体はCD28であるか、または免疫調節タンパク質は、T細胞共刺激を低減もしくは阻害する。

【0097】

本明細書において記載される態様のいずれかの免疫調節タンパク質をコードする核酸分子が本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、核酸分子は合成核酸であ

10

20

30

40

50

る。任意の態様のいくつかでは、核酸分子はcDNAである。

【0098】

本明細書において記載される態様のいずれかの核酸分子を含むベクターが本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、ベクターは発現ベクターである。任意の態様のいくつかでは、ベクターは、哺乳動物発現ベクターまたはウイルスベクターである。

【0099】

本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかの核酸または本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかのベクターを含む細胞が本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、細胞は哺乳動物細胞である。任意の態様のいくつかでは、細胞はヒト細胞である。

【0100】

免疫調節タンパク質を産生する方法であって、宿主細胞に、本明細書において記載される態様のいずれかの核酸分子、または本明細書において記載される態様のいずれかのベクターを、該細胞内で該タンパク質を発現する条件下で導入する工程を含む方法が、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、方法は、該細胞から免疫調節タンパク質を単離または精製する工程を含む。

【0101】

本明細書において記載される態様のいずれかの方法によって産生される免疫調節タンパク質が、本明細書において提供される。

【0102】

本明細書において記載される態様のいずれかの免疫調節タンパク質を含む薬学的組成物が、本明細書において提供される。

【0103】

バリエーションBCMAポリペプチドと、Fc領域と、該BCMAポリペプチドと該Fc領域との間のリンカーとを含むバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質が本明細書において提供され、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:710に記載の位置を基準として、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置に対応する、非改変BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

【0104】

任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMAの細胞外ドメインまたはその特異的結合部分からなるポリペプチドである。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、(i) SEQ ID NO:710に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:710に対して少なくとも95%の37a配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i)もしくは(ii)の一部を含む。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAは、N末端メチオニンを欠く。

【0105】

任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、(i) SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i)もしくは(ii)の一部を含む。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に記載の配列を含む。任意の態様のいくつかでは、参照BCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に記載の配列からなる。

【0106】

任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

10

20

30

40

50

S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G

またはその保存的アミノ酸置換から選択される。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、19位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換は、H19A、H19C、H19D、H19E、H19F、H19G、H19I、H19K、H19L、H19M、H19N、H19P、H19Q、H19R、H19S、H19T、H19V、H19W、H19Yから選択される。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Lを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Kを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Rを含む。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、少なくともアミノ酸置換H19Yを含む。

10

【0107】

任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、25位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換は、Q25E、Q25F、Q25G、Q25H、Q25I、Q25K、Q25L、Q25M、Q25S、Q25V、Q25Yから選択される。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、31位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換は、N31D、N31G、N31H、N31K、N31L、N31M、N31P、N31S、N31V、N31Yから選択される。

20

【0108】

任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、35位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換は、L35A、L35M、L35P、L35S、L35V、L35Yから選択される。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、36位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換は、T36A、T36G、T36N、T36M、T36S、T36Vから選択される。任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、

30

40

50

H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E;
H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D;
S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H;
H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D;
S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A;
H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D;
S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D;
H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I;
H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V;
H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S;
H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G;
H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A;
H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S;
H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N;
H19L/Q25H/N31D/L35S;または H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S

10

20

である。

【0109】

任意の態様のいくつかでは、1つまたは複数のアミノ酸置換は、S16A/H19Y/R39Qを含む。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照TACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する。

【0110】

任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、APRILに対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、BAFFに対して増加した結合親和性を有する。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和性を有する。

30

【0111】

任意の態様のいくつかでは、BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を超えて独立して増加している。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357~435のいずれか1つに記載の配列を含む。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357~435のいずれか1つに記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:381に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:411に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:405に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。任意の態様のいくつかでは、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:406に記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。

40

【0112】

任意の態様のいくつかでは、リンカーはペプチドリンカーを含み、ペプチドリンカーは、

50

GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO: 593), GSGGGGS (SEQ ID NO: 590), GGGSGGGGS (2xGGGS; SEQ ID NO: 594), GGGSGGGSGGGGS (3xGGGS; SEQ ID NO: 595), GGGSGGGSGGGSGGGGS (4xGGGS, SEQ ID NO: 600), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (5xGGGS, SEQ ID NO: 671), GGGSSA (SEQ ID NO: 596)、またはそれらの組合せから選択される。

【0113】

任意の態様のいくつかでは、Fc融合タンパク質は二量体である。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域はホモ二量体Fc領域である。

10

【0114】

任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFcは、IgG1 Fcドメインであるか、または任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下および/もしくはエフェクター機能の低下を示すバリエーションFcである。いくつかの態様では、免疫グロブリンFcはIgG1 Fcドメインであり、Fcは、SEQ ID NO: 597に記載のアミノ酸配列を含む。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFcは、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションIgG1 Fcドメインである。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFc領域は、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、G237A、またはEUナンバリングによる、アミノ酸置換R292C、N297GおよびV302Cを含む。

20

【0115】

任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFcは、SEQ ID NO: 586に記載されている。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO: 589に記載のアミノ酸配列を含むバリエーションFcである。いくつかの態様では、Fc融合タンパク質はホモ二量体である。

【0116】

いくつかの態様では、Fc融合タンパク質は、APRILおよびBAFFを中和する。いくつかの態様では、APRILを中和するためのIC50は、100pM未満、50pM未満、40pM未満、30pM未満、20pM未満、10pM未満、5pM未満もしくは1pM未満であるか、もしくは前述のいずれかの間の任意の値であり、および/またはBAFFを中和するためのIC50は、400pM未満、300pM未満、200pM未満、100pM未満、75pM未満、50pM未満、25pM未満もしくは10pM未満であるか、もしくは前述のいずれかの間の任意の値である。

30

【0117】

任意の態様のいくつかでは、Fc融合タンパク質は、BCMAまたはTACIに対するAPRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断し、Fc融合タンパク質は、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、または循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる。任意の態様のいくつかでは、免疫グロブリンFcは、SEQ ID NO: 586に記載されている。任意の態様のいくつかでは、Fc融合タンパク質は、BCMAもしくはTACIに対するAPRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断するか、またはFc融合タンパク質は、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、もしくは循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる。任意の態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質は、B細胞の成熟、分化、および/または増殖を、低減または阻害する。

40

【0118】

本明細書において記載される態様のいずれかのFc融合タンパク質をコードする核酸分子が本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、核酸分子は合成核酸である。任意の態様のいくつかでは、核酸分子はcDNAである。

【0119】

本明細書において記載される態様のいずれかの核酸分子を含むベクターが本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、ベクターは発現ベクターである。任意の態

50

様のいくつかでは、ベクターは、ウイルスベクターに対する哺乳動物発現ベクターである。

【0120】

本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかの核酸または本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかのいずれかのベクターを含む細胞が本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、細胞は哺乳動物細胞である。任意の態様のいくつかでは、細胞はヒト細胞である。

【0121】

免疫調節タンパク質を産生する方法であって、宿主細胞に、本明細書において提供される態様のいずれかのいずれかの核酸分子、または本明細書において提供される態様のいずれかのいずれかのベクターを、該細胞内で該タンパク質を発現する条件下で導入する工程を含む方法が、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、方法は、該細胞からFc融合タンパク質を単離または精製する工程をさらに含む。Fc融合タンパク質を産生する方法であって、宿主細胞に、本明細書において提供される態様のいずれかの核酸分子、または本明細書において提供される態様のいずれかのベクターを、該細胞内で該タンパク質を発現する条件下で導入する工程を含む方法が、本明細書において提供される。

【0122】

本明細書において記載される態様のいずれかの方法によって産生されるFc融合タンパク質が本明細書において提供される。

【0123】

本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかのFc融合タンパク質を含む薬学的組成物が、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、薬学的組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含有する。任意の態様のいくつかでは、薬学的組成物は無菌である。

【0124】

バイアルまたは容器内に、本明細書において記載される態様のいずれかの薬学的組成物を含む製造物品が、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、バイアルまたは容器は密封される。

【0125】

本明細書において提供される態様のいずれかのいずれかの薬学的組成物と、使用説明書とを含むキットが、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、キットは、本明細書において記載される態様のいずれかの製造物品と、使用説明書とを備える。

【0126】

対象の免疫応答を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、本明細書において記載される態様のいずれかの免疫調節タンパク質を投与する工程を含む方法が、本明細書において提供される。

【0127】

対象の免疫応答を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、本明細書において記載される態様のいずれかのFc融合タンパク質を投与する工程を含む方法が、本明細書において提供される。

【0128】

対象の免疫応答を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかの薬学的組成物を投与する工程を含む方法が、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、B細胞免疫応答が対象において低下し、それにより、B細胞の成熟、分化、および/または増殖が、低減または阻害される。任意の態様のいくつかでは、APRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の循環レベルが、対象において低下する。

【0129】

対象におけるAPRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の循環レベルを低下させる方法であって、本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかの薬学的組

10

20

30

40

50

成物を対象に投与する工程を含む方法が、本明細書において提供される。任意の態様のいくつかでは、T細胞免疫応答が対象において低下し、それにより、T細胞共刺激が低減または阻害される。任意の態様のいくつかでは、免疫応答を低下させることにより、対象における疾患または状態が治療される。

【0130】

対象における疾患、障害または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかの免疫調節タンパク質を投与する工程を含む方法が、本明細書において提供される。

【0131】

対象における疾患、障害または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかのFc融合タンパク質を投与する工程を含む方法が、本明細書において提供される。

【0132】

対象における疾患、障害または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書において記載される態様のいずれかのいずれかの薬学的組成物を投与する工程を含む方法が、本明細書において提供される。

【0133】

対象における疾患、障害または状態を処置するのに使用するための、免疫調節タンパク質またはそれを含有する薬学的組成物のいずれかも本明細書において提供される。対象における疾患、障害または状態を処置するための医薬の製剤化のための免疫調節タンパク質またはそれを含有する薬学的組成物のいずれかの使用も本明細書において提供される。

【0134】

任意の態様のいくつかでは、疾患、障害または状態は、自己免疫疾患、炎症状態、B細胞がん、抗体によって媒介される病態、腎疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病またはウイルス感染である。処置される疾患または状態は、本明細書において記載される任意のものであり得る。任意の態様のいくつかでは、疾患または状態は、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、強皮症、多発性硬化症、糖尿病、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、IgA腎症、視神経炎、アミロイドーシス、抗リン脂質抗体症候群（APS）、多腺性自己免疫症候群II型（APS II）、自己免疫性甲状腺疾患（AITD）、グレーブス病、自己免疫性副腎炎および尋常性天疱瘡からなる群より選択される自己免疫疾患である。任意の態様のいくつかでは、疾患または状態はB細胞がんであり、がんは骨髄腫である。任意の態様のいくつかでは、骨髄腫のタイプには、多発性骨髄腫、形質細胞腫、多発性孤立性形質細胞腫および/または髄外骨髄腫が含まれる。任意の態様のいくつかでは、骨髄腫のタイプには、軽鎖骨髄腫、非分泌性骨髄腫、および/またはIgDもしくはIgE骨髄腫が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】BCMAまたはTACIによる、組換えAPRILおよびBAFFを伴う機能的阻害アッセイの概略図を示す。このアッセイでは、ルシフェラーゼに基づくNF- κ Bレポーターとともに、細胞表面発現でマウスTACIまたはヒトTACIを安定に発現するようにJurkat細胞に形質導入した。組換えAPRILまたはBAFFによる活性化の後、内因性NF- κ B転写因子は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写を制御するDNA応答エレメントに結合する。ルシフェラーゼ発現は、例えば、Bio-Glo（商標）試薬による検出、およびCytation 3リーダーを使用する測定によってモニタリングすることができる。

【図2】ヒトAPRIL（上部パネル）およびBAFF（下部パネル）媒介性シグナル伝達の遮断のための、例示的なヒトBCMA TD Fc融合分子を示す。例示的なBCMA TD Fc融合体をAPRIL（2nM）またはBAFF（4nM）とともに20分間（振盪しながら室温）インキュベートし、次いで、150,000個のJurkat/TACI/NF κ B-ルシフェラーゼ細胞を含むウェルに加え5時間置いた。

【図3A】図3A～図3Bは、APRIL（各図の上部パネル）またはBAFF（各図の下部パネ

ル)の遮断のための、単独での、またはCTLA-4 IgDとスタックした場合の例示的なBCMA TD Fc融合分子の機能を示す。図3Aおよび図3Bは、ヒトBCMA TDが、CTLA-4とスタックした場合に機能を保持することを示す。図3C～図3Dは、APRIL(各図の上部パネル)またはBAFF(各図の下部パネル)の遮断のための、CTLA-4 IgDとスタックした場合の例示的なTACI TD Fc融合分子の機能を示す。図3Cおよび図3Dは、ヒトTACI TDが、CTLA-4とスタックした場合に機能を保持することを示す。

【図3B】図3Aの説明を参照。

【図3C】図3Aの説明を参照。

【図3D】図3Aの説明を参照。

【図4】マウスAPRIL(左パネル)およびBAFF(右パネル)媒介性シグナル伝達の遮断のための、単独でのヒトBCMA融合分子、またはCTLA-4 IgDとスタックした場合のBCMAもしくはTACI TD Fc融合分子を示す。 10

【図5A】TACI 13-118-Fc、TACI 30-110-Fcおよびベリムマブと比較した、ヒトAPRIL(上部パネル)およびBAFF(下部パネル)媒介性シグナル伝達の遮断のための、単独での、またはCTLA-4 IgDとスタックした場合のヒトBCMA TD Fc融合分子を示す。

【図5B】TACI 13-118-Fc、TACI 30-110-Fcおよびベリムマブと比較した、ヒトAPRIL(上部パネル)およびBAFF(下部パネル)媒介性シグナル伝達の遮断のための、CTLA-4 IgDとスタックした場合のヒトTACI TD Fc融合分子を示す。

【図6】CD80/CD86-CD28媒介性共刺激の、機能的障害アッセイの概略図を示す。Jurkat/IL-2細胞は、抗CD3刺激および抗CD28刺激によって刺激された場合、IL-2プロモーターによって促進されるルシフェラーゼレポーターを安定に発現する。受容体媒介性シグナル伝達は、IL-2プロモーター媒介性発光をもたらす、生物発光シグナルは、例えば、Bio-Glo(商標)基質およびルミノメーターを使用することによって検出および定量することができる。 20

【図7】図7Aおよび図7Bは、野生型またはCTLA-4 vIgD(IgSFドメイン)が、BCMAをTACI TDにした多重特異性(スタック)構築物分子に含まれた場合に、CD80(左パネル)またはCD86(右パネル)の遮断のための機能を維持することを示す。

【図8-1】図8A～図8Fは、自己T_{FH}-B細胞アッセイでヒト濾胞性ヘルパーT(T_{FH})細胞およびB細胞を阻害するための、単独での、またはBCMAもしくはTACI TDを有する多重特異性(スタック)分子に含めた場合のCTLA-4 vIgDの活性を示す。漸増設定した(100,000~32pM)タンパク質の存在下で、B-Tfh細胞培養物を7日間インキュベートした。培養細胞を表面染色し、フローサイトメトリーによって以下について分析した:(図8A)CD4+T細胞の回収、(図8B)CD4+CD40L+細胞の回収、(図8C)CD4+ICOS+細胞の回収、(図8D)CD19+B細胞の回収、および(図8E)B細胞活性化/CD86のアップレギュレーション。上清を収集し、ELISAによってIgM分泌のレベルを決定した(図8F)。データは、各条件に関する3回の反復実験の平均(±SEM)を表す。 30

【図8-2】図8-1の説明を参照。

【図9】KLH免疫化モデルにおける、終了時(19日目)の血清中の抗KLH IgM抗体レベルを示す。1元配置ANOVAによって、各群間の統計的な差を決定した。有意差(p<0.05)のみを列挙する。 40

【図10】KLH免疫化モデルにおける、終了時(19日目)の血清中の抗KLH IgG1抗体レベルを示す。1元配置ANOVAによって、各群間の統計的な差を決定した。有意差(p<0.05)のみを列挙する。

【図11】KLHモデルにおける終了時(19日目)の脾臓重量を示す。t検定によって、Fc対照と他の試験品との間の統計的な差を決定した。有意(p<0.05)差のみを列挙する。

【図12-1】図12A～図12Hは、KLHモデルにおける終了時(19日目)の脾細胞B細胞およびTfhサブセットのフローサイトメトリー分析を示す。脾臓を処理し、B220+B細胞(図12A、図12E);辺縁帯(MZ)B細胞(図12B、図12F);胚中心(GC)B細胞(図12C、図12G);T濾胞性ヘルパー(Tfh)細胞(図12D、図12H)についてフロー 50

サイトメトリーによって分析した。「Fc対照」=SEQ ID NO:589に記載のFc。未補正FisherのLSD検定を用いた1元配置ANOVAによって、Fc対照またはアバタセプトとの統計学的有意差 ($p < 0.05$) を計算した。

【図12-2】図12-1の説明を参照。

【図13】図13A~図13Dは、KLHモデルにおける終了時(19日目)の脾細胞Tエフェクターメモリーサブセットのフローサイトメトリー分析を示す。脾臓を処理し、 $CD4^+$ (図13A、図13C) および $CD8^+$ (図13B、図13D) Tエフェクターメモリー (T_{em}) 細胞について、フローサイトメトリーによって分析した。「Fc対照」=SEQ ID NO:589に記載のFc。未補正FisherのLSDを用いた1元配置ANOVAによって、Fc対照またはアバタセプトとの統計学的有意差 ($p < 0.05$) を計算した。

10

【図14A】図14A~図14Iは、ヒトSLEのNZB/NZWマウスモデルにおいて評価したパラメータの分析を示す。タンパク尿スコア (図14A)、平均体重変化率 (図14B) および生存率 (図14C) を20週齢から評価した。抗二本鎖DNA IgG力価 (図14D) および血中尿素窒素 (BUN) (図14E) について血清を分析した (**未補正Dunnの検定による、Fcと対比して $p = 0.0047$ および $p = 0.0065$; ***未補正Dunnの検定による、Fcと対比して $p = 0.0004$)。腎臓を処理し、反復過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色切片に対する組織学的検査によって分析した。個々の成分および総組織学スコアを図14Fに示す。図14Gおよび図14Hにそれぞれ示すように、マウスIgGおよび補体C3の糸球体沈着の免疫組織化学的分析のために、凍結腎臓も切片化し、染色した。図14Iは、組織学的スコア $\pm$ SEMを示す。

20

【図14B】図14Aの説明を参照。

【図14C】図14Aの説明を参照。

【図14D】図14Aの説明を参照。

【図14E】図14Aの説明を参照。

【図14F】図14Aの説明を参照。

【図14G】図14Aの説明を参照。

【図14H】図14Aの説明を参照。

【図14I】図14Aの説明を参照。

【図15】例示的なBCMA-Fc融合タンパク質の概略図を示す。

【図16】提供されるマルチドメイン (スタック) 免疫調節タンパク質の例示的なFc融合形式の概略図を示す。

30

【図17A】図17Aおよび図17Bは、参照配列と比較した、配列内の対応する残基を同定するための例示的な配列アライメントを示す。2つのアライメントされたアミノ酸の間の記号「*」は、アライメントされたアミノ酸が同一であることを示す。記号「-」は、アライメントのギャップを示す。本明細書において記載されるアミノ酸置換のための例示的な非限定的な位置は、太字で示されている。共通の同一の残基を有する2つの類似の配列のアライメントに基づいて、当業者であれば、保存された同一のアミノ酸残基をガイドとして使用して、参照配列と比較することによって、配列内の「対応する」位置を同定することができる。図17Aは、SEQ ID NO:709に記載の参照TACI細胞外ドメイン配列 (CRD1およびCRD2と、開始メチオニン残基とを有する、完全な細胞外ドメインを含む) と、SEQ ID NO:528に記載のTACI細胞外ドメイン配列 (単一のCRD、CRD2のみを含む) との例示的なアライメントを提供する。同一の残基をアライメントすることによって、例えば、SEQ ID NO:528のアミノ酸残基E7がSEQ ID NO:709の残基E74に対応し、SEQ ID NO:528のアミノ酸残基K10がSEQ ID NO:709の残基K77に対応し、SEQ ID NO:528のアミノ酸残基Y12がSEQ ID NO:709のY79に対応し、SEQ ID NO:528のアミノ酸残基L15がSEQ ID NO:709のL82に対応し、SEQ ID NO:528のアミノ酸残基R17がSEQ ID NO:709のR84に対応し、SEQ ID NO:528のアミノ酸残基D16がSEQ ID NO:709のD85に対応することが示される。図17Bは、SEQ ID NO:710に記載の参照BCMA細胞外ドメイン配列 (CRDおよび開始メチオニン残基を有する、完全な細胞外ドメインを含む) と、SEQ ID NO:356に記載のBCMA細胞外ドメイン配列 (

40

50

開始メチオニンを有しない)との例示的なアライメントを提供する。同一の残基をアライメントすることによって、例えば、SEQ ID NO:356のアミノ酸残基H18がSEQ ID NO:710の残基H19に対応し、SEQ ID NO:356のアミノ酸残基R38がSEQ ID NO:710の残基R39に対応することが示される。対応する残基を同定するために2つの類似のタンパク質配列間で類似のアライメントを行うことは、本明細書における例示および説明に基づくことを含め、当業者のレベルの範囲内である。

【図17B】図17Aの説明を参照。

【図18】図18A～図18Dは、マウスキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) モデルで評価したパラメータの分析を示す。一次応答 (図18A) および二次応答 (図18B) として、血清-KLH IgM ODレベルを評価した。同様に、一次応答 (図18C) および二次応答 (図18D) の両方として、血清抗KLH IgG1 ODレベルを評価した。

10

【図19】図19A～図19Bは、マウスキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 免疫化モデルから評価した、採取した脾臓の分析を示した。脾臓を処理し、重量 (図19A) および総細胞数 (図19B) によって分析した。

【図20】マウスキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) モデル由来の細胞サブタイプ集団構成について評価した脾臓の分析を示し、群平均と比較したB細胞サブセット数の結果を示す。

【図21】マウスキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) モデル由来の細胞サブタイプ表現型構成について評価した脾臓の分析を示し、胚中心B細胞および形質細胞の数に関する結果を示す (図21)。

20

【図22】図22A～図22Dは、マウスキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) モデルにおけるT細胞数を示す。脾臓CD3+T細胞、CD8+T細胞、CD4+T細胞および濾胞性ヘルパーT細胞を、それぞれ図22A、図22B、図22Cおよび図22Dに示す。

【図23】マウスキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) モデルにおける、T_{cm}およびT_{em}細胞集団を示す。

【図24】図24A～図24Bおよび図25A～図25Bは、186-CTLA-4 FcおよびCTLA4 186-GSG4S-Fc- (G4S) 4-TACI 541試験分子による処置後の糖尿病傾向マウスにおける、唾液腺炎 (図24A～図24B) および膵島炎 (図25A～図25B) の全体的な発生率および程度を示す。

【図25】図24の説明を参照。

30

【図26】186-CTLA-4 FcおよびCTLA4 186-GSG4S-Fc- (G4S) 4-TACI 541試験分子による処置後の糖尿病傾向マウスにおける、7、8、9および10日目の血液中で測定した平均血中グルコース濃度 (mg/dL) を示す。

【図27】図27および図28A～図28Cは、例示的なCTLA4 186-GSG4S-Fc- (G4S) 4-TACI 541マルチドメイン分子を用いて試験し、WT-TACI Fcのみと比較したインビボマウスbm12誘導性SLEモデルから得られた結果を示す。82日目 (試験終了) に採取した血清からのBUN濃度を図27に示す。図28A～図28Cは、14、42および82日目に採取した血清からのIgG2b (図28A)、IgG2c (図28B) およびIgG3 (図28C) のレベルを示す。

【図28】図27の説明を参照。

40

【図29】図29は、例示的なCTLA4 186-GSG4S-Fc- (G4S) 4-TACI 541マルチドメイン分子を用いて試験したインビボマウスbm12誘導性SLEモデルにおいて収集した血清からの抗dsDNA抗体レベルのレベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0136】

詳細な説明

B細胞応答または活性、場合によってはT細胞応答も抑制または低減するために、例えば、抗原提示細胞上の、または可溶性因子として産生される、1つまたは複数の他の免疫受容体またはリガンドに関与する免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。提供される免疫調節タンパク質の中には、BAFFリガンドまたはAPRILリガンドに結合して

50

、それらの活性を中和し、B細胞刺激受容体、例えば、TACIまたはBCMAの活性を遮断するかまたはそれに拮抗するタンパク質がある。提供される免疫調節タンパク質は、BCMA細胞外ドメインまたはその結合部分（以下、BCMA ECD）と、免疫グロブリンFcなどの多量体化ドメインとの融合タンパク質であり得る。例えば、BCMA-Fc融合タンパク質が本明細書において提供される。さらになお、BAFFリガンドまたはAPRILリガンドに結合して、それらの活性を中和し、TACIまたはBCMAなどのB細胞刺激受容体の活性を遮断するかまたはそれに拮抗する、少なくとも1つの第1の結合ドメインと、例えば、CD80リガンドまたはCD86リガンドに結合することによって、T細胞刺激受容体の活性を遮断するかまたはそれに拮抗して、T細胞刺激受容体CD28または負の調節タンパク質CTLA-4との相互作用を介してそれらの活性を中和する、少なくとも1つの第2の結合ドメインと、を含む、マルチドメイン免疫調節タンパク質（「スタック」免疫調節タンパク質とも呼ばれる）が提供される。いくつかの態様では、本明細書において提供される免疫調節タンパク質は、調節不全の免疫応答に関連する、例えば、炎症性疾患または自己免疫疾患を含む炎症性症状または自己免疫症状に関連する疾患、障害または状態の処置に使用され得る。

10

【0137】

免疫系は、自己免疫を予防し（すなわち、自己寛容）、免疫応答中、例えば、病原性感染に対する攻撃中の過剰な損傷から組織を保護するために免疫チェックポイントに依存する。しかし、場合によっては、免疫系は調節不全になり得、異常な免疫応答が正常な身体部分または組織に対して起こり、自己免疫疾患もしくは自己免疫状態または自己免疫症状をもたらす得る。他の場合には、望ましくない免疫応答が、移植片などの外来組織に対して起こり、移植片拒絶をもたらす可能性がある。

20

【0138】

いくつかの局面では、B細胞活性および/またはT細胞活性などの免疫細胞活性を変化させる免疫療法は、免疫応答が調節不全である特定の疾患、障害および状態を処置することができる。特に、B細胞応答および/またはT細胞応答などの免疫応答の阻害または減弱は、望ましくない炎症、自己免疫症状および/または移植片拒絶を低減または予防するために望ましい可能性がある。しかし、例えば、免疫シナプス内で免疫応答を媒介する、リガンドとその受容体との間の相互作用を調節しようとする治療手法は、完全に満足できるものではない。場合によっては、免疫細胞、例えば、T細胞またはB細胞の免疫調節効果に介入し、それを変化させる治療法は、空間的配向の要件と、免疫シナプスの範囲によって課されるサイズ制限とによって制約される。いくつかの局面では、抗体薬物を含む既存の治療薬は、これらの相互作用の調節に関与する複数の標的タンパク質と同時に相互作用することができない場合がある。例えば、可溶性受容体および可溶性抗体は、一般に、競合的に結合し（例えば、一度に複数の標的種に結合しない）、したがって、複数の標的に同時に結合する能力を欠く。さらに、これらの受容体の1つを独立して標的とする薬物間の薬物動態学的な差は、治療過程を通して2つの異なる標的を標的とする薬物の組合せの所望の血中濃度を適切に維持することを困難にする可能性がある。

30

【0139】

BAFFおよびAPRILは、B細胞上のTACIおよびBCMAの両方に結合するTNFスーパーファミリーメンバーである。BAFFはまた、第3の受容体、BAFF-Rに結合する。併せて、BAFFおよびAPRILは、B細胞の発達、分化、および生存を支援する。それらの共中和は、抗体産生を含むB細胞機能を劇的に低下させるが、単独でのBAFFまたはAPRILのいずれかの阻害は、比較的穏やかな効果を媒介する。T細胞共刺激を遮断する、CTLA-4に基づく治療薬は、多くの疾患状況では、安全で中程度に有効なT細胞阻害をもたらすのに対して、B細胞標的化療法は、有望な治療可能性を示しているが、完全に満足できるものではない。

40

【0140】

提供される態様の中には、改善された中和活性と、B細胞応答の抑制または低減とをもたらすものがある。いくつかの態様では、改善された活性は、提供される免疫調節タンパ

50

ク質とBAFFおよび/またはAPRILとの、結合または相互作用の増加または改善によって媒介される。例えば、BAFFおよび/またはAPRILに対するタンパク質の結合親和性の改善をもたらす1つまたは複数のアミノ酸置換(substitution)(置換(replacement)または変異)を含むバリエーションBCMAポリペプチドが、本明細書において提供される。特に、提供される態様の中には、BAFFとAPRILとの組み合わせられた阻害の改善をもたらすものがある。さらに、提供される免疫調節タンパク質には、単独で(例えばBCMA-Fc)、またはT細胞共刺激の阻害と合わせて、BAFFおよび/またはAPRIL媒介活性を抑制するものが含まれる。例えば、提供される態様の中には、T細胞刺激受容体のリガンドにおよび/またはT細胞刺激受容体に結合して、T細胞応答に拮抗するかまたはそれを遮断する別のドメインであるT細胞阻害分子(TIM)に融合された、BAFFおよび/またはAPRILに結合する細胞外ドメイン部分(例えばBCMA ECD)である、B細胞阻害剤分子(BIM)である、マルチドメイン免疫調節タンパク質がある。提供される免疫調節タンパク質は、B細胞応答を単独で、またはT細胞応答の調節とともに調節する改善された活性をもたらすことが企図される。したがって、提供される免疫調節タンパク質は、SLEのような重度のB細胞関連自己免疫疾患を含む自己免疫疾患または炎症性疾患を処置する点で効果的かつ持続的な疾患抑制をもたらす。

10

【0141】

例えば、提供される態様は、ある特定の分子(例えばBCMA)のエクトドメインのTNFRドメイン(TD)の親和性改変による指向性進化が、APRILおよび/またはBAFFに対する親和性が改善された分子の発達を促進したという知見に基づく。したがって、親和性改変は、バリエーションTNFRドメイン(vTD)を含むバリエーションBCMAを産生する。そのような分子と免疫グロブリンFcとの融合は、B細胞の活性および応答を抑制する免疫調節タンパク質をもたらす。同様に、提供される態様はまた、T細胞阻害分子、例えばCTLA-4細胞外ドメインの免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメインとのマルチドメイン融合体として、TDドメイン、例えば、野生型(WT)TDまたはvTDをさらに含むことが、免疫抑制活性をさらに増強するという知見に基づく。そのような活性は、CD28共刺激受容体および阻害性CTLA-4受容体のリガンドであるCD80および/CD86リガンドに対する親和性をさらに増強するバリエーションIgSFドメイン(vIgD)を産生するためのCTLA-4のIgSFドメインの親和性改変による指向性進化によってさらに改善され得る。本明細書における知見は、これらの免疫調節タンパク質が、インビトロおよびインビボで強力な免疫抑制活性および有効性を一定して示し、ベリムマブ、アバタセプト、アタシセプトまたはテリタシセプトのような既存のおよび/または承認された免疫調節薬よりも優れているように思われることを実証している。したがって、そのような生物製剤は、B細胞関連疾患、例えば、SLE、シェーグレン症候群および他の結合組織病を含む重度の自己免疫疾患および/または炎症性疾患の処置のための魅力的な開発候補であり得る。

20

30

【0142】

特許文書、科学論文およびデータベースを含めて、本出願において参照されるすべての刊行物は、あたかもそれぞれの個々の刊行物が個々に参照により組み入れられているかのように、あらゆる目的のためにその全体が参照により組み入れられる。本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、特許出願、公開特許出願および他の刊行物において示される定義と相反するかまたは他の形で矛盾する場合は、本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる定義に優先する。

40

【0143】

本明細書において用いられるセクションの見出しは、編成のみを目的としたものであり、記述されている主題を限定するものと解釈されるべきではない。

【0144】

1. 定義

別段の定義がない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語、表記法ならびに他の技術および科学用語または専門用語は、特許請求される主題が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有することが意図されている。場合によ

50

っては、一般的に理解される意味を有する用語は、明確化および/または参照を容易にするために本明細書において定義され、本明細書においてかかる定義を含むことは、必ずしも当技術分野において一般的に理解されているものに対する実質的な相違を表すと解釈されるべきではない。

【0145】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の言及を含む。

【0146】

本明細書において使用される用語「約」は、この技術分野の当業者に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」何らかの値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする態様を含む（および説明する）。例えば、「約X」を参照する記載は、「X」という記載を含む。

【0147】

タンパク質のドメインに関連して使用される用語「親和性改変された」は、親野生型タンパク質または非改変（すなわち、非親和性改変ドメイン）タンパク質と比較して、その結合パートナー（あるいは「相手構造(counter-structure)」)のうちの少なくとも1つに対する結合親和性などの結合活性が増加または低下するように、（対応する野生型親ドメインまたは非改変ドメインと比較して）細胞外ドメインまたはその特異的結合部分に変更されたアミノ酸配列を有する哺乳動物タンパク質を意味する。いくつかの態様では、親和性改変ドメインは、野生型ドメインまたは非改変ドメインに、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれ以上のアミノ酸の相違、例えばアミノ酸置換を含み得る。結合活性、例えば結合親和性の増加または低下は、フローサイトメトリーを含む周知の結合アッセイを使用して決定することができる。Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5:443-453 (2005). Linsley et al., Immunity, 1:7930801 (1994) も参照されたい。その結合パートナーに対するタンパク質の結合活性、例えば親和性の増加は、野生型対照の値よりも少なくとも10%大きい値、いくつかの態様では、野生型対照の値よりも少なくとも20%、30%、40%、50%、100%、200%、300%、500%、1000%、5000%または10000%大きい値までである。その結合パートナーのうちの少なくとも1つに対するタンパク質の結合活性、例えば親和性の低下は、対照の90%以下であるが野生型対照の値の10%以上の値、いくつかの態様では、野生型対照の値の80%、70%、60%、50%、40%、30%または20%以下であるが10%以上の値までである。親和性改変タンパク質は、アミノ酸残基の置換、付加または欠失によって、細胞外ドメインまたはその特異的結合部分の一次アミノ酸配列が変化している。用語「親和性改変された」は、親和性改変されたタンパク質が作製された任意の特定の出發組成物または方法に対していかなる条件も課すと解釈されない。したがって、親和性改変タンパク質は、親和性改変の任意の特定のプロセスによって親和性改変ドメインに形質転換される野生型タンパク質ドメインに限定されない。親和性改変ドメインポリペプチドは、物質の親和性改変ドメイン組成物を得るために、例えば、野生型哺乳動物ドメイン配列情報から出發して生成され、次いで、その結合パートナーに結合するためにインシリコでモデル化され、最後に組換え合成または化学合成され得る。ただし、代替的な一例では、親和性改変ドメインは、野生型ドメインの部位特異的変異誘発によって作製され得る。したがって、親和性改変IgSFドメインまたは親和性改変TDドメインは、ある生成物を示し、必ずしも任意の所与のプロセスによって産生された生成物を示すものではない。組換え法、化学合成またはそれらの組合せを含む様々な技術が使用され得る。

【0148】

用語「親和性改変IgSFドメイン」は、非親和性改変IgSFドメインまたは非改変IgSFドメインを含む親野生型タンパク質または非改変タンパク質と比較して、その結合パート

ナー（あるいは「相手構造」）のうちの少なくとも1つに対する結合親和性などの結合活性が増加または低下するように、（対応する野生型親ドメインまたは非改変ドメインと比較して）IgSFタンパク質の細胞外ドメインまたはその特異的結合部分内の免疫グロブリンドメイン（例えばIgV）の変更されたアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）タンパク質のメンバーの親和性改変ドメインを指す。

【0149】

用語「親和性改変TDドメイン」は、それぞれTNFRドメインまたはTNFドメインの変更されたアミノ酸配列を有する腫瘍壊死受容体スーパーファミリー（TNFRSF）タンパク質のメンバーまたはそのTNFリガンドの親和性改変ドメインを指す。例えば、TNFRSFタンパク質の親和性改変TDドメインは、非親和性改変TDドメインまたは非改変TDドメインを含む親野生型タンパク質または非改変タンパク質と比較して、その結合パートナー（あるいは「相手構造」）のうちの少なくとも1つに対する結合親和性などの結合活性が増加または低下するように、（対応する野生型親ドメインまたは非改変ドメインと比較して）TNFRSFタンパク質の細胞外ドメインまたはその特異的結合部分内の少なくとも1つのシステインリッチドメイン（CRD）から構成されるTNFRドメインの変更されたアミノ酸配列を有する。

【0150】

用語「B細胞阻害分子」またはBIMは、B細胞刺激受容体の活性に拮抗するかまたはそれを遮断するタンパク質分子を指す。BIMは、B細胞刺激受容体の同族リガンドに直接結合することによってB細胞刺激受容体の活性に拮抗し、それによって、リガンドとB細胞刺激受容体との間の結合を遮断するかまたは減少させることができる。例えば、BIMは、B細胞刺激受容体B細胞成熟抗原（BCMA）、B細胞活性化因子受容体（BAFF-R）ならびに膜貫通活性化因子およびカルシウムモジュレーターおよびシクロフィリンリガンド-相互作用体（TACI）のリガンドであるAPRILおよび/またはBAFFに結合する。特定の態様では、本明細書において提供されるBIMは、同族リガンドAPRILならびに/またはBAFF、ならびにAPRILおよびBAFFのヘテロ三量体に結合する、B細胞刺激受容体のTNF受容体スーパーファミリドメイン（TD、例えばCRD）を含む細胞外ドメインまたはその一部を含む。例えば、BIMは、同族リガンドAPRILならびに/またはBAFF、ならびにAPRILおよびBAFFのヘテロ三量体に結合する、TACIの細胞外ドメイン、またはTDドメインを含むTACIの細胞外ドメインの一部を含む。他の例では、BIMは、同族リガンドAPRILならびに/またはBAFF、ならびにAPRILおよびBAFFのヘテロ三量体に結合する、BCMAの細胞外ドメイン、またはTDドメインを含むBCMAの細胞外ドメインの一部を含む。BIMはまた、同族リガンド（例えば、APRILならびに/またはBAFF、ならびにAPRILおよびBAFFのヘテロ三量体）に対する結合親和性を増加させる、TDにもう1つのアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を有する、TACIまたはBCMAの細胞外ドメインまたはその一部の親和性改変バリエーションを含むことができる。

【0151】

本明細書において使用される場合、「B細胞刺激受容体」は、B細胞上に発現される関連する腫瘍壊死因子（TNFR）スーパーファミリー受容体である、B細胞成熟抗原（BCMA）、B細胞活性化因子受容体（BAFF-R）ならびに膜貫通活性化因子およびカルシウム調節性およびシクロフィリンリガンド-相互作用体（TACI）のうちの1つまたは複数を指す。それらの同族リガンド、BAFFおよび/またはAPRIL、またはAPRILおよびBAFFのヘテロ三量体によるこれらの関連受容体の関与またはライゲーションは、B細胞の生存、B細胞の成熟および分化、ならびに免疫グロブリンクラススイッチングを含むB細胞恒常性を調節する。B細胞刺激受容体は、一般に、細胞外部分、膜貫通ドメインおよび細胞質領域を含み、細胞質領域は、1つまたは複数のTNF受容体関連因子（TRAF）結合部位を含む。細胞質ドメインへの様々なTRAF分子の動員は、NF- κ B（例えば、NF- κ B1またはNF- κ B2）などの様々な転写因子を活性化して、B細胞恒常性を調節するB細胞シグナル伝達経路を媒介することができる。

【0152】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される場合、「結合する」「結合した」またはその文法的変形例は、ある分子が別の分子との任意の引力相互作用に参与し、2つの分子が互いに近接している安定した会合をもたらすことを指す。結合には、限定されることなく、非共有結合、共有結合（可逆的共有結合および不可逆的共有結合など）が含まれ、限定されることなく、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質および小分子、例えば、薬物を含む化合物などの分子間の相互作用が含まれる。

【0153】

本明細書において使用される場合、結合活性とは、1つまたは複数の結合パートナーに結合するかどうか、およびどのように結合するかに関する分子、例えばポリペプチドの特徴を指す。結合活性には、結合パートナーに対する1つの分子の結合の任意の尺度が含まれ得る。結合活性には、結合パートナーに結合する能力、結合パートナーに結合する親和性（例えば高親和性）、結合パートナーに結合するアビディティ、結合パートナーとの結合の強度、および/または結合パートナーとの結合に対する特異性もしくは選択性が含まれる。

10

【0154】

本明細書において使用される用語「結合親和性」は、特異的結合条件下でのその結合パートナー（すなわち、その相手構造）に対するタンパク質の特異的結合親和性を意味する。結合親和性は、結合パートナーなどの2つ以上の分子間の相互作用の強度、典型的には2つの結合パートナー間の非共有結合性相互作用の強度を指す。結合パートナーに対する親和性改変ドメインまたは親和性改変ドメインを含む免疫調節タンパク質の結合親和性の増加または減弱は、非改変ドメイン（例えば、天然もしくは野生型IgSFドメイン、または天然もしくは野生型TDドメイン）の結合親和性と比較して決定される。結合親和性または相対的結合親和性を決定する方法は、当技術分野において公知であり、固相ELISA、イムノアッセイ、ForteBio Octet、Biacore測定またはフローサイトメトリーである。例えば、Larsen et al., American Journal of Transplantation, vol. 5:443-453 (2005); Linsley et al., Immunity, Vol 1 (9):793-801 (1994) を参照されたい。いくつかの態様では、結合親和性は、フローサイトメトリーによって、例えば、フロー結合アッセイにおける平均蛍光強度（MFI）に基づいて測定され得る。

20

【0155】

本明細書において使用される用語「結合アビディティ」は、特異的結合条件下でのその結合パートナー（すなわち、その相手構造）に対するタンパク質の特異的結合アビディティを意味する。生化学的動態では、アビディティとは、個々の非共有結合性結合相互作用、例えば、その結合パートナー（すなわち、その相手構造）に対するタンパク質間の複数の親和性の累積強度を指す。したがって、アビディティは、単一の相互作用の強度を表す親和性とは異なる。

30

【0156】

用語「生物学的半減期」は、免疫調節タンパク質などの物質がその薬理的または生理学的な活性または濃度の半分を失うのにかかる時間の量を指す。生物学的半減期は、物質の排出、排泄、分解（例えば、酵素分解/消化）、または身体のある特定の器官もしくは組織内の吸収および濃度による影響を受け得る。いくつかの態様では、生物学的半減期は、物質の血漿濃度がその定常状態レベルの半分に達するのにかかる時間（「血漿半減期」）を決定することによって評価され得る。タンパク質を誘導体化し、タンパク質の生物学的半減期を延長するのに使用され得るコンジュゲートは、当技術分野において公知であり、限定されることなく、多量体化ドメイン（例えばFc免疫グロブリンドメイン）、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、XTEN（伸長組換えペプチド; 国際公開公報第2013130683号を参照）、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）、脂質（アシル化）、およびポリ-Pro-Ala-Ser（PAS）、ポリグルタミン酸（グルタミル化）を含む。

40

【0157】

本明細書において使用される用語「細胞表面の相手構造」（あるいは「細胞表面の結合

50

パートナー」)は、哺乳動物細胞上に発現される相手構造(あるいは結合パートナー)である。典型的には、細胞表面の結合パートナーは膜貫通タンパク質である。いくつかの態様では、細胞表面の結合パートナーは受容体である。

【0158】

受容体、可溶性リガンドなどのタンパク質、または細胞外ドメインもしくはその一部もしくはその親和性改変バリエーションに関して、用語「結合パートナー」または「相手構造」は、参照されるタンパク質が特異的結合条件下で特異的に結合する少なくとも1つの分子(典型的には天然哺乳動物タンパク質)を指す。いくつかの局面では、親和性改変ドメイン、または親和性改変ドメインを含む免疫調節タンパク質は、天然タンパク質または野生型タンパク質の対応するドメインの結合パートナーに特異的に結合するが、親和性は増加または減弱する。「細胞表面の結合パートナー」は、哺乳動物細胞上に発現される結合パートナーである。典型的には、細胞表面の結合パートナーは膜貫通タンパク質である。いくつかの態様では、細胞表面の結合パートナーは、免疫シナプスを形成する哺乳動物細胞などの細胞、例えば免疫細胞上に、および免疫細胞によって発現される受容体、または受容体のリガンドである。

10

【0159】

細胞表面分子への結合に関して、用語「シス」は、それぞれが同じ細胞の表面に存在する2つ以上の異なる細胞表面分子への結合を指す。いくつかの態様では、シスとは、2つ以上の細胞表面分子が、ISを形成する2つの哺乳動物細胞の一方の上に排他的に存在するか、または他方の上に排他的に存在する(両方ではない)ことを意味する。

20

【0160】

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

30

【0161】

ヌクレオチドまたはアミノ酸位置が、配列表に記載されているような開示される配列内のヌクレオチドまたはアミノ酸位置「に対応する」という記載など、タンパク質の位置に関して、用語「に対応する」は、構造配列アライメントに基づいて、またはGAPアルゴリズムなどの標準的なアライメントアルゴリズムを使用して、開示される配列とアライメントした際に同定されるヌクレオチドまたはアミノ酸位置を指す。配列をアライメントすることによって、当業者であれば、例えば、保存された同一のアミノ酸残基をガイドとして使用して、対応する残基を同定することができる。図17Aおよび図17Bは、2つの配列をアライメントすることによる対応する残基の同定を例示する。

40

【0162】

本明細書において使用される場合、「ドメイン」(典型的には、3個以上、一般に5または7個以上のアミノ酸、例えば、10~200個のアミノ酸残基の配列)は、分子の他の部分と構造的および/または機能的に異なり、同定可能である、タンパク質またはコード核酸などの分子の部分の部分を指す。例えば、ドメインは、1つまたは複数の構造モチーフから構成された、タンパク質内に独立してフォールディングされた構造を形成することができ、および/または結合活性などの機能活性によって認識されるポリペプチド鎖の部分を含む。タンパク質は、1つまたは複数の異なるドメインを有することができる。例えば、ドメインは、関連するファミリーメンバーに対する一次配列または構造の相同性、例えば、

50

モチーフに対する相同性によって同定、定義または区別され得る。別の例では、ドメインは、その機能、例えば、同族結合パートナーなどの生体分子と相互作用する能力によって区別され得る。ドメインは、ドメインが独立して、または別の分子に融合されたドメインが、例えば結合などの活性を行うことができるように、生物学的機能または活性を独立して示すことができる。ドメインは、直鎖状アミノ酸配列または非直鎖状アミノ酸配列であり得る。多くのポリペプチドは、複数のドメインを含む。そのようなドメインは公知であり、当業者によって同定され得る。本明細書における例示のために、定義が提供されるが、特定のドメインを名称によって認識することは十分に当業者の範囲内であることが理解される。必要に応じて、適切なソフトウェアを使用してドメインを同定することができる。ドメイン構成（例えば、IgSFドメインまたはTDドメイン）を記載するために使用されるSEQ ID NOとして記載される特定の配列を含むアミノ酸への言及は、例示を目的とするものであり、提供される態様の範囲を限定することを意図するものではないことが理解される。ポリペプチド、およびそのドメインの説明は、相同性分析、および類似分子とのアライメントに基づいて理論的に導出されることが理解される。また、場合によっては、所与のドメイン（例えば、IgSFドメインまたはTD）の隣接するN末端アミノ酸および/またはC末端アミノ酸もまた、例えば、発現された場合にドメインの適切なフォールディングを確実にするために、配列に含めることができる。したがって、正確な遺伝子座は、変動し得、各タンパク質について必ずしも同じではない。例えば、特定のIgSFドメイン、例えば、特定のIgVドメインまたはIgCドメインは、数アミノ酸（1～10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸）長くてもまたは短くてもよい。同様に、特定のTDドメイン、例えば、特定のCRDドメインは、数アミノ酸（1～10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸）長くてもまたは短くてもよい。

10

20

【0163】

本明細書において区別なく使用される用語「エクトドメイン」、「細胞外ドメイン」または「ECD」は、膜タンパク質の完全長形態が細胞から発現される場合、ベシクル膜の外側（例えば、細胞の外側の空間）にある、膜貫通タンパク質などの膜タンパク質の領域を指す。本明細書における目的のために、ECDへの言及は、この領域を構成し、ECDを含むタンパク質が膜タンパク質であること、またはドメインが細胞の外側に存在することを必要としない配列およびドメインを指すことが理解される。例えば、可溶性免疫調節タンパク質は、別の部分、例えば多量体化ドメイン、例えばFc領域に融合された、膜タンパク質のECD配列を含み得る。エクトドメインは、例えば、リガンドまたは細胞表面受容体に特異的に結合する結合ドメインを介して、特異的リガンドまたは特異的細胞表面受容体と相互作用することが多い。結合ドメインの例には、免疫グロブリンドメイン（IgD、IgSFドメインとも呼ばれる）またはシステインリッチドメイン（CRD）が挙げられる。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーのエクトドメインは、IgD（例えばIgVドメイン）を含む。TNFRスーパーファミリーのメンバーのエクトドメインは、TDドメイン（例えばCRDドメイン）を含む。したがって、本明細書におけるECDへの言及は、膜タンパク質のECDの完全長配列、およびリガンドまたは同族結合パートナーに結合するIgDまたはCRDを含むその特異的結合断片を含む。

30

【0164】

用語「有効量」または「治療有効量」は、例えば、単独で（すなわち、単剤療法として）、または追加の治療剤と組合わせてエキスピボで（患者由来の細胞との接触によって）またはインビボで（患者への投与によって）投与された場合、例えば、症状、および/または疾患の原因を改善または排除することによって、疾患進行の統計学的に有意な阻害をもたらす、免疫調節タンパク質またはFc融合タンパク質を含有する治療用組成物の量および/または濃度を指す。疾患、状態または障害、例えば、免疫系疾患または免疫系障害を処置するための有効量は、疾患、状態もしくは障害に関連する少なくとも1つの症状もしくは生物学的応答もしくは作用を軽減、低減もしくは緩和するか、疾患、状態もしくは障害の進行を予防するか、または患者の身体機能を改善する量であり得る。細胞療法の場合、有効量は、患者に投与される細胞の有効な用量または数である。いくつかの態様では

40

50

、患者はヒト患者である。

【0165】

本明細書において使用される場合、融合タンパク質とは、2つ以上のタンパク質、場合によっては、2、3、4、5またはそれ以上のタンパク質のコード配列を含む核酸配列によってコードされるポリペプチドを指し、コード配列は、融合構築物が宿主細胞内で転写および翻訳される場合、2つ以上のタンパク質を含むタンパク質が産生されるように、同じリーディングフレーム内にある。2つ以上のタンパク質の各々は、構築物内の別のタンパク質に隣接していてもよいが、または1、2、3個もしくはそれ以上であるが、典型的には20、15、10、9、8、7もしくは6個未満のアミノ酸を含むリンカーポリペプチドによって隔てられていてもよい。融合構築物によってコードされるタンパク質産物は、融合ポリペプチドと呼ばれる。提供される態様による融合タンパク質の例には、免疫グロブリンFcドメインに連結された親和性改変ドメイン（例えば、CRDを含むBCMAのバリエーションまたはその一部）を含むFc融合タンパク質がある。

10

【0166】

用語「半減期延長部分」は、該部分にコンジュゲートされていないタンパク質の半減期と比較して、哺乳動物血清中を循環するタンパク質の半減期を延長する、ポリペプチド融合体または化学コンジュゲートの部分を指す。いくつかの態様では、半減期は、1.2倍超、または約1.2倍、約1.5倍、約2.0倍、約3.0倍、約4.0倍、約5.0倍、または約6.0倍延長される。いくつかの態様では、半減期は、半減期延長部分を有しないタンパク質と比較して、インビボ投与後6時間超、12時間超、24時間超、48時間超、72時間超、96時間超または1週間超延長される。半減期とは、タンパク質がその濃度、量または活性の半分を失うのにかかる時間の量を指す。半減期は、例えば、ELISAアッセイまたは活性アッセイを使用することによって決定され得る。例示的な半減期延長部分には、Fcドメイン、多量体化ドメイン、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、XTEN（伸長組換えペプチド；国際公開公報第2013130683号を参照）、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）、脂質（アシル化）、およびポリ-Pro-Ala-Ser（PAS）、およびポリグルタミン酸（グルタミル化）が含まれる。

20

【0167】

免疫グロブリン分子のFc（結晶性断片）領域またはFc（結晶性断片）ドメイン（Fcポリペプチドとも呼ばれる）は、免疫グロブリン重鎖の定常領域に主に対応し、場合によっては、抗体のエフェクター機能を含む様々な機能を担う。Fcドメインは、免疫グロブリン分子のヒンジドメインの一部または全部と、CH2ドメインおよびCH3ドメインとを含む。場合によっては、提供される融合タンパク質に含めるために、Fcヒンジ配列の全部または一部が欠失していてもよい。Fcドメインは、1つまたは複数のジスルフィド結合によって繋がれた2つのポリペプチド鎖の二量体を形成することができる。いくつかの態様では、Fcは、エフェクター機能を促進するために、低下した（例えば、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上より多く低下した）活性を示すバリエーションFcである。いくつかの態様では、Fc領域内のアミノ酸置換への言及は、特定のSEQUIDNOを基準として記載されていない限り、EUNANBARINGシステムによるものである。EUNANBARINGは、公知であり、最新の更新されたIMGT Scientific Chart（IMGT（登録商標）、international Immunogenetics information system（登録商標）、http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHnber.html（作成:2001年5月17日、最終更新:2013年1月10日）、およびKabat,E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No.91-3242（1991））に報告されているEUインデックスに従う。

30

40

【0168】

免疫調節Fc融合タンパク質などの免疫グロブリンFc融合体（「Fc融合体」）は、免疫グロブリンのFc領域に機能的に連結された1つまたは複数のポリペプチドを含む分子である。Fc融合体は、例えば、提供される免疫調節タンパク質のTIMまたはBIMに機能的に

50

連結されたFc領域を含み得る。Fc融合体は、例えば、提供されるその親和性改変バリエーションのいずれかを含む、CRDを含むBCMA細胞外ドメインまたはその一部に、機能的に連結されたFc領域を含み得る。免疫グロブリンFc領域は、1つまたは複数のポリペプチドに間接的または直接的に連結され得る。様々なリンカーが、当技術分野において公知であり、任意で、Fcを融合パートナーに連結してFc融合体を生成するために使用され得る。同一の種のFc融合体を二量体化して、Fc融合ホモ二量体を形成することができる。同一でない種のFc融合体（例えば、ノブ・イントゥ・ホール操作）を使用して、Fc融合ヘテロ二量体を形成してもよい。いくつかの態様では、Fcは、マウスFcまたはヒトFcなどの哺乳動物Fcである。

【0169】

用語「宿主細胞」は、組換え発現ベクターによってコードされるタンパク質を発現するために使用され得る任意の細胞を指す。宿主細胞は、原核生物、例えば大腸菌（*E. coli*）であり得、または真核生物、例えば単細胞真核生物（例えば、酵母または他の真菌）、植物細胞（例えば、タバコまたはトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞または昆虫細胞）またはハイブリドーマであり得る。宿主細胞の例には、無血清培地中で増殖するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞もしくはその誘導体、例えば、Veggie CHO細胞株および関連細胞株、またはDHFRが欠損したCHO株DX-B11が挙げられる。

【0170】

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

【0171】

本明細書において使用される用語「免疫グロブリン」（「Ig」と略す）は、用語「抗体」（「Ab」と略す）と同義であり、5つのヒトクラス、すなわち、IgA（サブクラスIgA1およびIgA2を含む）、IgD、IgE、IgG（サブクラスIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む）、およびIgMのいずれかを含む哺乳動物免疫グロブリンタンパク質を指す。該用語はまた、抗原結合部位を形成し、構築された際に抗原に特異的に結合するのに十分な、免疫グロブリン分子の可変重（VH）鎖領域および/または可変軽（VL）鎖領域の少なくとも一部を含むその任意の断片を含め、完全にまたは部分的に合成された（例えば、組換えまたは化学合成）か、あるいは天然に産生されたかにかかわらず、完全長未満の免疫グロブリンを含む。抗体はまた、定常領域の全部または一部を含むことができる。そのような断片には、抗原結合断片（Fab）、VHおよびVLを含む可変断片（Fv）、一緒に連結されたVHおよびVLを1つの鎖に含む一本鎖可変断片（scFv）、ならびに他の抗体V領域断片、例えば、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、dsFvダイアボディ、FcおよびFdポリペプチド断片が含まれる。したがって、本明細書における抗体への言及は、完全長抗体および抗原結合断片を含むことが理解される。抗体という用語はまた、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、ダイアボディおよび一本鎖分子を含む。二重特異性抗体、ホモ二重特異性およびヘテロ二重特異性は、該用語の意味の範囲内に含まれる。抗体には、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が含まれる。抗体には、合成抗体または組換え産生された抗体も含まれる。様々なクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6を参照されたい。

【0172】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」または「全抗体」は、抗体断片とは対照的に、実質的にインタクトな形態の抗体を指すために区別なく使用される。完全長抗体は、典型的には2つの完全長重鎖（例えば、VH-CH1-CH2-CH3またはVH-CH1-CH2-CH3-

10

20

30

40

50

CH4) と、2つの完全長軽鎖 (VL-CL) と、ヒンジ領域とを有する抗体、例えば、抗体を分泌するB細胞によって哺乳動物種 (例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類など) から産生される抗体、および合成的に産生される同じドメインを有する抗体である。具体的には、全抗体には、Fc領域を含む重鎖および軽鎖を有するものが含まれる。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン (例えばヒト天然配列定常ドメイン) またはそのアミノ酸配列バリエーションであり得る。場合によっては、インタクトな抗体は、1つまたは複数のエフェクター機能を有し得る。

【0173】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、インタクトな抗体の抗原結合領域および/または可変領域を含む。抗体断片には、限定されることなく、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fv断片、ジスルフィド結合Fv (dsFv)、Fd断片、Fd'断片;ダイアボディ;直鎖状抗体 (米国特許第5,641,870号、実施例2;Zapata et al., Protein Eng. 8 (10):1057-1062 [1995] を参照);一本鎖Fv (scFv) または一本鎖Fab (scFab) を含む一本鎖抗体分子;上記のいずれかの抗原結合断片、および抗体断片由来の多重特異性抗体が含まれる。

【0174】

「Fv」は、非共有結合によって連結された1つの重鎖可変領域ドメインおよび1つの軽鎖可変領域ドメインから構成される。これらの2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの相補性決定領域 (CDR) (重鎖および軽鎖のそれぞれに3つ) が生じる。ただし、単一の可変ドメイン (または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分) であっても、場合によっては結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識し、抗原に結合する能力を有する。

【0175】

「dsFv」は、V_H-V_L対を安定化する操作された分子間ジスルフィド結合を有するFvを指す。

【0176】

「Fd断片」は、抗体重鎖の可変ドメイン (V_H) および1つの定常領域ドメイン (C_H1) を含む、抗体の断片である。

【0177】

「Fab断片」は、パパイニンによる完全長免疫グロブリンの消化から生じる抗体断片、または例えば組換え法によって合成的に産生される同じ構造を有する断片である。Fab断片は、軽鎖 (V_LおよびC_Lを含む) と、重鎖の可変ドメイン (V_H) および重鎖の1つの定常領域ドメイン (C_H1) を含む別の鎖とを含む。

【0178】

「F(ab')₂断片」は、pH4.0~4.5のペプシンによる免疫グロブリンの消化から生じる抗体断片、または例えば組換え法によって合成的に産生される同じ構造を有する断片である。F(ab')₂断片は、各重鎖部分が、2つの断片を繋げるジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含む追加の数個のアミノ酸を含む2つのFab断片を本質的に含む。

【0179】

「Fab'断片」は、F(ab')₂断片の半分 (1つの重鎖および1つの軽鎖) を含む断片である。

【0180】

「Fd'断片」は、F(ab')₂断片の1つの重鎖部分を含む、抗体の断片である。

【0181】

「Fv'断片」は、抗体分子のV_HドメインおよびV_Lドメインのみを含む断片である。

【0182】

「scFv断片」は、任意の順序でポリペプチドリンカーによって共有結合された可変軽鎖 (V_L) および可変重鎖 (V_H) を含む抗体断片を指す。リンカーは、2つの可変ドメインが実質的に干渉されず架橋されるような長さである。例示的なリンカーには、溶解度を

10

20

30

40

50

高めるために全体に分散したいくつかのGlu残基またはLys残基を有する (Gly-Ser)_n 残基がある。

【0183】

「ダイアボディ」は二量体scFvである。ダイアボディは、典型的には、scFvよりも短いペプチドリンカーを有し、優先的に二量体化する。

【0184】

本明細書において使用される用語「免疫グロブリンスーパーファミリー」または「IgSF」は、細胞の認識、結合または接着プロセスに関与する細胞表面タンパク質および可溶性タンパク質の群を意味する。分子は、免疫グロブリン（すなわち抗体）との共有構造的な特徴に基づいて、このスーパーファミリーのメンバーとして分類される。それらはいずれも、免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリンフォールドとして公知のドメインを有する。多くの「非抗体IgSF」メンバーには、抗体ではない細胞表面タンパク質または受容体が含まれる。IgSFのメンバーには、細胞表面抗原受容体、免疫系の共受容体および共刺激分子、リンパ球への抗原提示に関与する分子、細胞接着分子、ある特定のサイトカイン受容体、ならびに細胞内筋タンパク質が含まれる。それらは、一般に、免疫系内での役割に関連する。免疫シナプス内のタンパク質は、多くの場合IgSFのメンバーである。IgSFは、機能などの共有特性に基づいて「サブファミリー」に分類することもできる。そのようなサブファミリーは、典型的には、4〜30個のIgSFメンバーを含む。

【0185】

本明細書において使用される用語「IgSFドメイン」または「免疫グロブリンドメイン」または「Igドメイン」または「IgD」は、IgSFタンパク質の単数または複数の構造ドメインを指す。Igドメインは、免疫グロブリン分子に由来して名付けられている。それらは、約70〜110個のアミノ酸を含み、それらのサイズおよび機能に従って分類される。Igドメインは、逆平行ベータストランドの2つのシートによって形成されるサンドイッチ様構造を有する特徴的なIgフォールドを有する。サンドイッチの内側の疎水性アミノ酸と、BストランドおよびFストランドのシステイン残基間に形成された高度に保存されたジスルフィド結合との間の相互作用は、Igフォールドを安定化する。場合によっては、Igドメインの一端は、いくつかの局面では、それらのリガンドに対する抗体の特異性に関与する相補性決定領域と呼ばれる部分を有する。Ig様ドメインは、IgV、IgC1、IgC2またはIgIとして（クラスに）分類することができる。ほとんどのIgドメインは、可変（IgV）または定常（IgC）のいずれかである。9つのベータストランドを有するIgVドメインは、一般に、7つのベータストランドを有するIgCドメインよりも長い。IgSFのいくつかのメンバーのIgドメインは、アミノ酸配列ではIgVドメインに類似しているが、サイズではIgCドメインに類似している。これらはIgC2ドメインと呼ばれ、標準的なIgCドメインはIgC1ドメインと呼ばれる。T細胞受容体（TCR）鎖は、細胞外部分に2つのIgドメイン、すなわち、N末端に1つのIgVドメイン、および細胞膜に隣接する1つのIgC1ドメインを含む。「非抗体IgSFドメイン」は、抗体以外のタンパク質内に存在する、典型的には、ある特定の細胞表面タンパク質の細胞外部分または細胞外ドメイン内に存在する単数または複数のIgSFドメインを指す。したがって、IgSFファミリーメンバーの細胞外ドメイン（ECD）は、1つまたは複数のIgドメインを含む。このため、Igドメインという用語は、そのようなタンパク質分子のECDに関しても使用される。バリエーションIgSFドメイン（vIgD）への言及は、IgDのバリエーションまたは改変された配列を指す。

【0186】

本明細書において使用される用語「免疫学的活性」は、T細胞またはB細胞などの免疫細胞の1つまたは複数の活性、例えば、活性化、細胞生存、細胞増殖、サイトカイン産生（例えばインターフェロン-ガンマ）、細胞傷害活性、または免疫細胞内でNF-κB経路、もしくは転写因子の活性化をもたらす他のシグナル伝達カスケードを活性化する能力などを指す。免疫調節タンパク質の免疫学的活性を評価するためのアッセイは、公知の活性を有する対照タンパク質と比較され得る。

【0187】

10

20

30

40

50

「免疫調節タンパク質」または「免疫調節ポリペプチド」は、免疫学的活性を調節するタンパク質である。免疫応答の「調節」、または免疫応答を「調節する」とは、免疫学的活性が増強または抑制されることを意味する。そのような調節には、B細胞もしくはT細胞などの免疫細胞の免疫学的活性の任意の誘導、またはB細胞もしくはT細胞などの免疫細胞の免疫学的活性の度合いもしくは程度の変化、またはB細胞もしくはT細胞などの免疫細胞の免疫学的活性の抑制が含まれる。例えば、本明細書における可溶性Fc融合タンパク質は、B細胞、T細胞、またはB細胞およびT細胞の両方の免疫学的活性を抑制し得る。免疫調節タンパク質は、単一ポリペプチド鎖、または例えば鎖間ジスルフィド結合によって互いに共有結合された少なくとも2つのポリペプチド鎖の多量体（二量体または高次多量体）であり得る。したがって、単量体タンパク質、二量体タンパク質および高次多量体タンパク質は、この定義される用語の範囲内である。多量体タンパク質は、（同一のポリペプチド鎖の）ホモ多量体または（異なるポリペプチド鎖の）ヘテロ多量体であり得る。

10

【0188】

本明細書において使用される場合、改変は、ポリペプチドのアミノ酸配列または核酸分子内のヌクレオチド配列の改変に関するものであり、それぞれ配列のアミノ酸またはヌクレオチドの変化を含む。アミノ酸の改変または変化は、それぞれアミノ酸またはヌクレオチドの欠失、挿入または置換（replacement）（置換（substitution））であり得る。ポリペプチドを改変する方法は、例えば、組換えDNA法を使用することによるなど、当業者には常用的である。

20

【0189】

用語「多量体化ドメイン」は、2つ以上のポリペプチドの多量体の形成を促進するアミノ酸配列を指す。多量体化ドメインは、同じまたは異なる多量体化ドメインであり得る相補的多量体化ドメイン（例えば、第1の多量体化ドメインおよび第2の多量体化ドメイン）をそれぞれ含む、ポリペプチド分子と1つまたは複数の追加のポリペプチド分子との安定な相互作用を促進する配列を含む。相補的多量体化ドメイン間の相互作用、例えば、第1の多量体化ドメインと第2の多量体化ドメインとの間の相互作用は、安定なタンパク質-タンパク質相互作用を形成して、ポリペプチド分子と追加のポリペプチド分子との多量体を生成する。場合によっては、多量体化ドメインは、同じであり、それ自体と相互作用して、2つのポリペプチド鎖間に安定なタンパク質-タンパク質相互作用を形成する。一般に、ポリペプチドは、多量体化ドメインに直接的または間接的に繋がられる。例示的な多量体化ドメインには、免疫グロブリン配列またはその一部、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域、および適合性のあるタンパク質-タンパク質相互作用ドメインが含まれる。多量体化ドメインは、例えば、免疫グロブリン定常領域またはドメイン、例えば、IgG1サブタイプ、IgG2サブタイプ、IgG3サブタイプまたはIgG4サブタイプを含むIgG由来のFcドメインまたはその一部、IgA、IgE、IgDおよびIgMならびにその改変形態などであり得る。

30

【0190】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、一本鎖形態または二本鎖形態のいずれかの核酸残基（例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド）のポリマーを指すために区別なく使用される。具体的に限定されない限り、該用語は、天然ヌクレオチドの公知の類似体を含み、天然ヌクレオチドと同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される核酸を包含する。別段の指定がない限り、特定の核酸配列は、その保存的に改変されたバリエーション（例えば縮重コドン置換）および相補的ヌクレオチド配列、ならびに明示的に示された配列も暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（または全部の）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基によって置換された配列を生成することによって達成され得る。核酸またはポリヌクレオチドという用語は、遺伝子によってコードされるcDNAまたはmRNAを包含する。

40

【0191】

50

本明細書において使用される用語「機能的な組合せで」、「機能的な順序で」および「機能的に連結された」は、セグメントが、意図された目的のために協調して機能するように配置されるような様式または向きでの核酸配列の連結を指す。いくつかの態様では、該用語は、所与の遺伝子の転写を導くことができる核酸分子を産生するため、および/または機能的な所望のタンパク質分子を産生するための核酸の連結を指す。例えば、DNA配列のセグメント、例えば、コード配列および調節配列は、適切な分子（例えば転写活性化タンパク質）が調節配列に結合した際に遺伝子発現を可能にするように連結される。

【0192】

用語「薬学的組成物」は、哺乳動物対象、多くの場合ヒトに対する薬学的使用に適した組成物を指す。薬学的組成物は、典型的には、有効量の活性作用物質（例えば免疫調節タンパク質）と、担体、賦形剤または希釈剤と、を含む。担体、賦形剤または希釈剤は、典型的には、それぞれ薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤である。

10

【0193】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において区別なく使用され、ペプチド結合を介して連結された2つ以上のアミノ酸の分子鎖を指す。該用語は、生成物の特定の長さを指すものではない。したがって、「ペプチド」および「オリゴペプチド」は、ポリペプチドの定義内に含まれる。該用語は、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。該用語はまた、1つもしくは複数のアミノ酸類似体、または非カノニカルアミノ酸もしくは非天然アミノ酸が、合成され得るように含まれるか、または公知のタンパク質操作技術を使用して組換え発現される分子を含む。さらに、タンパク質は、周知の有機化学技術によって、本明細書において記載されるように誘導体化され得る。

20

【0194】

例えば、免疫調節タンパク質をコードする核酸、またはタンパク質（例えば免疫調節タンパク質）に適用される用語「精製された」は、一般に、当技術分野において周知の分析技術によって決定される場合、他の成分を実質的に含まない核酸またはポリペプチドを示す（例えば、精製されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、電気泳動ゲル、クロマトグラフィー溶出液、および/または密度勾配遠心分離に供された媒体中で個別のバンドを形成する）。例えば、電気泳動ゲル中に本質的に1つのバンドを生じさせる核酸またはポリペプチドは「精製されている」。精製された核酸またはタンパク質は、少なくとも約50%純粋であり、通常、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、99%またはそれ以上純粋である（例えば、重量パーセントまたはモルベース）。

30

【0195】

用語「組換え」は、材料（例えば、核酸またはポリペプチド）が人間の介入によって人工的に（すなわち、非天然に）変更されることを示す。変更は、その天然の環境もしくは状態内の材料に対して行われ得るか、またはその天然の環境もしくは状態から除去され得る。例えば、「組換え核酸」は、例えば、クローニング、親和性改変、DNAシャッフリングまたは他の周知の分子生物学的手順の最中に核酸を組み換えることによって作製されるものである。「組換えDNA分子」は、そのような分子生物学的技术によって互いに繋がられたDNAのセグメントから構成される。本明細書において使用される用語「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」は、組換えDNA分子を使用して発現されるタンパク質分子（例えば免疫調節タンパク質）を指す。「組換え宿主細胞」は、組換え核酸を含むかつ/もしくは組換え核酸を発現するか、または本明細書において提供される免疫調節タンパク質などの組換えタンパク質をコードする核酸分子を細胞に導入することなどによって遺伝子操作によって変更されている細胞である。真核生物では、転写制御シグナルは、「プロモーター」エレメントおよび「エンハンサー」エレメントを含む。プロモーターおよびエンハンサーは、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用するDNA配列の短いアレイからなる。プロモーターエレメントおよびエンハンサーエレメントは、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞ならびにウイルス内の遺伝子を含む様々な真核生物源から単離されている（原核生物では、類似の制御エレメント、すなわちプロモ-

40

50

ターも見られる)。特定のプロモーターおよびエンハンサーの選択は、関心対象のタンパク質を発現するためにどの細胞型が使用されるかに依存する。

【0196】

本明細書において使用される用語「組換え発現ベクター」は、所望のコード配列（例えば、免疫調節タンパク質をコードする）と、特定の細胞内での機能的に連結されたコード配列の発現に必要な適切な核酸配列と、を含む、DNA分子を指す。原核生物では、発現に必要な核酸配列には、プロモーター、任意でオペレーター配列、リボソーム結合部位、および任意で他の配列が含まれる。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、ならびに終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルを利用することが公知である。分泌シグナルペプチド配列はまた、例えば、所望であれば、分泌可能なタンパク質としてのその発現のために、または細胞からの免疫調節タンパク質のさらに容易な単離もしくは精製のために、発現されたタンパク質が組換え宿主細胞によって分泌され得るように、任意で組換え発現ベクターによってコードされ、コード配列に機能的に連結され得る。該用語には、自己複製する核酸構造物としてのベクター、同様にまた、導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクターが含まれる。ベクターの中には、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターがある。

10

【0197】

本明細書において使用される用語「配列同一性」は、それぞれヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの遺伝子間またはタンパク質間の配列同一性を指す。「配列同一性」は、アミノ酸レベルではタンパク質間の同一性の尺度、およびヌクレオチドレベルでは核酸間の同一性の尺度である。タンパク質配列同一性は、配列がアライメントされた際に各配列内の所与の位置のアミノ酸配列を比較することによって決定され得る。同様に、核酸配列同一性は、配列がアライメントされた際に各配列内の所与の位置のヌクレオチド配列を比較することによって決定され得る。比較のための配列のアライメントのための方法は当技術分野において周知であり、そのような方法には、GAP、BESTFIT、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェア、FASTAおよびTFASTAが含まれる。BLASTアルゴリズムは、パーセント配列同一性を計算し、2つの配列間の類似性の統計分析を行う。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）ウェブサイトを通じて公的に入手可能である。場合によっては、パーセント配列同一性は、配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入して最大のパーセント配列同一性を達成した後、参照配列内のアミノ酸残基（またはヌクレオチド残基）と同一である候補配列内のアミノ酸残基（またはヌクレオチド残基）のパーセンテージとして決定され得る。配列同一性への言及は、比較される配列の各々の全長にわたる配列同一性を含む。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大アライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするための適切なパラメータを決定することができる。

20

30

【0198】

タンパク質に関して本明細書において使用される用語「可溶性」は、タンパク質が膜タンパク質ではない、または細胞膜に固定されていないことを意味する。タンパク質は、細胞外ドメインまたはその一部のみを含み、膜貫通ドメインを含まないことによって、可溶性タンパク質として構築され得る。場合によっては、タンパク質の溶解度は、Fcドメインまたは他の半減期延長分子への、直接的なまたはリンカーを介した間接的な、連結または結合によって改善され得、これにより、場合によってはタンパク質の安定性および/または半減期も改善され得る。いくつかの局面では、可溶性タンパク質はFc融合タンパク質である。

40

【0199】

本明細書において使用される用語「特異的に結合する」は、特異的結合条件下で、その親和性またはアビディティが、十分な統計的サイズのランダムペプチドまたはポリペプチドの集合体に対する同じタンパク質の平均親和性または平均アビディティの少なくとも10倍であるが、任意で50、100、250もしくは500倍、または少なくとも1000倍で

50

さえあるように、タンパク質が標的タンパク質に結合する能力を意味する。特異的に結合するタンパク質は、単一の標的分子に排他的に結合する必要はなく、複数の標的分子に特異的に結合してもよい。場合によっては、特異的に結合するタンパク質は、標的タンパク質と構造的立体配座が類似しているタンパク質（例えば、パラログまたはオルソログ）に結合し得る。当業者であれば、異なる動物種では同じ機能を有する分子（すなわちオルソログ）への、または標的分子と実質的に同様のエピトープを有する分子（例えばパラログ）への特異的結合が可能であり、固有の非標的の統計的に有効な集合体（例えばランダムポリペプチド）と比較して決定される結合の特異性を損なわないことを認識するであろう。したがって、本発明の免疫調節タンパク質またはそのBIMもしくはTIMは、交差反応性のために、複数の異なる種の標的分子に特異的に結合し得る。固相ELISAイムノアッセイ、ForteBio OctetまたはBiacoreの測定値を使用して、2つのタンパク質間の特異的結合を決定することができる。一般に、2つの結合タンパク質間の相互作用は、約 1×10^{-5} M未満、多くの場合約 1×10^{-12} Mという低さの解離定数（Kd）を有する。本開示のある特定の局面では、2つの結合タンパク質間の相互作用は、約 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} Mもしくは 1×10^{-11} Mまたはそれ以下を下回る解離定数を有する。

10

20

30

40

50

【0200】

タンパク質に関して本明細書において使用される用語「特異的結合断片」または「断片」は、完全長タンパク質またはその特異的なドメインもしくは領域よりも短く、完全長タンパク質または特異的なドメインもしくは領域の結合パートナーに、インビトロおよび/またはインビボで特異的に結合するポリペプチドを意味する。特異的結合断片は、ポリペプチドの完全長細胞外ドメインまたはポリペプチドの結合ドメインの断片に関するものであるが、依然として結合ドメインの結合パートナーに結合する。例えば、特異的結合断片は、IgSFファミリーメンバーの完全長細胞外ドメインまたはその完全長IgSFドメイン（例えば、IgVまたはIgC）の断片に関するものであるが、IgSFファミリーメンバーの結合パートナー、またはIgSFファミリーメンバーのIgSFドメインの結合パートナーに依然として結合する。別の例では、特異的結合断片は、完全長TNFRファミリーメンバーの細胞外ドメインまたはその完全長TNFRドメイン（TD）（例えばCRD）の断片に関するものであるが、TNFRファミリーメンバーの結合パートナー、またはTNFRファミリーメンバーのCRDの結合パートナーに依然として結合する。いくつかの態様では、特異的結合断片は、細胞外ドメインの完全長配列、または細胞外ドメインのドメインもしくは領域の少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列長である。いくつかの態様では、特異的結合断片は、少なくとも50アミノ酸、例えば、少なくとも60、70、80、90、100または110アミノ酸のアミノ酸長を有することができる。

【0201】

本明細書において使用する場合、「対象」は、ヒトまたは他の動物などの哺乳動物であり、典型的にはヒトである。対象は、男性または女性であり得、乳児、若年、青年、成人および老人の対象を含む任意の好適な年齢であり得る。

【0202】

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

【0203】

本明細書において使用される用語「TNF受容体スーパーファミリー」または「TNFRSF」は、それらの細胞外ドメインに1~6個のシステインリッチドメイン（CRD）を含む、いずれもI型（N末端細胞外）膜貫通糖タンパク質である細胞表面サイトカイン受容体の群を意味する。分子は、同族結合パートナーまたは同族リガンドのタンパク質結合に何らかの役割を果たすことが多い、それらのN末端細胞外領域に存在する1つまたは複数のシステインリッチドメイン（CRD）を含む共有構造的特徴に基づいて、このスーパーフ

ファミリーのメンバーとして分類される。TNFRSFタンパク質は、1つのみ、またはいくつかのCRD（例えば、CRD1、CRD2など）を有し得る。典型的には、TNFRSFメンバーのECDまたはエクトドメインは、CRDの1～6回の擬似反復を含む。例えば、BAFF受容体およびBCMAは、それぞれ1つのCRDを含むのに対して、TACIは、2つのCRD（CRD1およびCRD2）を含む。TNFRSFメンバーは、通常、それらのシステイン間ジスルフィド結合によって安定化される三量体複合体または多量体複合体である。TNFRSFタンパク質がそれらのリガンドに結合すると、細胞内の様々な生物学的活性、例えば、アポトーシス細胞死または細胞生存および増殖の誘導が促進される。

【0204】

用語「TD」は、TNFRSFタンパク質またはTNFファミリーリガンドの単数または複数の構造ドメインを指す。例えば、TNFRSFタンパク質のTDは、6つの保存されたシステインを含む約40アミノ酸のシステインリッチドメイン（CRD）モジュールである。したがって、CRDへの言及はまた、TNFRSFタンパク質のTDに関して、TDという用語と区別なく使用され得る。6つのシステインは、鎖内ジスルフィド結合の形成に参与する。TNFRSFメンバーの細胞外ドメイン（ECD）は、1つまたは複数のCRDドメインを含む。したがって、TDという用語は、そのようなタンパク質分子のECDに関しても使用される。バリエーションTD（vTD）への言及は、TDのバリエーションまたは改変された配列を指す。

【0205】

用語「T細胞阻害分子」またはTIMは、T細胞刺激受容体の活性に拮抗するまたはそれを遮断するタンパク質分子を指す。TIMは、T細胞刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに直接結合することによってT細胞刺激受容体の活性に拮抗し、それによって、リガンドとT細胞刺激受容体との間の結合を遮断するかまたは減少させることができる。例えば、TIMは、CD28などのT細胞共刺激受容体の活性に拮抗するかまたはそれを阻害する。特定の態様では、本明細書において提供されるTIMは、T細胞刺激受容体の同族リガンドの免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメイン、例えばIgVドメインを含む細胞外ドメインまたはその一部を含む。例えば、TIMは、CTLA-4の細胞外ドメイン、またはT細胞刺激受容体（例えばCD28）に結合するIgSFドメイン（例えばIgVドメイン）を含む、CTLA-4の細胞外ドメインの一部を含む。TIMはまた、T細胞刺激受容体（例えばCD28）に対する結合親和性を増加させる、IgSFドメインにもう1つのアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を有する、T細胞刺激受容体、例えばCTLA-4の同族リガンドの細胞外ドメインまたはその一部の親和性改変バリエーションを含み得る。

【0206】

本明細書において使用される場合、「T細胞刺激受容体」は、T細胞上に発現される細胞表面分子であって、該分子の関与またはライゲーションが、細胞内の1つもしくは複数のチロシンキナーゼの直接的もしくは間接的な活性化をもたらす、および/またはそれが発現されるT細胞の1つもしくは複数のエフェクター細胞機能の誘導もしくは増強に至る細胞表面分子を指す。T細胞刺激受容体は、一般に、細胞外部分、膜貫通ドメインおよび細胞質領域を含む。いくつかの態様では、細胞質領域は、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM;配列YXX(L/I)X6-8YXX(L/I)によって定義される）を含むか、またはそうでなければ、シグナル伝達経路内のチロシンリン酸化に参与するかもしれないか、または調節する1つもしくは複数のアクセサリタンパク質、例えば、1つもしくは複数のアダプタータンパク質と相互作用するかもしれないか、または会合することができる細胞内シグナル伝達ドメインを含む。場合によっては、T細胞刺激受容体は、ITAMを含むアダプタータンパク質、またはシグナル伝達経路内のタンパク質内の特定のアミノ酸配列、例えばホスホチロシン残基に結合する1つもしくは複数のタンパク質結合ドメイン、例えば、Src相同性2（SH2）およびSH3ドメインを含むアダプタータンパク質と相互作用するかまたは会合する。アダプタータンパク質の例には、限定されることなく、Lck、Fyn、ZAP70、SLP76、PI3K、Grb2、PKCθおよびSHC1が挙げられる。したがって、T細胞刺激受容体自体が固有の酵素活性を有する必要はなく、アクセサリタンパク質またはアダプタータンパク質を介して間接的に酵素活性を媒介し得ることが理解される。典型的には、T細胞刺激

10

20

30

40

50

受容体の関与は、T細胞の活性化を開始するか、媒介するか、または増強し、細胞増殖、細胞溶解活性、サイトカイン産生もしくは分泌、または受容体もしくは接着分子などの細胞表面分子の発現を含む、T細胞における測定可能な形態学的、表現型および/または機能的変化をもたらす。いくつかの態様では、T細胞刺激受容体には、T細胞受容体（TCR）、CD3、CD4、CD8、CD28、ICOSまたはCD2が含まれる。例えば、T細胞刺激受容体は、CD28などの共刺激受容体である。

【0207】

細胞表面分子への結合に関して、用語「トランス」は、それぞれが異なる細胞の表面に存在する2つの異なる細胞表面分子への結合を指す。いくつかの態様では、トランスとは、2つの異なる細胞表面分子に関して、第1のものがISを形成する2つの哺乳動物細胞の一方の上に排他的に存在し、第2のものがISを形成する2つの哺乳動物細胞の他方の上に排他的に存在することを意味する。

【0208】

本明細書において使用される用語「膜貫通タンパク質」は、哺乳動物細胞などの生体膜、またはリボソームなどの人工構築物に見られる脂質二重層などの脂質二重層を、実質的にまたは完全に貫いている膜タンパク質を意味する。膜貫通タンパク質は、脂質二重層に膜貫通タンパク質を組み込み、この組み込みを生理学的条件下で熱力学的に安定にする、膜貫通ドメイン（「膜貫通ドメイン」）を含む。膜貫通ドメインは、一般に、水性環境（例えば、細胞質ゾル、細胞外液）と相互作用する、タンパク質の領域と比較して、疎水性が高いことに基づいて、任意の数の市販のバイオインフォマティクスソフトウェアアプリケーションを介してそのアミノ酸配列から予測可能である。膜貫通ドメインは、多くの場合、膜を貫く疎水性 α ヘリックスである。膜貫通タンパク質は、脂質二重層の両層を1回または複数回貫通することができる。

【0209】

本明細書において使用される場合、疾患、状態もしくは障害を「処置する（treating）」、疾患、状態もしくは障害の「処置（treatment）」または「療法」という用語は、臨床的または診断的な症状のいずれかの減少、停止または排除によって証明されるように、免疫調節タンパク質、または本発明の操作された細胞を単独でまたは本明細書において記載される別の化合物と組合わせて投与することによって、疾患または障害の進行を遅らせる、停止させるまたは逆転させることを意味する。「処置する（treating）」、「処置（treatment）」または「療法」はまた、急性もしくは慢性の疾患、状態もしくは障害における症状の重症度の減少、または例えば再発もしくは寛解する自己免疫疾患の経過もしくは炎症状態の場合のような再発率の減少、または自己免疫疾患もしくは炎症状態の炎症性の局面の場合の炎症の減少を意味する。本発明の文脈で使用される疾患または障害を「予防する（preventing）」、疾患または障害の「予防（prophylaxis）」または「予防（prevention）」は、疾患もしくは障害、もしくは疾患、状態もしくは障害の症状の一部もしくは全部の発生もしくは発症を予防するために、または疾患、状態もしくは障害の発症の可能性を低下させるために、単独でまたは別の化合物と組合わせて免疫調節タンパク質を投与することを指す。

【0210】

バリエーションタンパク質またはバリエーションポリペプチドに関して使用される用語「バリエーション」（また、区別なく使用され得る「改変された」または「変異」）は、人間の介入によって作製された、哺乳動物（例えば、ヒトまたはマウス）タンパク質などのタンパク質を意味する。バリエーションは、非改変タンパク質もしくは野生型タンパク質またはそのドメインと比較して、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、付加またはそれらの組合せなどによって、変更または改変されたアミノ酸配列を有するポリペプチドである。バリエーションポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれ以上のアミノ酸の相違、例えばアミノ酸置換を含み得る。バリエーションポリペプチドは、一般に、野生型タンパク質または非改変タンパク質の対応する形態、例えば、細胞外ドメインま

たはその結合ドメインを含むその成熟配列（シグナル配列を欠く）またはその一部に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示す。天然に存在しないアミノ酸および天然に存在するアミノ酸が、許容される置換または付加の範囲内に含まれる。バリエーションタンパク質は、いかなる特定の作製方法にも限定されず、例えば、化学合成、組換えDNA技術またはそれらの組合せを含む。本発明のバリエーションタンパク質は、少なくとも1つまたは複数の結合パートナーに特異的に結合する。いくつかの態様では、変更されたアミノ酸配列は、1つまたは複数の結合パートナーに対する変更された（すなわち、増加または減少した）結合活性、例えば、結合親和性または結合アビディティをもたらす。したがって、バリエーションタンパク質は、本明細書において記載される「親和性改変」タンパク質であり得る。

10

【0211】

本明細書において使用される場合、区別なく使用される用語「野生型」または「天然（natural）」または「天然（native）」は、例えば、天然に見出され、人間の介入によって改変されていない核酸分子、タンパク質、宿主細胞などの生物学的材料に関連して使用される。

【0212】

II. BCMA免疫調節タンパク質およびバリエーションBCMAポリペプチド

少なくとも1つのBCMA同族結合パートナーに結合する、BCMA受容体の細胞外ドメイン（ECD）の一部またはそのバリエーションを含む、BCMA免疫調節タンパク質が、本明細書において提供される。BCMA同族結合パートナーのうちの1つまたは複数に対して変更された（例えば増加した）結合活性または結合親和性を示すバリエーションBCMAポリペプチドも本明細書において提供される。いくつかの態様では、BCMA同族結合パートナーは、BAFFまたはAPRILのうちの1つもしくは複数であるか、またはBAFF/APRILヘテロ三量体である。提供されるBCMA免疫調節タンパク質およびBCMA免疫調節ポリペプチドには、細胞外ドメインまたはそのバリエーションのBCMA部分が、別の部分、例えば、免疫グロブリンFcまたは他の多量体化ドメインもしくは半減期延長部分に連結されているその可溶性融合タンパク質が含まれる。したがって、いくつかの態様では、免疫調節タンパク質はBCMA-Fc融合タンパク質である。いくつかの態様では、（1）少なくとも1つのBCMA同族結合パートナーに結合する、BCMA受容体の細胞外ドメインもしくはその一部から構成されるBCMAポリペプチドまたはそのバリエーションBCMAポリペプチドと、（2）Fcドメインと、を含む、BCMA-Fc融合タンパク質が提供される。BCMAポリペプチドまたはバリエーションBCMAポリペプチドは、Fcドメインに直接的または間接的に（例えば、ペプチドリンカーを介して）連結され得る。

20

30

【0213】

BCMAは、システインリッチ擬似反復ドメイン（CRD）を含む細胞外ドメイン（ECD）を有することを特徴とする腫瘍壊死因子受容体ファミリーメンバーである。BCMAは、単一のCRDを含む細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、TRAFシグナル伝達分子に結合するためのTRAF結合部位を含む細胞質ドメインとを有する膜結合受容体である。BCMAは、同族リガンドAPRILおよびBAFFに結合するが、BAFFへの結合の方が親和性が弱い。BCMAは、BAFFとその他の同族受容体BAFF-RおよびTACIとの結合よりも2〜3桁弱い結合でBAFFに結合することが報告されている（Bossen and Schneider et al. 2006 Seminars in Immunology, 18:263-75）。

40

【0214】

完全長BCMAのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:667に記載されている。該タンパク質は、II型膜タンパク質であり、シグナルペプチドを欠く。真核細胞内での発現後、N末端メチオニンが除去される。いくつかの態様では、成熟BCMAタンパク質は、SEQ ID NO:667に記載のN末端メチオニンを含まない。BCMAの細胞外ドメイン（SEQ ID NO:667のアミノ酸残基1〜54; SEQ ID NO:710に記載のECD）は、APRILへの結合に対する親和性と、それよりも少ない程度にBAFFへの結合に対する親和性を示す、1つのシス

50

テインリッチドメイン（CRD、以下、腫瘍壊死ファミリー受容体ドメインまたはTDとも呼ばれる）を含む。CRDは、SEQ ID NO:710に記載の配列のアミノ酸残基7～41を含む。

【0215】

いくつかの態様では、本明細書において提供されるバリエーションBCMAポリペプチドは、参照BCMAポリペプチド、例えば、CRD（以下、TDとも呼ばれる）を含む野生型BCMAポリペプチドまたは非改変BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン内の1つまたは複数の置換（substitution）（あるいは、「変異」または「置換（replacement）」）、欠失または付加などの1つまたは複数のアミノ酸改変を含む。したがって、提供されるバリエーションBCMAポリペプチドは、1つもしくは複数のアミノ酸改変（例えば置換）がCRDにあるバリエーションTD（「vTD」）であるか、またはそれを含む。

10

【0216】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列は、野生型BCMA配列であるか、またはCRDを含むその一部である。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMAは、BCMAの細胞外ドメイン（ECD）、もしくはCRDを含むその一部であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、CRDもしくはその特異的結合断片を含むか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAは、可溶性ポリペプチドであり、膜貫通ドメインを欠く。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、膜貫通ドメイン、および場合によっては細胞質ドメインもさらに含む。

20

【0217】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列は、哺乳動物BCMA配列である。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列は、限定されることなく、ヒト、マウス、カンクイザルまたはラットを含む哺乳動物BCMAであり得る。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列はヒトである。例示的なヒトBCMA配列の細胞外ドメインは、SEQ ID NO:710に記載されている。

【0218】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列は、(i) SEQ ID NO:710に記載のアミノ酸配列、もしくはN末端メチオニンを欠くその配列；(ii) SEQ ID NO:710に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRILもしくはBAFFに結合するアミノ酸配列、を有するか；または(iii)は、CRDを含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分がAPRILもしくはBAFFに結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列は、SEQ ID NO:710に記載のN末端メチオニンを欠く。

30

BCMA細胞外ドメイン（ECD）:SEQ ID NO:710
MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

【0219】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列は、SEQ ID NO:710に記載のN末端メチオニンを欠く。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）BCMA配列は、(i) SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRILもしくはBAFFに結合するアミノ酸配列、を有するか；または(iii)は、CRDを含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分がAPRILもしくはBAFFに結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。

40

BCMA細胞外ドメイン（ECD）:SEQ ID NO:356
LQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

50

【0220】

提供されるBCMAポリペプチドの中には、バリエーションBCMAポリペプチドがある。提供されるバリエーションBCMAポリペプチドを含む免疫調節タンパク質、例えばBCMA-Fc融合タンパク質も提供される。提供される態様のいずれかのいくつかでは、バリエーションBCMA配列は、参照（例えば非改変）BCMA配列の配列、例えば上記のいずれかを有するが、もう1つのアミノ酸改変、例えば、1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む。特に、バリエーションBCMAポリペプチドが、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチドと比較して、APRILまたはBAFFの一方または両方に対して変更された（例えば、増加した）結合活性または結合親和性を示すように、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチドのTDドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含む少なくとも1つの親和性改変TDドメイン（CRD）またはその特異的結合断片を含むバリエーションBCMAポリペプチドが、本明細書において提供される。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、例えば、固相ELISAイムノアッセイ、フローサイトメトリーまたはBiacoreアッセイによって決定される場合、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチド対照配列の結合親和性とは異なる、APRILおよび/またはBAFFに対する結合親和性を有する。同族結合パートナーの各々に対する結合親和性は独立している。すなわち、いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性と、APRILまたはBAFFの他方に対して低下したまたは変化しない結合親和性を有する。

10

20

【0221】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照（非改変または野生型）BCMAポリペプチドと比較して、BAFFに対して増加した結合親和性を有する。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照（非改変または野生型）BCMAポリペプチドと比較して、APRILに対して増加した結合親和性を有する。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、参照（非改変または野生型）BCMAポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和性を有する。同族リガンドBAFFおよび/またはAPRILは、哺乳動物タンパク質、例えば、ヒトタンパク質またはマウスタンパク質であり得る。いくつかの態様では、APRILおよび/またはBAFFに対して増加または増大した結合親和性を有するバリエーションBCMAポリペプチドは、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチド対照と比較して、少なくとも約5%、例えば、少なくとも約10%、15%、20%、25%、35%または50%の結合親和性の増加を有する。いくつかの態様では、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチドと比較した結合親和性の増加は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍または50倍を超える。例のいずれかでは、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば置換）を含まないことを除いて、バリエーションBCMAポリペプチドと同じ配列を有する。

30

【0222】

いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの平衡解離定数（ K_d ）は、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ または $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、または $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満であり得る。いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、もしくは $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、または約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、もしくは $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満である。いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ から、 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ または約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ である。いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-10} \text{ M}$

40

50

もしくは約 6×10^{-10} M、 8×10^{-10} Mもしくは約 8×10^{-10} M、 1×10^{-11} Mもしくは約 1×10^{-11} M、 2×10^{-11} Mもしくは約 2×10^{-11} M、 4×10^{-11} Mもしくは約 4×10^{-11} M、 6×10^{-11} Mもしくは約 6×10^{-11} M、 8×10^{-11} Mもしくは約 8×10^{-11} M、もしくは 1×10^{-12} Mもしくは約 1×10^{-12} M、または前述のいずれかの間の任意の値である。いくつかの態様では、提供される態様は、上記のバリエーションBCMAポリペプチドを含み、BAFFに対する K_d は、1.5倍を超えて、または約1.5倍を超えて、例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上を超えて、または約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上、減少する（結合親和性の増大）。

【0223】

いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの平衡解離定数（ K_d ）は、 1×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} Mまたは 1×10^{-11} M、または 1×10^{-12} M未満であり得る。いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} Mもしくは 1×10^{-11} M、もしくは 1×10^{-12} M未満、または約 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} Mもしくは 1×10^{-11} M、もしくは 1×10^{-12} M未満である。いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 1×10^{-9} Mから、 1×10^{-12} Mまたは約 1×10^{-12} Mである。いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 1×10^{-9} Mもしくは約 1×10^{-9} M、 2×10^{-9} Mもしくは約 2×10^{-9} M、 4×10^{-9} Mもしくは約 4×10^{-9} M、 6×10^{-9} Mもしくは約 6×10^{-9} M、 8×10^{-9} Mもしくは約 8×10^{-9} M、 1×10^{-10} Mもしくは約 1×10^{-10} M、 2×10^{-10} Mもしくは約 2×10^{-10} M、 4×10^{-10} Mもしくは約 4×10^{-10} M、 6×10^{-10} Mもしくは約 6×10^{-10} M、 8×10^{-10} Mもしくは約 8×10^{-10} M、 1×10^{-11} Mもしくは約 1×10^{-11} M、 2×10^{-11} Mもしくは約 2×10^{-11} M、 4×10^{-11} Mもしくは約 4×10^{-11} M、 6×10^{-11} Mもしくは約 6×10^{-11} M、 8×10^{-11} Mもしくは約 8×10^{-11} M、もしくは 1×10^{-12} Mもしくは約 1×10^{-12} M、または前述のいずれかの間の任意の値である。いくつかの態様では、提供される態様は、上記のバリエーションBCMAポリペプチドを含み、APRILに対する K_d は、1.5倍を超えて、または約1.5倍を超えて、例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上を超えて、または約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上、減少する（結合親和性の増大）。

【0224】

参照（例えば、非改変または野生型）BCMA配列は、本明細書において記載されるバリエーションBCMAポリペプチドを生成するための出発組成物として必ずしも使用される必要はない。したがって、用語「改変」、例えば「置換」の使用は、本態様が、バリエーションBCMAポリペプチドまたはそれを含む免疫調節タンパク質を作製する特定の方法に限定されることを意味しない。バリエーションBCMAポリペプチドは、例えばデノボペプチド合成によって作製され得、したがって、改変、例えば置換をコードするようにコドンを変化させるという意味で、「置換」などの改変を必ずしも必要としない。この原理は、同様に特定の作製方法を意味しない、アミノ酸残基の「付加」および「欠失」という用語にも及ぶ。バリエーションBCMAポリペプチドを設計または作製する手段は、特定の方法に限定されない。ただし、いくつかの態様では、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAコード核酸は、参照（例えば、非改変または野生型）BCMA遺伝物質から変異誘発され、所望の特異的結合親和性または他の機能活性についてスクリーニングされる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、任意の数の公的に入手可能なデータベースで利用可能なタンパク質または核酸配列を利用してデノボで合成され、次いでスクリーニングされる。国立バイオテクノロジー情報センターはそのような情報を提供し、そのウェブサイトは、前述のUniProtKBデータベースのようにインターネットを介して公的にアクセス可能である。

【0225】

特に指示しない限り、本開示全体を通して示されるように、バリエーションBCMAポリペ

プチド内のアミノ酸改変は、SEQ ID NO:710に記載の参照ECD配列の位置のナンバリングに対応するアミノ酸位置番号によって指定される。例えば、参照配列（例えば、SEQ ID NO:356）とSEQ ID NO:710とのアライメントなどによって、そのTD（CRD）を含むその一部を含むBCMAポリペプチド内の改変、例えばアミノ酸置換の対応する位置を同定することは、当業者のレベルの範囲内である。対応する残基を同定するアライメントを図17Bに例示する。本開示全体にわたる改変の一覧では、アミノ酸位置は中央に示されており、対応する参照（例えば、非改変または野生型）アミノ酸は、番号の前に列挙され、同定されたバリエーションアミノ酸置換は、番号の後に列挙されている。改変がその位置の欠失である場合、「del」が示され、改変がその位置での挿入である場合、「ins」が示されている。場合によっては、挿入は、中央に示されたアミノ酸位置とともに列挙され、対応する参照アミノ酸は、番号の前後に列挙され、同定されたバリエーションアミノ酸挿入は、非改変（例えば野生型）アミノ酸の後に列挙されている。

10

【0226】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、記載されているいずれかなどの参照（例えば、非改変または野生型）BCMA配列内の置換を有する。1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、参照（例えば、非改変または野生型）BCMA配列のエクトドメイン（細胞外ドメイン）内に存在し得る。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、CRDドメインまたはその特異的結合断片内にある。

【0227】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変、例えば置換を有する。改変、例えば置換は、CRD内に存在し得る。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、CRDまたはその特異的結合断片内に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含むバリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:710または356のアミノ酸配列などを有する参照（例えば、非改変または野生型）BCMAポリペプチドまたはその特異的結合断片と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含むバリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:710のアミノ酸配列と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含むバリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356のアミノ酸配列と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

20

30

【0228】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:710のナンバリングを基準として、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47または48位に対応する参照BCMAポリペプチドまたはその特異的結合断片に置換などの1つまたは複数のアミノ酸改変を有する。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、

40

S9G, S9N, S9Y,

Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G

10

から選択される置換、またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、参照BCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:356に記載されている。

【0229】

保存的アミノ酸改変、例えば置換は、参照（例えば非改変）または野生型アミノ酸以外の、置換アミノ酸と同じクラスのアミノ酸に含まれる任意のアミノ酸である。アミノ酸のクラスは、脂肪族（グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）、ヒドロキシルまたは硫黄含有（セリン、システイン、トレオニンおよびメチオニン）、環状（プロリン）、芳香族（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）、塩基性（ヒスチジン、リジンおよびアルギニン）、および酸性/アミド（アスパルテート、グルタメート、アスパラギンおよびグルタミン）である。

20

【0230】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、9位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S9G、S9N、S9Yである。

【0231】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、10位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、Q10E、Q10Pである。

【0232】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、11位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、N11D、N11Sである。

30

【0233】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、19位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、H19A、H19C、H19D、H19E、H19F、H19G、H19I、H19K、H19L、H19M、H19N、H19P、H19Q、H19R、H19S、H19T、H19V、H19W、H19Yである。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換はH19Lである。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換はH19Kである。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換はH19Qである。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換はH19Rである。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換はH19Yである。

40

【0234】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、22位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、I22L、I22Vである。

【0235】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、25位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、Q25E、Q25F、Q25G、Q25H、Q25I、Q25K、Q25L、Q25M、Q25S、Q25V、Q25Yである。

【0236】

50

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、27位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、R27H、R27Lである。

【0237】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、30位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S30G、S30Yである。

【0238】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、31位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、N31D、N31G、N31H、N31K、N31L、N31M、N31P、N31S、N31V、N31Yである。

10

【0239】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、32位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、T32I、T32Sである。

【0240】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、35位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、L35A、L35M、L35P、L35S、L35V、L35Yである。

【0241】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、36位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、T36A、T36G、T36N、T36M、T36S、T36Vである。

20

【0242】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、39位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、R39L、R39Qである。

【0243】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、43位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、A43E、A43Sである。

30

【0244】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、45位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、V45A、V45D、V45Iである。

【0245】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、46位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、T46A、T46Iである。

【0246】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、47位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、N47D、N47Yである。

40

【0247】

いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換は、S16A/H19Y/R39Qを含む。

【0248】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、表1に列挙された変異のいずれかを含む。表1はまた、参照（例えば非改変）BCMAポリペプチドおよび例示的なバリエーションBCMAポリペプチドのSEQ ID NOを参照することにより、例示的な配列を提示する。示されるように、所与のドメインに対応する正確な遺伝子座または残基は、例えば、

50

そのドメインを同定または分類するために使用される方法に応じて変動し得る。また、場合によっては、所与のドメイン（例えばCRD）の隣接するN末端アミノ酸および/またはC末端アミノ酸もまた、例えば、発現された場合にドメインの適切なフォールディングを確実にするために、バリエーションBCMAポリペプチドの配列に含めることができる。したがって、表1のSEQ ID NOの例示は限定と解釈されるべきではないことが理解される。例えば、バリエーションBCMAポリペプチドの特定のドメイン、例えば、ECDドメイン、またはCRD1/CRD2、もしくはCRD2のみを含むその一部は、それぞれのSEQ ID NOに記載のアミノ酸配列よりも数アミノ酸長くまたは短く、例えば、1～10、例えば、1、2、3、4、5、6または7アミノ酸長くまたは短くてよい。

【0249】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、表1に列挙された変異のいずれかを含む。いくつかの例では、変異は、SEQ ID NO:710に記載のアミノ酸配列を含む参照BCMA内に作製される。いくつかの例では、変異は、SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列を含む参照BCMA内に作製される。

【0250】

用語「改変」、例えば、「置換」または「変異」の使用は、本態様が、免疫調節タンパク質を作製する特定の方法に限定されることを意味しない。バリエーションBCMAポリペプチドは、例えばデノボペプチド合成によって作製され得、したがって、改変、例えば置換をコードするようにコドンを変化させるという意味で、「置換」などの改変を必ずしも必要としない。この原理は、同様に特定の作製方法の意味しない、アミノ酸残基の「付加」および「欠失」という用語にも及ぶ。vTDを設計または作製する手段は、特定の方法に限定されない。ただし、いくつかの態様では、野生型TDコード核酸または非改変TDコード核酸は、野生型TD遺伝物質または非改変TD遺伝物質から変異誘発され、所望の特異的結合活性、例えば、結合親和性、および/またはNF- κ B調節もしくは他の機能活性の変化についてスクリーニングされる。いくつかの態様では、vTDは、任意の数の公的に入手可能なデータベースで利用可能なタンパク質または核酸配列を利用してデノボで合成され、次いでスクリーニングされる。国立バイオテクノロジー情報センターはそのような情報を提供し、そのウェブサイトは、UniProtKBデータベースのようにインターネットを介して公的にアクセス可能である。

【0251】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の細胞外ドメイン（ECD）配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つの特異的結合断片を含み、特異的結合断片は、BAFFおよび/またはAPRILに結合し、アミノ酸改変、例えば、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAに存在しない置換を含む連続配列を含む。

【0252】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:381に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:381に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:381に記載の配列からなる。

【0253】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:405に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:405に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチド

10

20

30

40

50

は、SEQ ID NO:405に記載の配列からなる。

【0254】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:406に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:406に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:406に記載の配列からなる。

【0255】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:410に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:410に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:410に記載の配列からなる。

10

【0256】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:411に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:411に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:411に記載の配列からなる。

【0257】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:437～515のいずれかに記載のヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドは、SEQ ID NO:437～515のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するヌクレオチド配列によってコードされる。SEQ ID NO:437～515のいずれかに記載の配列、またはSEQ ID NO:437～515のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、もしくは99%の同一性を示す配列を含む核酸も本明細書において提供される。

20

30

【0258】

（表1）BCMA免疫調節タンパク質（例えばBCMA-Fc）内の、またはBIMとしての例示的なバリエーションBCMA

40

50

名称	変異	ECD SEQ ID NO	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
356 (WT)	野生型	356	436
357 BCMA	H19Y	357	437
358 BCMA	H19Y, S30G	358	438
359 BCMA	H19Y, V45A	359	439
360 BCMA	F14Y, H19Y	360	440
361 BCMA	H19Y, V45D	361	441
362 BCMA	H19Y, A43E	362	442
363 BCMA	H19Y, T36A	363	443
364 BCMA	H19Y, I22V	364	444
365 BCMA	N11D, H19Y	365	445
366 BCMA	H19Y, T36M	366	446
367 BCMA	N11S, H19Y	367	447
368 BCMA	H19Y, L35P, T46A	368	448
369 BCMA	H19Y, N47D	369	449
370 BCMA	S9D, H19Y	370	450
371 BCMA	H19Y, S30G, V45D	371	451
372 BCMA	H19Y, R39Q	372	452
373 BCMA	H19Y, L35P	373	453
374 BCMA	S9D, H19Y, R27H	374	454
375 BCMA	Q10P, H19Y, Q25H	375	455
376 BCMA	H19Y, R39L, N47D	376	456
377 BCMA	N11D, H19Y, N47D	377	457
378 BCMA	H19Y, T32S	378	458
379 BCMA	N11S, H19Y, S29P	379	459

10

20

30

40

50

名称	変異	ECD SEQ ID NO	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
380 BCMA	H19Y, R39Q, N47D	380	460
381 BCMA	S16A, H19Y, R39Q	381	461
382 BCMA	S9N, H19Y, N31K, T46I	382	462
383 BCMA	H19Y, R27L, N31Y, T32S, T36A	383	463
384 BCMA	N11S, H19Y, T46A	384	464
385 BCMA	H19Y, T32I	385	465
386 BCMA	S9G, H19Y, T36S, A43S	386	466
387 BCMA	H19Y, S48G	387	467
388 BCMA	S9N, H19Y, I22V, N31D	388	468
389 BCMA	S9N, H19Y, Q25K, N31D	389	469
390 BCMA	S9G, H19Y, T32S	390	470
391 BCMA	H19Y, T36A, N47Y	391	471
392 BCMA	H19Y, V45A, T46I	392	472
393 BCMA	H19Y, Q25K, N31D	393	473
394 BCMA	H19Y, Q25H, R39Q, V45D	394	474
395 BCMA	H19Y, T32S, N47D	395	475
396 BCMA	Q10E, H19Y, A20T, T36S	396	476
397 BCMA	H19Y, T32S, V45I	397	477
398 BCMA	H19A	398	478
399 BCMA	H19C	399	479
400 BCMA	H19D	400	480
401 BCMA	H19E	401	481
402 BCMA	H19F	402	482
403 BCMA	H19G	403	483
404 BCMA	H19I	404	484
405 BCMA	H19K	405	485
406 BCMA	H19L	406	486
407 BCMA	H19M	407	487
408 BCMA	H19N	408	488
409 BCMA	H19P	409	489
410 BCMA	H19Q	410	490
411 BCMA	H19R	411	491
412 BCMA	H19S	412	492
413 BCMA	H19T	413	493
414 BCMA	H19V	414	494
415 BCMA	H19W	415	495
416 BCMA	H19F, Q25E, N31L, L35Y, T36S	416	496
417 BCMA	H19F, Q25F, N31S, T36S	417	497
418 BCMA	H19I, Q25F, N31S, T36V	418	498

10

20

30

40

50

名称	変異	ECD SEQ ID NO	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
419 BCMA	H19F, Q25V, N31M, T36S	419	499
420 BCMA	H19Y, Q25Y, N31L, L35Y, T36S	420	500
421 BCMA	H19F, Q25I, N31M, L35A, T36S	421	501
422 BCMA	H19I, Q25L, N31L, L35Y, T36S	422	502
423 BCMA	H19F, Q25L, N31G, L35P, T36A	423	503
424 BCMA	H19Y, I22L, N31G	424	504
425 BCMA	H19F, I22V, Q25M, N31P, T36M	425	505
426 BCMA	H19Y, N31L, L35Y, T36S	426	506
427 BCMA	H19L, S30G, N31H, L35A	427	507
428 BCMA	H19L, Q25S, N31V, L35S, T36V	428	508
429 BCMA	H19L, Q25S, S30Y, N31G, L35M, T36V	429	509
430 BCMA	H19F, Q25F, N31L, L35Y, T36S	430	510
431 BCMA	H19F, Q25F, N31S, T36G	431	511
432 BCMA	H19F, I22V, Q25S, N31V, L35S, T36V	432	512
433 BCMA	H19F, Q25G, N31S, L35V, T36N	433	513
434 BCMA	H19L, Q25H, N31D, L35S	434	514
435 BCMA	H19F, Q25F, N31S, L35Y, T36S	435	515

10

20

30

40

50

【0259】

いくつかの態様では、上記BCMA配列のいずれかが、多量体化ドメイン、例えば、本明細書において記載されるいずれかに連結または融合されているBCMA ECD融合配列も、本明細書において提供される。例示的な多量体化ドメインは、セクションIV.Cに記載されている。いくつかの態様では、多量体化ドメインは免疫グロブリン（例えばIgG1）Fc領域であり、融合タンパク質は、（1）提供されるBCMA ECD配列のいずれかを含むBCMA配列と、（2）免疫グロブリンFc領域と、を含むBCMA-Fcである。したがって、提供される態様の中には、（1）バリエーションBCMAポリペプチドなどの上記のBCMA ECDポリペプチド配列のいずれかを含むかまたはそれからなるBCMA配列と、（2）免疫グロブリンFc領域と、を含むBCMA-Fc融合タンパク質がある。いくつかの態様では、BCMA-Fc融合体は、上記のバリエーションBCMAポリペプチドのいずれか、および免疫グロブリンFc領域を含むか、またはそれからなる、バリエーションBCMA-Fc融合体である。

【0260】

いくつかの態様では、（1）SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列を含むBCMA ECD配列と、（2）免疫グロブリンFc領域と、を含むバリエーションBCMA-Fc融合配列が、本明細書において提供される。いくつかの態様では、（1）SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるBCMA ECD配列と、（2）免疫グロブリンFc領域と、を含むバリエーションBCMA-Fc融合配列が、本明細書において提供される。

【0261】

いくつかの態様では、（1）SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列を含むBCMA ECD配列と、（2）免疫グロブリンFc領域と、を含むバリエーションBCMA-Fc融合配列が、本明細書において提供される。いくつかの態様では、（1）SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるBCMA ECD配列と、（2）免疫グロブリンFc領域と、を含むバリエーションBCMA-Fc融合配列が、本明細書において提供される。

【0262】

BCMA-Fcの提供される態様では、免疫グロブリンFc領域は、免疫グロブリンの野生型Fc、例えば、IgG1 Fcであり得る。場合によっては、Fc領域は、エフェクター機能を欠くバリエーションFc（「エフェクターレス（effectorless）Fc」とも呼ばれる）であり得る。提供されるBCMA-Fc融合タンパク質内の例示的なFc領域およびそのバリエーションは、下記のセクションIV.Cに記載されている。

【0263】

いくつかの態様では、Fcは、マウスFcまたはヒトFcである。いくつかの態様では、Fcは、哺乳動物IgG1 Fc領域、IgG2 Fc領域、IgG3 Fc領域もしくはIgG4 Fc領域、またはヒトIgG1 Fc領域、IgG2 Fc領域、IgG3 Fc領域もしくはIgG4 Fc領域である。

10

【0264】

いくつかの態様では、Fcは、ヒトIgG1などのIgG1に由来する。いくつかの態様では、Fcは、EUナンバリングによる356位および358位に残基Glu（E）およびMet（M）を含むアロタイプを有する、SEQ ID NO:586に記載のIgG1 Fcである。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:586に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:586に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。他の態様では、Fcは、ヒトG1m1アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO:597に記載されているように、356および358位にAsp（D）およびLeu（L）を含む残基などを含むIgG1 Fcである。したがって、場合によっては、本明細書において提供されるFcは、アロタイプG1 m1の残基を再構成するためのアミノ酸置換E356DおよびM358Lを含み得る。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:597に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

20

【0265】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列を有する。

【0266】

いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:755に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:756に記載の配列を含む。いくつかの態様では、本明細書において提供される構築物に使用されるFc領域は、C末端リジン残基をさらに欠くことができる。

30

【0267】

いくつかの態様では、Fcは、ヒトIgG2などのIgG2に由来する。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:726に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:726に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0268】

いくつかの態様では、Fcは、ヒトIgG4などのIgG4に由来する。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:727に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:727に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、IgG4 Fcは、ヒトIgG4のCH3ドメインがヒトIgG1のCH3ドメインによって置換されており、凝集体形成の阻害を示す安定化Fc、ヒトIgG4のCH3ドメインおよびCH2ドメインが、それぞれヒトIgG1のCH3ドメインおよびCH2ドメインによって置換されている抗体、またはヒトIgG4の、Kabatらによって提案されたEUインデックスに示される409位のアルギニンがリジンによって置換されており、凝集体形成の阻害を示す抗体である（例えば、米国特許第8,911,726号を参照。いくつかの態様では、Fcは、Fabアーム交換によって治療用抗体と内因性IgG4との間の組換えを妨げるこ

40

50

とが示されているS228P変異を含むIgG4である（例えば、Labrijin et al. (2009) Nat.Biotechnol.,27 (8):767-71を参照。）いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:728に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:728に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0269】

いくつかの態様では、Fc領域は、野生型Fcが1つまたは複数のアミノ酸置換によって改変されて、エフェクター活性を低下させるか、またはFcをFcエフェクター機能に対して不活性にするバリエーションFc領域である。例示的なエフェクターレス変異または不活性変異には、セクションIV.Cを含む本明細書において記載されるものが含まれる。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質のFc領域は、234、235、236、237、238、239、270、297、298、325および329位（EUNanバリングにより示される）のアミノ酸のうちのいずれか1つまたは複数の、天然Fc領域と比較して異なるアミノ酸によって置換されているFc領域を有する。Fc領域のこのような変化には、例えば、Current Opinion in Biotechnology (2009) 20 (6), 685-691に記載されている脱グリコシル化鎖（N297AおよびN297Q）、IgG1-N297G、IgG1-L234A/L235A、IgG1-L234A/L235E/G237A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318AおよびIgG4-L236Eなどの変化;国際公開公報第2008/092117号に記載されているG236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328RおよびN325LL328Rなどの変化;233、234、235および237位（EUNanバリングにより示される）におけるアミノ酸挿入;ならびに国際公開公報第2000/042072号に記載されている部位における変化が含まれる。

【0270】

いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、野生型IgG1、例えば野生型ヒトIgG1に由来する1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含む。いくつかの態様では、野生型IgG1 Fcは、EUNanバリングによる356および358位に残基Glu (E) およびMet (M) を含むアロタイプを有する、SEQ ID NO:586に記載のFcであり得る。いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:586に記載のアミノ酸配列に由来する。他の態様では、野生型IgG1 Fcは、ヒトG1m1アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO:597に記載されているように、356および358位にAsp (D) およびLeu (L) を含む残基を含む。したがって、場合によっては、バリエーションFcは、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列に由来する。

【0271】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586または597に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く（EUNanバリングによるK447delに対応する）。

【0272】

いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:586のナンバリングによる、野生型Fc領域または非改変Fc領域のC5Sアミノ酸改変（EUNanバリングによるC220Sに対応する）を含む。

【0273】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586のナンバリングによる、N82Gである（EUNanバリングによるN297Gに対応する）少なくとも1つのアミノ酸置換を含むバリエーションFcである。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:586のナンバリングによる、R77CまたはV87Cである（EUNanバリングによるR292CまたはV302Cに対応する）少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含む。いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:586のナンバリングによるC5Sアミノ酸改変（EUNanバリングに

よるC220Sに対応する)をさらに含む。例えば、いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、以下のアミノ酸改変、すなわち、EUナンバリングによるN297G、および以下のアミノ酸改変、すなわち、C220S、R292CまたはV302Cのうちの1つまたは複数(SEQ ID NO:586を基準として、N82G、および以下のアミノ酸改変、すなわち、C5S、R77CまたはV87Cのうちの1つまたは複数に対応する)を含み、例えば、Fc領域は、SEQ ID NO:598に記載の配列を含む。

【0274】

いくつかの態様では、バリエーションFcは、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A/L235E/G237Aを含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、EUナンバリングによる、アミノ酸置換A330S/P331Sを含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、アミノ酸置換L234A/L235E/G237A/A330S/P331Sを含む(Gross et al. (2001) Immunity 15:289)。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:757に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:758に記載の配列を含む。いくつかの態様では、本明細書において提供される構築物に使用されるFc領域は、C末端リジン残基をさらに欠くことができる。

【0275】

いくつかの態様では、Fc領域は、EUナンバリングによる、変異L234A、L235EおよびG237Aを含むバリエーションFcである。いくつかの態様では、野生型Fcは、1つまたは複数のシステイン残基の除去によって、例えば、EUナンバリングによる220位(C220S)のセリン残基へのシステイン残基の置換によって、さらに改変される。エフェクター機能が低下した例示的な不活性Fc領域は、SEQ ID NO:599およびSEQ ID NO:591に記載されており、それぞれSEQ ID NO:586またはSEQ ID NO:597に記載のアロタイプに基づく。いくつかの態様では、Fc領域は、C末端リジン残基をさらに欠くことができる。いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S、L234A、L235EまたはG237Aのうちの1つまたは複数を含み、例えば、Fc領域は、SEQ ID NO:589、591、599または724に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:589に記載の配列を有する。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:591に記載の配列を有する。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:599に記載の配列を有する。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:724に記載の配列を有する。

【0276】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:589に記載の配列を有するバリエーションFcである。

【0277】

いくつかの態様では、Fc領域は、アミノ酸改変C220S、L235P、L234V、L235A、G236delまたはS267Kのうちの1つまたは複数を含むバリエーションFc領域であり、例えば、Fc領域は、SEQ ID NO:722に記載の配列を含む。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く(EUナンバリングによるK447delに対応する)。

【0278】

いくつかの態様では、Fc領域は、アミノ酸改変C220S、R292C、N297G、V302Cのうちの1つまたは複数を含むバリエーションFc領域である。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く(EUナンバリングによるK447delに対応する)。例示的なバリエーションFc領域は、SEQ ID NO:723に記載されている。

【0279】

いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く(EUナンバリングによるK447delに対応する)。例示的なバリエーションFc領

域は、SEQ ID NO:725に記載されている。

【0280】

いくつかの態様では、Fc領域は、表4のFc変異の任意の組合せを含むバリエーションFc領域である。いくつかの態様では、Fc領域は、表4のSEQ ID NOのいずれか1つに記載の配列を有するバリエーションFc領域である。

【0281】

例えば、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:586またはSEQ ID NO:597に記載の野生型IgG1と比較して低下したエフェクター活性を示すエフェクターレスFcであり得る。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:591、598、599、722、589、723、724もしくは725のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:591、598、599722、589、723、724もしくは725のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:589に記載の配列を有する。

10

【0282】

いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドなどのBCMAポリペプチドは、Fc配列に直接的に連結される。いくつかの態様では、バリエーションBCMAポリペプチドなどのBCMAポリペプチドは、リンカーなどを介してFc配列に間接的に連結される。いくつかの態様では、1つまたは複数の「ペプチドリリンカー」は、BCMAポリペプチド（例えばバリエーションBCMAポリペプチド）とFc領域とを連結する。いくつかの態様では、ペプチドリリンカーは、単一のアミノ酸残基またはそれ以上の長さであり得る。いくつかの態様では、ペプチドリリンカーは、少なくとも1個のアミノ酸残基を有するが、長さが20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下のアミノ酸残基である。例示的なリンカーは、サブセクション「リンカー」に記載されている。

20

【0283】

いくつかの態様では、リンカーは、（1文字アミノ酸コードで）:GGGGS（「4GS」;SEQ ID NO:593）、または4GSリンカーの多量体、例えば、2、3、4もしくは5個の4GSリンカーのリピートである。いくつかの態様では、ペプチドリリンカーは、（GGGGS）₂（SEQ ID NO:594）、（GGGGS）₃（SEQ ID NO:595）、（GGGGS）₄（SEQ ID NO:600）、または（GGGGS）₅（SEQ ID NO:671）である。いくつかの態様では、リンカーはまた、単独で、または別のペプチドリリンカー（4GSリンカーまたはその多量体など）に加えて、一連のアラニン残基を含むことができる。いくつかの態様では、リンカー（1文字アミノ酸コードで）は、GSGGGGS（SEQ ID NO:590）またはGGGGSSA（SEQ ID NO:596）である。いくつかの例では、リンカーは、2xGGGGS、続いて3つのアラニンである（GGGGS GGGGS AAA;SEQ ID NO:721）。

30

【0284】

いくつかの態様では、Fcドメインに連結された、記載されている2つの同一のBCMA Fcポリペプチド（例えばバリエーションBCMAポリペプチド）によって形成される、二量体であるBCMA-Fc融合タンパク質が提供される。いくつかの態様では、ホモ二量体を作製するために、提供されるBCMA-Fc融合ポリペプチド、例えばバリエーションBCMA-Fc融合体のいずれかの同一の種が二量体化される。いくつかの態様では、二量体は、2つのBCMA Fcポリペプチド、例えばバリエーションBCMA Fcポリペプチドが同じである、ホモ二量体である。ホモ二量体Fc分子を生成するために、Fc領域は、細胞内の個々のFc領域の共発現によって、一致したFc領域を有するホモ二量体を形成することができるものである。

40

【0285】

BCMA-Fc融合タンパク質、例えばバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質をコードする核酸分子も提供される。いくつかの態様では、Fc融合タンパク質の産生のために、BCMA-Fc融合タンパク質、例えばバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質をコードする核酸分子は、適切な発現ベクターに挿入される。得られるBCMA-Fc融合タンパク質、例えばバ

50

リアントBCMA-Fc融合タンパク質は、Fc部分間に形成された鎖間ジスルフィド結合によってFcドメイン間の構築が起こり、二量体、例えば二価のBCMA-Fc融合タンパク質を生じる、前記発現によって形質転換された宿主細胞において発現され得る。得られたFc融合タンパク質は、プロテインAカラムまたはプロテインGカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって容易に精製され得る。

【0286】

態様では、提供される免疫調節タンパク質、例えばBCMA-Fcは、細胞から産生および発現される場合、2つの同一のポリペプチド鎖を含むホモ二量体である。図15は、本明細書において提供される例示的なBCMA-Fc融合タンパク質の構造を示す。

【0287】

III. マルチドメイン免疫調節タンパク質

(1) B細胞刺激受容体のリガンドに結合する1つまたは複数のB細胞阻害分子(BIM)と、(2) T細胞刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに結合する1つまたは複数のT細胞阻害分子(BIM)と、を含む、マルチドメイン免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の中には、BIMがB細胞刺激受容体の活性に拮抗する、例えば、B細胞刺激受容体の活性を低減または阻害するもの、およびTIMがT細胞刺激受容体の活性に拮抗する、例えば、T細胞刺激受容体の活性を低減または阻害するものがある。したがって、提供される免疫調節タンパク質は、単一分子になるようにB細胞阻害剤とT細胞阻害剤とを組み合わせる。いくつかの態様では、BIMとTIMとは、直接的または間接的に連結される。提供される免疫調節タンパク質は、マルチドメインBIM成分およびマルチドメインTIM成分が、別の部分、例えば、多量体化ドメインまたは半減期延長分子にさらに連結されている融合タンパク質であり得る。特定の態様では、マルチドメイン免疫調節タンパク質は、BIM/TIM Fc融合タンパク質である。提供される分子は、B細胞経路およびT細胞経路を調節し、それによって、自己免疫疾患、特に、病因がB細胞応答およびT細胞応答に関連する自己免疫疾患を処置するために使用され得る。

【0288】

いくつかの態様では、B細胞刺激受容体は、B細胞の成熟および分化などのB細胞応答を刺激する、B細胞上に発現される受容体である。B細胞刺激受容体は、BAFF-R、BCMAおよび/またはTACIであり得る。特定の態様では、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質は、BAFF-R、BCMAまたはTACIのうちの1つまたは複数の活性に拮抗する。いくつかの態様では、BIMは、BAFF-R、BCMAまたはTACIのリガンドに結合する。リガンドは、TNFスーパーファミリーのメンバーに共通のホモ三量体分子である、BAFFまたはAPRILであり得る。BAFFおよびAPRILはともに、骨髄細胞によって主に発現され、共刺激B細胞因子として作用することが報告されている。BAFFおよびAPRILは、2つの受容体TACIおよびBCMAを共有する。BAFFはまた、BAFF-Rに結合し、BAFF-Rを刺激することができる。場合によっては、リガンドは、BAFFおよびAPRILのヘテロ三量体であり得る。例えば、APRILおよびBAFFのヘテロ三量体複合体は、血清中、特に、自己免疫疾患を有する対象、例えば、免疫に基づく全身性のリウマチ性疾患を有する対象に見出される。

【0289】

いくつかの態様では、T細胞刺激受容体は、免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含むか、またはT細胞のシグナル伝達経路に関与するアダプタータンパク質と相互作用して活性化シグナルを伝達する。T細胞刺激受容体は、T細胞上に発現される共刺激受容体、例えば、CD28またはICOSであり得る。特定の態様では、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質は、T細胞刺激受容体、例えばT細胞共刺激受容体、例えばCD28またはICOSの活性に拮抗する。TIMは、共刺激受容体に、または共刺激受容体のリガンドに結合し得る。いくつかの態様では、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質は、TIMがT細胞刺激受容体に直接結合するように生成され得る。例えば、TIMは、CD28結合分子またはICOS結合分子であり得る。他の態様では、提供されるマルチドメイン

10

20

30

40

50

免疫調節タンパク質は、TIMがT細胞刺激受容体のリガンドに結合し、それによって、T細胞刺激受容体に間接的に拮抗するか、またはT細胞刺激受容体を間接的に阻害するように生成され得る。例えば、TIMは、CD28のリガンドであるCD80またはCD86に結合する。

【0290】

いくつかの態様では、1つまたは複数のTIMおよび/またはBIMは、独立して、抗体または抗原結合抗体断片を含む。いくつかの局面では、TIMおよび/またはBIMは、ヒト抗体、および/またはヒトタンパク質に結合する抗体であり得る。

【0291】

いくつかの態様では、TIMまたはBIMのうちの少なくとも1つは抗体または抗原結合断片ではない。いくつかの態様では、TIMまたはBIMのうちの少なくとも1つは、免疫細胞上に発現される細胞表面分子の細胞外ドメインであるか、またはそれを含む。例えば、非抗体免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) のある特定のメンバーは、T細胞上に発現されるか、またはT細胞の活性を調節する。これらには、例えば、ある特定のT細胞共刺激分子またはそのリガンドが含まれる。場合によっては、TIMは、IgSFメンバー（例えば野生型IgD）の (IgSF) ドメイン (IgD)、またはIgDに1つもしくは複数のアミノ酸改変（例えば置換）を含むバリエーションIgD（以下、「vIgD」と呼ばれる）を含む。同様に、TNF受容体スーパーファミリーのある特定のメンバーは、B細胞上に発現されるか、またはB細胞の活性を調節する。これらには、例えば、TACIまたはBCMAなどのある特定のB細胞刺激受容体が含まれる。場合によっては、BIMは、TNFRスーパーファミリーメンバーのTNF受容体ドメイン (TD)（例えば野生型TD）、またはTDにもう1つのアミノ酸改変（例えば置換）を含むバリエーションTD（以下、「vTD」と呼ばれる）を含む。

【0292】

いくつかの態様では、BIMは、いくつかの公知の方法のいずれかによって測定されるように、結合親和性などの少なくともある特定の結合活性でB細胞刺激受容体のリガンドに結合することができる。いくつかの態様では、TIMは、いくつかの公知の方法のいずれかによって測定されるように、結合親和性などの少なくともある特定の結合活性でT細胞刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに結合することができる。いくつかの態様では、親和性は、平衡解離定数 (K_D) によって表されるか、または EC_{50} によって表される。結合親和性を含む結合活性を評価するため、および/または結合分子（例えば、TIMまたはBIM）が特定の結合パートナーに特異的に結合するかどうかを決定するための様々なアッセイが公知である。いくつかの態様では、表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析を使用して、2つのタンパク質間の複合体の結合キネティクスおよび結合定数を決定するために、BIAcore（登録商標）機器を使用することができる（例えば、Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; および米国特許第5,283,173号、米国特許第5,468,614号、または均等物を参照）。他の態様では、例えば、ストレプトアビジン被覆センサおよびビオチン化組換えタンパク質ドメインとともに、ForteBio Octetシステムを使用するバイオレイヤー干渉法 (BLI) を使用してもよい。あるタンパク質の別のタンパク質への結合を測定するための他の好適なアッセイには、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) およびラジオイムノアッセイ (RIA) などのイムノアッセイ、または蛍光、UV吸収、円偏光二色性もしくは核磁気共鳴 (NMR) によってタンパク質の分光学的特性もしくは光学的特性の変化をモニタリングすることによる結合の決定が含まれる。他の例示的なアッセイには、限定されることなく、ウエスタンブロット、ELISA、分析用超遠心、分光法、フローサイトメトリー、配列決定、および発現された核酸、またはタンパク質の結合を検出するための他の方法が含まれる。

【0293】

いくつかの態様では、BIMおよびTIMは、独立して、 10^{-5} M以下の K_D で結合パートナーに対する結合親和性を示す（すなわち、M単位での特定の結合相互作用の平衡解離定数

;二分子相互作用を仮定して、この会合反応の結合速度 (on-rate) [k_{on} または k_a] に対する解離速度 (off-rate) [k_{off} または k_d] の比に等しい)。例えば、平衡解離定数 K_D は、 $10^{-6}M \sim 10^{-12}M$ 、例えば、 $10^{-7}M \sim 10^{-11}M$ 、 $10^{-8}M \sim 10^{-10}M$ 、または $10^{-9}M \sim 10^{-10}M$ の範囲である。結合速度 (会合速度定数; k_{on} または k_a ; $1/Ms$ 単位) および解離速度 (解離速度定数; k_{off} または k_d ; $1/s$ 単位) は、当技術分野において公知のアッセイ法のいずれか、例えば表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用して決定することができる。

【0294】

いくつかの態様では、BIMは、 $0.001nM$ または約 $0.001nM$ から、 $1000nM$ 、例えば、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $500nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $400nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $100nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $50nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $10nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $1nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $0.1nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $500nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $400nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $100nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $50nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $10nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $1nM$ 、 $0.5nM$ もしくは約 $0.5nM$ から、約 $200nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $500nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $100nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $50nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $10nM$ 、 $2nM$ もしくは約 $2nM$ から、約 $50nM$ 、 $10nM$ もしくは約 $10nM$ から、約 $500nM$ 、 $10nM$ もしくは約 $10nM$ から、約 $100nM$ 、 $10nM$ もしくは約 $10nM$ から、約 $50nM$ 、 $50nM$ もしくは約 $50nM$ から、約 $500nM$ 、 $50nM$ もしくは約 $50nM$ から、約 $100nM$ 、または $100nM$ もしくは約 $100nM$ から、約 $500nM$ である、B細胞刺激受容体のリガンドに対する結合親和性を示す。ある特定の態様では、阻害受容体に対するBIMの結合親和性は、 $400nM$ 、 $300nM$ 、 $200nM$ 、 $100nM$ 、 $50nM$ 、 $40nM$ 、 $30nM$ 、 $25nM$ 、 $20nM$ 、 $19nM$ 、 $18nM$ 、 $17nM$ 、 $16nM$ 、 $15nM$ 、 $14nM$ 、 $13nM$ 、 $12nM$ 、 $11nM$ 、 $10nM$ 、 $9nM$ 、 $8nM$ 、 $7nM$ 、 $6nM$ 、 $5nM$ 、 $4nM$ 、 $3nM$ 、 $2nM$ もしくは $1nM$ もしくはそれ以下、または $400nM$ 、 $300nM$ 、 $200nM$ 、 $100nM$ 、 $50nM$ 、 $40nM$ 、 $30nM$ 、 $25nM$ 、 $20nM$ 、 $19nM$ 、 $18nM$ 、 $17nM$ 、 $16nM$ 、 $15nM$ 、 $14nM$ 、 $13nM$ 、 $12nM$ 、 $11nM$ 、 $10nM$ 、 $9nM$ 、 $8nM$ 、 $7nM$ 、 $6nM$ 、 $5nM$ 、 $4nM$ 、 $3nM$ 、 $2nM$ もしくは $1nM$ もしくはそれ以下未滿、または約 $400nM$ 、 $300nM$ 、 $200nM$ 、 $100nM$ 、 $50nM$ 、 $40nM$ 、 $30nM$ 、 $25nM$ 、 $20nM$ 、 $19nM$ 、 $18nM$ 、 $17nM$ 、 $16nM$ 、 $15nM$ 、 $14nM$ 、 $13nM$ 、 $12nM$ 、 $11nM$ 、 $10nM$ 、 $9nM$ 、 $8nM$ 、 $7nM$ 、 $6nM$ 、 $5nM$ 、 $4nM$ 、 $3nM$ 、 $2nM$ もしくは $1nM$ もしくはそれ以下である。

【0295】

いくつかの態様では、TIMは、 $0.001nM$ または約 $0.001nM$ から、約 $1000nM$ 、例えば、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $500nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $400nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $100nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $50nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $10nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $1nM$ 、 $0.01nM$ もしくは約 $0.01nM$ から、約 $0.1nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $500nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $400nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $100nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $50nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $10nM$ 、 $0.1nM$ もしくは約 $0.1nM$ から、約 $1nM$ 、 $0.5nM$ もしくは約 $0.5nM$ から、約 $200nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $500nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $100nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $50nM$ 、 $1nM$ もしくは約 $1nM$ から、約 $10nM$ 、 $2nM$ もしくは約 $2nM$ から、約 $50nM$ 、 $10nM$ もしくは約 $10nM$ から、約 $500nM$ 、 $10nM$ もしくは約 $10nM$ から、約 $100nM$ 、 $10nM$ もしくは約 $10nM$ から、約 $50nM$ 、 $50nM$ もしくは約 $50nM$ から、約 $500nM$ 、 $50nM$ もしくは約 $50nM$ から、約 $100nM$ 、または $100nM$ もしくは約 $100nM$ から、約 $500nM$ である、T細胞刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに対する結合親和性を示す。ある特定の態様では、刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに対するTIMの結合親和性は、 $400nM$ 、 $300nM$ 、 $200nM$ 、 $100nM$ 、 $50nM$ 、 $40nM$ 、 $30nM$ 、 $25nM$ 、 $20nM$ 、 $19nM$ 、 $18nM$ 、 $17nM$ 、 $16nM$ 、 $15nM$ 、 $14nM$ 、 $13nM$ 、 $12nM$ 、 $11nM$ 、 $10nM$ 、 $9nM$ 、 $8nM$ 、 $7nM$ 、 $6nM$ 、 $5nM$ 、 $4nM$ 、 $3nM$ 、 $2nM$ もしくは $1nM$ もしくはそれ以下である。

0nM、200nM、100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nMもしくは1nMもしくはそれ以下、または400nM、300nM、200nM、100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nMもしくは1nMもしくはそれ以下未満、または約400nM、300nM、200nM、100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nMもしくは1nMもしくはそれ以下である。

10

【0296】

いくつかの態様では、TIM、またはTIMを含むマルチドメイン免疫調節タンパク質は、T細胞刺激（例えば共刺激）受容体のアゴニストではない。いくつかの態様では、TIM、またはTIMを含むマルチドメイン免疫調節タンパク質は、T細胞共刺激受容体、例えば、CD28またはICOSに結合するが、T細胞共刺激受容体に対して比較的低い親和性を示す。いくつかの態様では、TIMは、 1×10^{-9} M超、例えば、 1×10^{-7} Mまたは約 1×10^{-7} Mから、 1×10^{-9} Mまたは約 1×10^{-9} Mの、T細胞共刺激受容体に対する結合親和性を有する。いくつかの態様では、TIMは、 1×10^{-7} Mもしくは約 1×10^{-7} M、 2.5×10^{-7} Mもしくは約 2.5×10^{-7} M、 5×10^{-7} Mもしくは約 5×10^{-7} M、 7.5×10^{-7} Mもしくは約 7.5×10^{-7} M、 1×10^{-8} Mもしくは約 1×10^{-8} M、 2.5×10^{-8} Mもしくは約 2.5×10^{-8} M、 5×10^{-8} Mもしくは約 5×10^{-8} M、 7.5×10^{-8} Mもしくは約 7.5×10^{-8} M、もしくは 1×10^{-9} Mもしくは約 1×10^{-9} M、または前述のいずれかの間の任意の値の、T細胞共刺激受容体に対する結合親和性を有する。

20

【0297】

いくつかの態様では、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質のTIMは、T細胞共刺激受容体に直接結合しない。いくつかの態様では、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質のTIMは、T細胞共刺激受容体のリガンドに結合する。

【0298】

いくつかの態様では、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質は、1つまたは複数のさらなる部分を有する形式を含む様々な構成または形式で、BIMおよびTIMを含むことができる。いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質は、1つまたは複数のBIMが、TIMに対してN末端側にあるポリペプチドを含む。いくつかの態様では、1つまたは複数のBIMは、TIMに対してC末端側にある。1つまたは複数のBIMと、1つまたは複数のTIMとは、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、連結され得る。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、Fcタンパク質などの多量体化ドメインとの融合を介して多量体分子として形式化され得る。いくつかの態様では、マルチドメイン免疫調節タンパク質は、多量体分子、例えば、二量体分子、三量体分子、四量体分子または五量体分子として形式化され得る。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、1つまたは複数のBIMおよび1つまたは複数のTIMの単一ポリペプチド融合体を含む単量体分子として形式化される。図16は、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質にいずれも包含され得る例示的な形式および構成を示す。

30

40

【0299】

以下のサブセクションには、そのような免疫調節タンパク質の例示的な形式と同様に、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の例示的なBIM成分およびTIM成分が記載されている。

【0300】

A. B細胞阻害分子（BIM）

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質は、B細胞刺激受容体の1つまたは複数のリガンドに結合するBIMを含む。いくつかの態様では、B細胞刺激受容体は、TNFRSFのメンバーである。いくつかの態様では、1つまたは複数のB細胞刺激受容体は、

50

TACIおよびBCMAである。いくつかの態様では、B細胞刺激受容体のリガンドは、BAFFまたはAPRILである。いくつかの態様では、BIMは、BAFF、APRIL、および/またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合する。いくつかの態様では、BIMは、BAFF、APRIL、およびBAFF/APRILヘテロ三量体に結合することができる。

【0301】

いくつかの態様では、BIMは、B細胞刺激受容体のリガンドに結合する抗体または抗原結合断片である。いくつかの態様では、BIMは、BAFFおよび/またはAPRIL、例えば、ヒトBAFFおよび/またはヒトAPRILに結合する抗体または抗原結合断片である。

【0302】

いくつかの態様では、BIMは、B細胞刺激受容体のリガンドの結合パートナーであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、本明細書において提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質は、可溶性タンパク質であり、かつ/または膜貫通ドメインを含む部分を含まない。当業者であれば、B細胞刺激受容体、例えば、BCMAおよびTACIなどのTNFRSFのタンパク質を含む細胞表面タンパク質が、典型的には、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメイン（ECD）を有すること、ならびにそのようなタンパク質の可溶性形態が、細胞外ドメインまたはその免疫学的に活性な部分配列を使用して作製され得ることを理解するであろう。したがって、いくつかの態様では、BIMは、B細胞刺激受容体、例えば、BCMAまたはTACIの膜貫通ドメインまたは膜貫通ドメインの一部を欠く。いくつかの態様では、BIMは、B細胞刺激受容体、例えば、BCMAまたはTACIの細胞内（細胞質）ドメインまたは細胞内ドメインの一部を欠く。いくつかの態様では、BIMは、CRDなどのTDを含むECDドメインもしくはその一部またはその特異的結合断片のみを含む。

【0303】

例えば、いくつかの局面では、BIMは、B細胞刺激受容体のリガンドに結合する、少なくとも1つのTD（例えば、少なくとも1つのCRD）を含む、B細胞刺激受容体のECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。例えば、BIMは、APRIL、BAFF、および/またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、少なくとも1つのTD（例えば、少なくとも1つのCRD）を含む、TACIもしくはBCMAのECD、またはTACIもしくはBCMAの特異的結合部分もしくは特異的結合断片を含むことができる。いくつかの態様では、BIMは、少なくとも1つのTD（例えば、少なくとも1つのCRD）を含む、B細胞刺激受容体のECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片からなるか、またはそれから本質的になり、例えば、少なくとも1つのTD（例えば、少なくとも1つのCRD）を含む、TACIもしくはBCMAのECD、もしくはTACIもしくはBCMAのECDの特異的結合部分もしくは特異的結合断片からなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、BIMは、B細胞刺激受容体のECDの完全長配列よりも短い。いくつかの態様では、BIMは、1つのCRD、もしくはCRDの特異的結合断片であるか、またはそれのみを含む。いくつかの態様では、BIMは、B細胞刺激受容体のCRDからなるかまたはそれから本質的になり、例えば、TACIまたはBCMAの1つのCRDのみからなるかまたはそれから本質的になる。いくつかの態様では、TD（例えば、少なくとも1つのCRD）を含むECDまたはその結合部分もしくは結合断片を含むBIMの配列は、限定されることなく、ヒト、マウス、カニクイザルまたはラットを含む哺乳動物配列である。いくつかの態様では、BIM配列は、ヒトであり、および/またはヒトタンパク質に結合する。

【0304】

いくつかの局面では、BIMは、同じ分子に対する非改変TDもしくは野生型TDの結合活性と比較して、結合活性の増加、例えば、B細胞刺激受容体のリガンドに対する結合親和性の増加を示す親和性改変ドメインであるvTDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、TNFRSFメンバー、例えば、BCMAまたはTACIのTDと比較して1つまたは複数のアミノ酸置換を有するvTDを含み、1つまたは複数のアミノ酸置換は、B細胞刺激受容体の同族リガンドに対する結合親和性の増加を付与するかまたはもたらす。

【0305】

いくつかの態様では、BIMは、B細胞刺激受容体のリガンドの結合パートナーの野生型TDもしくは非改変TDと比較して、1つもしくは複数のアミノ酸改変、例えば、1つもしくは複数の置換（substitution）（あるいは、「変異」または「置換（replacement）」）、欠失もしくは付加を含むvTDであるか、またはそれを含む。いくつかの局面では、vTDは、B細胞刺激受容体のTNFRSF結合パートナーのTDドメインに、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変、例えば、アミノ酸置換、欠失または付加を含む。改変（例えば置換）は、CRD中に存在し得る。いくつかの態様では、vTDは、CRDまたはその特異的結合断片に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変（例えば置換）を有する。いくつかの態様では、vTDは、野生型TDもしくは非改変TDまたはその特異的結合断片と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

10

【0306】

提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質におけるBIMの非限定的な例は、以下のサブセクションに記載されている。本明細書において記載されるBIMのいずれかは、セクションIII.Bに記載のTIMと組み合わせられ得る。

【0307】

1. TACI

20

いくつかの態様では、BIMは、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、少なくとも1つのTD（例えば、少なくとも1つのCRD）を含む野生型TACI ECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、少なくとも1つのTD（例えば、少なくとも1つのCRD）を含むバリエーションTACI ECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、本明細書において記載される配列のいずれかを有するTACIポリペプチドまたはそのバリエーションである。

【0308】

TACIは、システインリッチ擬似反復ドメイン（CRD）を含む細胞外ドメイン（ECD）を有することを特徴とする腫瘍壊死因子受容体ファミリーメンバーである。TACIは、2つのシステインリッチ擬似反復（CRD1およびCRD2）を含む細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、Jurkat細胞内で過剰発現された場合のNF-AT活性化の共誘導因子である、細胞内小胞に位置する内在性膜タンパク質であるCAML（カルシウムモジュレーターおよびシクロフィリンリガンド）と相互作用する細胞質ドメインとを有する膜結合受容体である。TACIは、B細胞、およびT細胞のサブセットに関連する。TACI受容体は、腫瘍壊死因子（TNF）リガンドファミリーの2つのメンバーに結合する。一方のリガンドは、BAFF（B cell Activating Factor of the TNF Family）と呼ばれるほか、ZTNF4、「ニュートロカイン-α」、「BLyS」、「TALL-1」および「THANK」と様々に呼ばれている（Yu et al., 国際公開番号WO98/18921（1998）, Moore et al., Science 285:269（1999）; Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem. 274:15978（1999）; Schneider et al., J. Exp. Med. 189:1747（1999）; Shu et al., J. Leukoc. Biol. 65:680（1999））。他方のリガンドは、APRILと呼ばれるほか、「ZTNF2」および「TNRFデスリガンド-1」と様々に呼ばれている（Hahne et al., J. Exp. Med. 188:1185（1998）; Kelly et al., Cancer Res. 60:1021（2000））。両リガンドはまた、B細胞成熟受容体（BCMA）によって結合される（Gross et al., Nature 404:995（2000））。そのリガンドであるBAFFまたはAPRILへのTACI受容体の結合は、T細胞非依存性B細胞抗体応答、アイソタイプスイッチングおよびB細胞恒常性を含むB細胞応答を刺激する。

30

40

【0309】

50

完全長TACIのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:666に記載されている。該タンパク質は、III型膜タンパク質であり、シグナルペプチドを欠く。真核細胞内での発現後、N末端メチオニンが除去される。いくつかの態様では、成熟TACIタンパク質は、SEQ ID NO:666に記載のN末端メチオニンを含まない。TACIの細胞外ドメイン（SEQ ID NO:666のアミノ酸残基1～166;SEQ ID NO:709に記載のECD）は、各々BAFFおよびAPRILへの結合に対する親和性を示す2つのシステインリッチドメイン（CRD、以下、腫瘍壊死ファミリー受容体ドメインまたはTDとも呼ばれる）を含む。第1のシステインリッチドメイン（CRD1）は、SEQ ID NO:709に記載の配列のアミノ酸残基34～66を含む。第2のシステインリッチドメイン（CRD2）は、SEQ ID NO:709に記載の配列のアミノ酸71～104に対応する。TACIはまた、SEQ ID NO:709に記載の配列のアミノ酸残基105～165に対応する、細胞外ドメイン内の2番目のシステインリピートに続く約60アミノ酸のストーク領域を含む。

10

【0310】

いくつかの態様では、BIMは、参照TACIポリペプチド、例えば、CRD（以下、TDとも呼ばれる）を含む野生型TACIポリペプチドまたは非改変TACIポリペプチドの細胞外ドメイン内の1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、1つまたは複数の置換（substitution）（あるいは、「変異」または「置換（replacement）」）、欠失または付加を含むバリエーションTACIポリペプチドである。したがって、バリエーションTACIポリペプチドである提供されるBIMは、1つもしくは複数のアミノ酸改変（例えば置換）がCRDにあるバリエーションTD（「vTD」）であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、1つまたは複数の置換（substitution）（あるいは、「変異」または「置換（replacement）」）、欠失または付加は、CRD1領域にある。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、1つまたは複数の置換（substitution）（あるいは、「変異」または「置換（replacement）」）、欠失または付加は、CRD2領域にある。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、1つまたは複数の置換（substitution）（あるいは、「変異」または「置換（replacement）」）、欠失または付加は、CRD1領域およびCRD2領域内のアミノ酸にある。

20

【0311】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、野生型TACI配列であるか、または一方もしくは両方のCRDを含むその一部である。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACIは、TACIの細胞外ドメイン（ECD）、もしくは一方もしくは両方のCRDドメインを含むその一部であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACIポリペプチドの細胞外ドメインは、CRD1およびCRD2を含む。ただし、バリエーションTACIポリペプチドは、CRD1およびCRD2の両方を含む必要はない。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、CRD1もしくはその特異的結合断片を含むか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、CRD2もしくはその特異的結合断片を含むか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIは、可溶性ポリペプチドであり、膜貫通ドメインを欠く。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、膜貫通ドメイン、および場合によっては細胞質ドメインもさらに含む。

30

40

【0312】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は哺乳動物TACI配列である。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、限定されることなく、ヒト、マウス、カニクイザルまたはラットを含む哺乳動物TACIであり得る。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列はヒトである。例示的なヒトTACI配列の細胞外ドメインは、SEQ ID NO:709に記載されている。

【0313】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、（i）SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列、もしくはN末端メチオニンを欠くその配列；（ii）SEQ ID NO:709に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%

50

、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を有するか；または (iii) は、CRD1および/もしくはCRD2を含む (i) もしくは (ii) の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i) もしくは (ii) の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、SEQ ID NO:709に記載のN末端メチオニンを欠く。

TACI細胞外ドメイン (ECD) :SEQ ID NO:709
MSGLGRSRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTSCMCKTICNHQSQ
RTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAFYFCENKLRSVPVNLPELRR
QRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVALVYST

10

【0314】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列と比較してN末端欠失を含むECDの一部である、TACIの細胞外ドメイン配列である。いくつかの態様では、N末端欠失は、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～28の欠失である。いくつかの態様では、N末端欠失は、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～29の欠失である。いくつかの態様では、N末端欠失は、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～30の欠失である。いくつかの態様では、N末端欠失は、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～31の欠失である。いくつかの態様では、N末端欠失は、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～32の欠失である。いくつかの態様では、N末端欠失は、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～33の欠失である。

20

【0315】

提供される態様のいずれかのいくつかでは、参照（例えば非改変）TACI配列は、TACI細胞外ドメインのストーク部分の1つまたは複数の残基の欠失を含むECD部分である。いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、SEQ ID NO:709に記載のECD配列の残基に対応する残基105から始まり、アミノ酸残基166までの、またはアミノ酸残基166を含む1つまたは複数の連続C末端アミノ酸残基を欠くECD部分である。いくつかの態様では、ECD配列の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62が欠失している。

30

【0316】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、CRD1および/またはCRD2（例えば、CRD1およびCRD2、またはCRD2のみ）と、ストーク配列のセグメントまたは一部のみと、を含む、連続アミノ酸配列を有するECD部分を含む。好適なストークセグメントは、SEQ ID NO:709のアミノ酸残基105～154の1つまたは複数のアミノ酸を含む。例えば、ストークセグメントは、SEQ ID NO:709を基準として、アミノ酸残基105、アミノ酸残基105～106、アミノ酸残基105～107、アミノ酸残基105～108、アミノ酸残基105～109、アミノ酸残基105～110、アミノ酸残基105～111、アミノ酸残基105～112、アミノ酸残基105～113、アミノ酸残基105～114、アミノ酸残基105～115、アミノ酸残基105～116、アミノ酸残基105～117、アミノ酸残基105～118、アミノ酸残基105～119、アミノ酸残基105～120、アミノ酸残基105～121、アミノ酸残基105～122、アミノ酸残基105～123、アミノ酸残基105～124、アミノ酸残基105～125、アミノ酸残基105～126、アミノ酸残基105～127、アミノ酸残基105～128、アミノ酸残基105～129、アミノ酸残基105～130、アミノ酸残基105～131、アミノ酸残基105～132、アミノ酸残基105～133、アミノ酸残基105～134、ア

40

50

ミノ酸残基105～135、アミノ酸残基105～136、アミノ酸残基105～137、アミノ酸残基105～138、アミノ酸残基105～139、アミノ酸残基105～140、アミノ酸残基105～141、アミノ酸残基105～142、アミノ酸残基105～143、アミノ酸残基105～144、アミノ酸残基105～145、アミノ酸残基105～146、アミノ酸残基105～147、アミノ酸残基105～148、アミノ酸残基105～149、アミノ酸残基105～150、アミノ酸残基105～151、アミノ酸残基105～152、アミノ酸残基105～153、およびアミノ酸残基105～154からなり得る。

【0317】

いくつかの態様では、参照（例えば非改変）TACI配列は、1つもしくは複数の潜在的なフューリン切断部位を欠くか、または1つもしくは複数の潜在的なフューリン切断部位が変異している。場合によっては、参照（例えば非改変）TACI配列は、119位のアルギニン残基が変異している（例えばR119G）ECDまたは部分である。場合によっては、参照（例えば非改変）TACI配列は、121位のグルタミン残基が変異している（例えばQ121P）ECDまたは部分である。場合によっては、参照（例えば非改変）TACI配列は、122位のアルギニン残基が変異している（例えばR122Q）ECDまたは部分である。

10

【0318】

いくつかの態様では、参照TACI配列は、国際PCT公開番号WO2000/067034、WO2002/094852またはWO2008/154814に記載されているTACI ECD配列である。

【0319】

いくつかの態様では、参照TACI配列は、SEQ ID NO:719に記載の配列を有するかまたはそれからなるTACI ECD配列である。

20

TACI ECD (CRD1/CRD2):SEQ ID NO:719
SRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLLGTCTMSCKTICNHQSQR TCAAFCRSL
CRKEQGKIFYD HLLRDCISCA SICGQHPKQCAAYFCENKLRS PVNLPPEL

【0320】

いくつかの態様では、参照TACI配列は、SEQ ID NO:718に記載の配列を有するかまたはそれからなるTACI ECD配列である。

TACI ECD (CRD1/CRD2):SEQ ID NO:718
AMRSCPEEQYWDPLLGTCTMSCKTICNHQSQR TCAAFCRSLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISC
ASICGQHPKQCAAYFCENKLRS

30

【0321】

いくつかの態様では、参照TACI配列は、SEQ ID NO:516に記載の配列を有するかまたはそれからなる（SEQ ID NO:551に記載のヌクレオチド配列によってコードされる）TACI ECD配列である。

TACI ECD (CRD1/CRD2):SEQ ID NO:516
VAMRSCPEEQYWDPLLGTCTMSCKTICNHQSQR TCAAFCRSLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCA
SICGQHPKQCAAYFCENKLRS

40

【0322】

いくつかの態様では、参照TACI配列は、CRD2配列のみから本質的になり、CRD1の配列の全体、およびストーク領域の実質的に全部が欠失または欠如している、TACIの細胞外ドメイン領域である。以前の試験では、ストーク領域内の残基がプロテアーゼ切断部位を含み得ることが示されているが、少なくともCRD1およびCRD2は、その同族リガンドに対するTACIの十分な発現および/または結合活性のために必要であると考えられた。例えば、国際PCT公開番号WO2002/094852では、CRD1およびCRD2を含むが、アミノ末端領域全体、およびストーク領域の部分配列が欠失しているTACI分子が、発現された場合にタンパク質分解の減少を示すことが実証された。他の試験では、CRD1の前のN末端領域の少なくとも一部が、その同族リガンドに対するTACIの十分な結合活性の

50

ために必要であったことが示され、例えば、TACI細胞外領域の残基13～118または13～108が、発現中のTACIの分解を最小限に抑えながら、生物学的活性のために必要であると決定された国際公開番号WO2008/154814を参照されたい。驚くべきことに、ストーク領域の小さな部分を有するCRD2のみから本質的になるTACI細胞外領域は、CRD1およびCRD2の両方を含むさらに長いTACI分子と比較して、実質的に改善された同族結合活性を示すことが本明細書において見出される（例えば、実施例8）。

【0323】

いくつかの態様では、BIMは、例えば、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列と比較して、CRD2を含み、N末端領域およびCRD1が欠失し、TACI細胞外ドメインのストーク部分の1つまたは複数の残基が欠失した、TACI細胞外ドメイン（ECD）領域の一部であるTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、CRD2を含むTACI細胞外ドメインの一部は、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するアミノ酸残基71～104を含む。提供される態様では、免疫調節タンパク質のBIMは、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～66の欠失を含むTACIポリペプチドである。提供される態様では、免疫調節タンパク質のBIMは、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～67の欠失を含むTACIポリペプチドである。提供される態様では、免疫調節タンパク質のBIMは、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～68の欠失を含むTACIポリペプチドである。提供される態様では、免疫調節タンパク質のBIMは、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～69の欠失を含むTACIポリペプチドである。提供される態様では、免疫調節タンパク質のBIMは、SEQ ID NO:709に記載の残基に対応するN末端アミノ酸残基1～70の欠失を含むTACIポリペプチドである。任意のそのような態様のいくつかでは、免疫調節タンパク質のBIMは、SEQ ID NO:709に記載のECD配列の残基に対応する残基105から始まり、アミノ酸残基166までの、またはアミノ酸残基166を含む1つまたは複数の連続C末端アミノ酸残基を欠く、TACIポリペプチドである。いくつかの態様では、ECD配列の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62が欠失している。

【0324】

いくつかの態様では、本明細書において提供される免疫調節タンパク質のBIMは、例えば、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列と比較して、CRD2（例えば、SEQ ID NO:709を基準として、残基71～104）を含むが、N末端領域およびCRD1が欠失し、TACI細胞外ドメインのストーク部分の1つまたは複数の残基が欠失した、TACI ECDの連続アミノ酸配列を有するECD部分を含む配列を有するTACIポリペプチドである。例えば、TACI ECD部分は、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸残基を基準として、アミノ酸残基67～118、アミノ酸残基67～117、アミノ酸残基67～116、アミノ酸残基67～115、アミノ酸残基67～114、アミノ酸残基67～113、アミノ酸残基67～112、アミノ酸残基67～111、アミノ酸残基67～110、アミノ酸残基67～109、アミノ酸残基67～108、アミノ酸残基67～107、アミノ酸残基67～106、アミノ酸残基67～105、またはアミノ酸残基67～104からなり得る。いくつかの例では、TACI ECD部分は、SEQ ID NO:709に記載の残基を基準として、アミノ酸残基68～118、アミノ酸残基68～117、アミノ酸残基68～116、アミノ酸残基68～115、アミノ酸残基68～114、アミノ酸残基68～113、アミノ酸残基68～112、アミノ酸残基68～111、アミノ酸残基68～110、アミノ酸残基68～109、アミノ酸残基68～108、アミノ酸残基68～107、アミノ酸残基68～106、アミノ酸残基68～105、またはアミノ酸残基68～104からなり得る。いくつかの例では、TACI ECD部分は、SEQ ID NO:709に記載の残基を基準として、アミノ酸残基69～118、アミノ酸残基69～117、アミノ酸残基69～116、アミノ酸残基69～115、アミノ酸残基69～114、アミノ酸残基69～113、アミノ酸残基69～112、アミノ酸残基69～111、アミノ酸残基69～110、アミノ酸残基69～109、アミノ酸

残基69～108、アミノ酸残基69～107、アミノ酸残基69～106、アミノ酸残基69～105、またはアミノ酸残基69～104からなり得る。いくつかの例では、TACI ECD部分は、SEQ ID NO:709に記載の残基を基準として、アミノ酸残基70～118、アミノ酸残基70～117、アミノ酸残基70～116、アミノ酸残基70～115、アミノ酸残基70～114、アミノ酸残基70～113、アミノ酸残基70～112、アミノ酸残基70～111、アミノ酸残基70～110、アミノ酸残基70～109、アミノ酸残基70～108、アミノ酸残基70～107、アミノ酸残基70～106、アミノ酸残基70～105、またはアミノ酸残基70～104からなり得る。いくつかの例では、TACI ECD部分は、SEQ ID NO:709に記載の残基を基準として、アミノ酸残基71～118、アミノ酸残基71～117、アミノ酸残基71～116、アミノ酸残基71～115、アミノ酸残基71～114、アミノ酸残基71～113、アミノ酸残基71～112、アミノ酸残基71～111、アミノ酸残基71～110、アミノ酸残基71～109、アミノ酸残基71～108、アミノ酸残基71～107、アミノ酸残基71～106、アミノ酸残基71～105、またはアミノ酸残基71～104からなり得る。上記TACI ECD配列のいずれかはまた、本明細書において提供される免疫調節タンパク質内のバリエーションTACIであるTIMに従ったTACI参照配列であり得、そのような免疫調節タンパク質は、そのようなTACI参照配列と比較して本明細書において記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば置換）によって改変されたバリエーションTACIポリペプチドを含む。

10

【0325】

特に、提供される免疫調節タンパク質内のBIMの中には、SEQ ID NO:528に記載の配列を有するかまたはそれからなる（SEQ ID NO:563に記載のヌクレオチド配列によってコードされるTACI ECD配列がある。いくつかの態様では、参照TACI配列は、SEQ ID NO:528に記載の配列を有するか、またはそれからなり、提供されるバリエーションTACIポリペプチドは、そのような参照TACI配列と比較して、本明細書において記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば置換）によって改変されている。

20

TACI ECD配列 (CRD2): SEQ ID NO:528

SLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

【0326】

提供される免疫調節タンパク質内のBIMの中には、バリエーションTACIポリペプチドがある。提供される態様のいずれかのいくつかでは、バリエーションTACI配列は、参照（例えば非改変）TACI配列の配列、例えば上記のいずれかを有するが、もう1つのアミノ酸改変、例えば、1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む。特に、バリエーションTACIポリペプチドが、参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチドと比較して、APRILまたはBAFFの一方または両方に対して変更された（例えば、増加した）結合活性または結合親和性を示すように、本明細書において提供されるBIMは、参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチドのTDドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含む少なくとも1つの親和性改変TDドメイン（例えば、CRD1および/またはCRD2）またはその特異的結合断片を含むバリエーションTACIポリペプチドであってよい。いくつかの態様では、BIMは、例えば、固相ELISAイムノアッセイ、フローサイトメトリーまたはBiacoreアッセイによって決定される場合、参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチド対照配列の結合親和性とは異なる、APRILおよび/またはBAFFに対する結合親和性を有するバリエーションTACIポリペプチドである。同族結合パートナーの各々に対する結合親和性は独立している。すなわち、いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性と、APRILまたはBAFFの他方に対して低下したまたは変化しない結合親和性を有する。

30

40

【0327】

いくつかの態様では、BIMは、参照（非改変または野生型）TACIポリペプチドと比較して、BAFFに対して増加した結合親和性を有するバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、参照（非改変または野生型）TACIポリペプチドと比較

50

して、APRILに対して増加した結合親和性を有するバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、参照（非改変または野生型）TACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和性を有するバリエーションTACIポリペプチドである。同族リガンドBAFFおよび/またはAPRILは、哺乳動物タンパク質、例えば、ヒトタンパク質またはマウスタンパク質であり得る。いくつかの態様では、APRILおよび/またはBAFFに対して増加したまたは増大した結合親和性を有するバリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチド対照と比較して、少なくとも約5%、例えば、少なくとも約10%、15%、20%、25%、35%または50%の結合親和性の増加を有する。いくつかの態様では、参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチドと比較した結合親和性の増加は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍または50倍を超える。例のいずれかでは、参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば置換）を含まないことを除いて、バリエーションTACIポリペプチドと同じ配列を有する。

10

20

30

40

50

【0328】

いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの平衡解離定数 (K_d) は、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ または $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、または $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満であり得る。いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、もしくは $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、または約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、もしくは $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満である。いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ から、 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ または約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ である。いくつかの態様では、BAFFに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $6 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $8 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $8 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $6 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $8 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $8 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、もしくは $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、または前述のいずれかの間の任意の値である。いくつかの態様では、提供される態様におけるBIMは、上記のバリエーションTACIポリペプチドであり、BAFFに対する K_d は、1.5倍を超えて、または約1.5倍を超えて、例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上を超えて、または約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上を超えて減少する（結合親和性の増大）。

【0329】

いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの平衡解離定数 (K_d) は、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ または $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、または $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満であり得る。いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、もしくは $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、または約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、もしくは $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満である。いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ から、 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ または約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ である。いくつかの態様では、APRILに対する前述の態様のいずれかの K_d は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ もしくは約 $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $6 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $8 \times 10^{-10} \text{ M}$ もしくは約 $8 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $2 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $4 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $6 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $6 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $8 \times 10^{-11} \text{ M}$ もしくは約 $8 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、も

しくは 1×10^{-12} Mもしくは約 1×10^{-12} M、または前述のいずれかの間の任意の値である。いくつかの態様では、提供される態様のBIMは、上記のバリエーションTACIポリペプチドであり、APRILに対する K_d は、1.5倍を超えて、または約1.5倍を超えて、例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上を超えて、または約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上を超えて減少する（結合親和性の増大）。

【0330】

参照（例えば、非改変または野生型）TACI配列は、本明細書において記載されるバリエーションTACIポリペプチドであるBIMを生成するための出発組成物として必ずしも使用される必要はない。したがって、用語「改変」、例えば「置換」の使用は、本態様が、バリエーションTACIポリペプチドまたはそれを含む免疫調節タンパク質を作製する特定の方法に限定されることを意味しない。バリエーションTACIポリペプチドは、例えばデノボペプチド合成によって作製され得、したがって、改変、例えば置換をコードするようにコドンを変化させるという意味で、「置換」などの改変を必ずしも必要としない。この原理は、同様に特定の作製方法の意味しない、アミノ酸残基の「付加」および「欠失」という用語にも及ぶ。バリエーションTACIポリペプチドを設計または作製する手段は、特定の方法に限定されない。ただし、いくつかの態様では、参照（例えば、非改変または野生型）TACIコード核酸は、参照（例えば、非改変または野生型）TACI遺伝物質から変異誘発され、所望の特異的結合親和性または他の機能活性についてスクリーニングされる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、任意の数の公的に入手可能なデータベースで利用可能なタンパク質または核酸配列を利用してデノボで合成され、次いでスクリーニングされる。国立バイオテクノロジー情報センターはそのような情報を提供し、そのウェブサイトは、前述のUniProtKBデータベースのようにインターネットを介して公的にアクセス可能である。

【0331】

特に指示しない限り、本開示全体を通して示されるように、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMのアミノ酸改変への言及は、SEQ ID NO:709に記載の参照ECD配列の位置のナンバリングに対応するアミノ酸位置番号によって指定される。例えば、参照配列（例えば、SEQ ID NO:516または528）とSEQ ID NO:709とのアライメントなどによって、そのTD（例えば、CRD1および/またはCRD2）を含むその一部を含むTACIポリペプチド内の改変、例えばアミノ酸置換の対応する位置を同定することは、当業者のレベルの範囲内である。対応する残基を同定するアライメントを図17Aに例示する。本開示全体にわたる改変の一覧では、アミノ酸位置は中央に示されており、対応する参照（例えば、非改変または野生型）アミノ酸は、番号の前に列挙され、同定されたバリエーションアミノ酸置換は、番号の後に列挙されている。改変がその位置の欠失である場合、「del」が示され、改変がその位置での挿入である場合、「ins」が示されている。場合によっては、挿入は、中央に示されたアミノ酸位置とともに列挙され、対応する参照アミノ酸は、番号の前後に列挙され、同定されたバリエーションアミノ酸挿入は、非改変（例えば野生型）アミノ酸の後に列挙されている。

【0332】

いくつかの態様では、BIMは、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば、記載されているいずれかなどの参照（例えば、非改変または野生型）TACI配列内の置換を有するバリエーションTACIポリペプチドである。1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、参照（例えば、非改変または野生型）TACI配列のエクトドメイン（細胞外ドメイン）内に存在し得る。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、CRD1ドメインまたはその特異的結合断片内にある。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、CRD2ドメインまたはその特異的結合断片内にある。バリエーションTACIポリペプチドのいくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換の一部は、CRD1ドメインまたはその特異的結合断片内にあり、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換の一部は、CRD2ドメインまたはその特異的結合断片内にある。

【0333】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変、例えば置換を有する。改変、例えば置換は、CRD1ドメインまたはCRD2ドメイン内に存在し得る。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、CRD1ドメインまたはその特異的結合断片内に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、CRD2ドメインまたはその特異的結合断片内に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含むバリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:516、528または709のアミノ酸配列などを有する参照（例えば、非改変または野生型）TACIポリペプチドまたはその特異的結合断片と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含むバリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:709のアミノ酸配列と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含むバリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:516のアミノ酸配列と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、記載される1つまたは複数のアミノ酸改変（例えばアミノ酸置換）を含むバリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:528のアミノ酸配列と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0334】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:709のナンバリングを基準として、40、59、60、61、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103位に対応する参照TACIポリペプチドまたはその特異的結合断片に置換などの1つまたは複数のアミノ酸改変を有する。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、W40R、Q59R、R60G、T61P、E74V、Q75E、Q75R、G76S、K77E、F78Y、Y79F、L82H、L82P、L83S、R84G、R84L、R84Q、D85E、D85V、C86Y、I87L、I87M、S88N、I92V、Q95R、P97S、K98T、Q99E、A101D、Y102D、F103S、F103V、F103Y、またはその保存的アミノ酸置換から選択される置換などの1つまたは複数のアミノ酸改変を有する。いくつかの態様では、参照TACIポリペプチドは、CRD1ドメインまたはCRD2ドメインを含み、例えば、参照TACIポリペプチドは、SEQ ID NO:516またはSEQ ID NO:709に記載されている。

【0335】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、CRD2ドメインのみにある。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:709のナンバリングを基準として、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103位に対応する参照TACIポリペプチドまたはその特異的結合断片に置換などの1つまたは複数のアミノ酸改変を有する。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、E74V、Q75E、Q75R、G76S、K77E、F78Y、Y79F、L82H、L82P、L83S、R84G、R84L、R84Q、D85E、D85V、C86Y、I87L、I87M、S88N、I92V、Q95R、P97S、K98T、Q99E、A101D、Y102D、F103S、F103V、F103Y、またはその保存的アミノ酸置換から選択される置換などの1つまたは複数のアミノ酸改変を有する。いくつかの態様では、参照TACIポリペ

ブチドは、CRDドメインのうち、CRD2ドメインのみを含むが、CRD1ドメインを欠き、例えば、参照TACIポリペプチドは、SEQ ID NO:528に記載されている。したがって、いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、CRD2ドメインを含むがCRD1ドメインを欠くTACIポリペプチドのECD配列の一部を含む。

【0336】

保存的アミノ酸改変、例えば置換は、参照（例えば非改変）または野生型アミノ酸以外の、置換アミノ酸と同じクラスのアミノ酸に含まれる任意のアミノ酸である。アミノ酸のクラスは、脂肪族（グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）、ヒドロキシルまたは硫黄含有（セリン、システイン、トレオニンおよびメチオニン）、環状（プロリン）、芳香族（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）、塩基性（ヒスチジン、リジンおよびアルギニン）、および酸性/アミド（アスパルテート、グルタメート、アスパラギンおよびグルタミン）である。

10

【0337】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:709のナンバリングを基準として75位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、75位のアミノ酸置換は、アミノ酸置換を含まない参照（例えば、野生型または非改変）TACIポリペプチドと比較して、BAFFまたはAPRILに対する結合の増加を付与する。いくつかの態様では、置換アミノ酸は、酸性アミノ酸またはアミド、例えば、参照（例えば、野生型または非改変）TACIポリペプチドと比較して異なる酸性アミノ酸またはアミドである。いくつかの態様では、75位の置換アミノ酸はグルタミン酸（Glu、E）である。いくつかの態様では、75位の置換アミノ酸はアスパラギン酸（Asp、D）である。いくつかの態様では、75位の置換アミノ酸はアスパラギン（Asn、N）である。いくつかの態様では、75位の置換アミノ酸はグルタミン（Gln、Q）である。

20

【0338】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:709のナンバリングを基準として77位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、77位のアミノ酸置換は、アミノ酸置換を含まない参照（例えば、野生型または非改変）TACIポリペプチドと比較して、BAFFまたはAPRILに対する結合の増加を付与する。いくつかの態様では、77位の置換アミノ酸は、酸性アミノ酸またはアミドである。いくつかの態様では、77位の置換アミノ酸はグルタミン酸（Glu、E）である。いくつかの態様では、77位の置換アミノ酸はアスパラギン酸（Asp、D）である。いくつかの態様では、77位の置換アミノ酸はアスパラギン（Asn、N）である。いくつかの態様では、77位の置換アミノ酸はグルタミン（Gln、Q）である。

30

【0339】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:709のナンバリングを基準として78位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、78位のアミノ酸置換は、アミノ酸置換を含まない参照（例えば、野生型または非改変）TACIポリペプチドと比較して、BAFFまたはAPRILに対する結合の増加を付与する。いくつかの態様では、78位の置換アミノ酸は、芳香族アミノ酸、例えば、参照（例えば、野生型または非改変）TACIポリペプチドと比較して異なる芳香族アミノ酸である。いくつかの態様では、78位の置換アミノ酸はフェニルアラニン（Phe、F）である。いくつかの態様では、78位の置換アミノ酸はチロシン（Tyr、Y）である。いくつかの態様では、78位の置換アミノ酸はトリプトファン（Trp、W）である。

40

【0340】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:709のナンバリングを基準として84位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、84位のアミノ酸置換は、アミノ酸置換を含まない参照（例えば、野生型または非改変）TACIポリペプチドと比較して、BAFFまたはAPRILに対する結合の増加を付与する。いくつかの態様では、84位の置換アミノ酸は、酸性アミノ酸またはアミドである。いくつかの態様では、84位の置換アミノ酸はグルタミン酸（Glu、E）である。いく

50

つかの態様では、84位の置換アミノ酸はアスパラギン酸（Asp、D）である。いくつかの態様では、84位の置換アミノ酸はアスパラギン（Asn、N）である。いくつかの態様では、84位の置換アミノ酸はグルタミン（Gln、Q）である。

【0341】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:709のナンバリングを基準として102位に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、102位のアミノ酸置換は、アミノ酸置換を含まない参照（例えば、野生型または非改変）TACIポリペプチドと比較して、BAFFまたはAPRILに対する結合の増加を付与する。いくつかの態様では、102位の置換アミノ酸は、酸性アミノ酸またはアミドである。いくつかの態様では、102位の置換アミノ酸はグルタミン酸（Glu、E）である。いくつかの態様では、102位の置換アミノ酸はアスパラギン酸（Asp、D）である。いくつかの態様では、102位の置換アミノ酸はアスパラギン（Asn、N）である。いくつかの態様では、102位の置換アミノ酸はグルタミン（Gln、Q）である。

10

【0342】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換E74Vを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換Q75Eを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換K77Eを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換F78Yを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換Y79Fを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換L82Hを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換L82Pを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換R84Gを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換R84Lを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換R84Qを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換D85Vを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換C86Yを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、少なくとも1つのアミノ酸置換Y102Dを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、前述のいずれか2つ以上のうちの2つ以上のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、前述のいずれかの保存的アミノ酸置換である1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。

20

30

40

【0343】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換E74Vを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換Q75Eを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換K77Eを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換F78Yを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換Y79Fを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換L82Hを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換L82Pを含む。いくつかの態様では、バ

50

リアントTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換R84Gを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換R84Lを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換R84Qを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換D85Vを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換C86Yを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換Y102Dを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、前述のいずれか2つ以上のうちの2つ以上のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、前述のいずれかの保存的アミノ酸置換であるアミノ酸置換のうちの1つまたは複数を含む。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換はD85E/K98Tである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はI87L/K98Tである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はR60G/Q75E/L82Pである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はR60G/C86Yである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はW40R/L82P/F103Yである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はW40R/Q59R/T61P/K98Tである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はL82P/I87Lである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はG76S/P97Sである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はK77E/R84L/F103Yである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はY79F/Q99Eである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はL83S/F103Sである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はK77E/R84Qである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はK77E/A101Dである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はK77E/F78Y/Y102Dである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はQ75E/R84Qである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はQ75R/R84G/I92Vである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はK77E/A101D/Y102Dである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はR84Q/S88N/A101Dである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はR84Q/F103Vである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はK77E/Q95R/A101Dである。いくつかの態様では、アミノ酸置換はI87M/A101Dである。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。

10

20

30

40

50

【0344】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換K77EおよびF78Y (K77E/F78Y) を含む。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。

【0345】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換K77EおよびY102D (K77E/Y102D) を含む。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列にアミノ酸置換を

含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。

【0346】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換F78YおよびY102D (F78Y/Y012D) を含む。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。

10

【0347】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換K77E、F78YおよびY102D (K77E/F78Y/Y102D) を含む。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。

20

【0348】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、アミノ酸置換Q75E/R84Qを含む。提供される態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、記載される任意の参照TACIポリペプチド配列にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:516に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:528に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:718に記載の参照TACI配列にある。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:719に記載の参照TACI配列にある。

30

【0349】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、表2に列挙された変異のいずれかを含む。表2はまた、参照（例えば非改変）TACIポリペプチドおよび例示的なバリエーションTACIポリペプチドのSEQ ID NOを参照することにより、例示的な配列を提示する。示されるように、所与のドメインに対応する正確な遺伝子座または残基は、例えば、そのドメインを同定または分類するために使用される方法に応じて変動し得る。また、場合によっては、所与のドメイン（例えばCRD）の隣接するN末端アミノ酸および/またはC末端アミノ酸もまた、例えば、発現された場合にドメインの適切なフォールディングを確実にするために、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMの配列に含めることができる。したがって、表2のSEQ ID NOの例示は限定と解釈されるべきではないことが理解される。例えば、バリエーションTACIポリペプチドの特定のドメイン、例えば、ECDドメイン、またはCRD1/CRD2、もしくはCRD2のみを含むその一部は、それぞれのSEQ ID NOに記載のアミノ酸配列よりも数アミノ酸長くまたは短く、例えば、1~10、例えば、1、2、3、4、5、6または7アミノ酸長くまたは短くてよい。

40

【0350】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、表2に列挙された変異（アミノ酸置換）のいずれかを含む。いくつかの例では、変異（アミノ酸置換）は、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列を含む参照TACI内に作製される。いくつかの例では、変異（アミノ酸置換）は、例えば、SEQ ID NO:516に記載されているように、T

50

ACIのCRD1ドメインおよびCRD2ドメインを含む参照TACI内に作製される。いくつかの例では、変異（アミノ酸置換）は、例えば、SEQ ID NO:528に記載されているように、CRD2を保持するためにN末端アミノ酸残基およびC末端アミノ酸残基の欠失によってさらに切断された参照TACI内に作製される。

【0351】

用語「改変」、例えば、「置換」または「変異」の使用は、本態様が、免疫調節タンパク質を作製する特定の方法に限定されることを意味しない。バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、例えばデノボペプチド合成によって作製され得、したがって、改変、例えば置換をコードするようにコドンを変化させるという意味で、「置換」などの改変を必ずしも必要としない。この原理は、同様に特定の作製方法の意味しない、アミノ酸残基の「付加」および「欠失」という用語にも及ぶ。vTDを設計または作製する手段は、特定の方法に限定されない。ただし、いくつかの態様では、野生型TDコード核酸または非改変TDコード核酸は、野生型TD遺伝物質または非改変TD遺伝物質から変異誘発され、所望の特異的結合活性、例えば、結合親和性、および/またはNF- κ B調節もしくは他の機能活性の変化についてスクリーニングされる。いくつかの態様では、vTDは、任意の数の公的に入手可能なデータベースで利用可能なタンパク質または核酸配列を利用してデノボで合成され、次いでスクリーニングされる。国立バイオテクノロジー情報センターはそのような情報を提供し、そのウェブサイトは、UniProtKBデータベースのようにインターネットを介して公的にアクセス可能である。

【0352】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、CRD1およびCRD2を含む細胞外ドメイン（ECD）配列、例えば、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに記載のバリエーションTACIポリペプチドを含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つの特異的結合断片を含み、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

【0353】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに記載のバリエーションTACI細胞外ドメイン（ECD）配列からなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、もしくは99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列からなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つの特異的結合断片からなるか、またはそれから本質的になり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

【0354】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチド、例えば、SEQ ID NO:529~5

35、538～550、673～681のいずれか1つに記載のバリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、参照TACIポリペプチドのCRD2を含むがCRD1を欠く細胞外ドメイン（ECD）配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681のいずれか1つの特異的結合断片を含み、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

10

【0355】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681のいずれか1つに記載の配列からなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、もしくは99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列からなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681のいずれか1つの特異的結合断片からなるか、またはそれから本質的になり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

20

【0356】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドがSEQ ID NO:535に記載の配列を含むものである。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:535に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:535に記載の配列からなる。

30

【0357】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドがSEQ ID NO:541に記載の配列を含むものである。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:541に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:541に記載の配列からなる。

40

【0358】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドがSEQ ID NO:542に記載の配列を含むものである。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:542に記載の配列から本質的になる。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:542に記載の配列からなる。

【0359】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドがSEQ ID NO:688に記載の配列を含むものである。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:688に記載の配列から本質的になる。

50

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:688に記載の配列からなる。

【0360】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドがSEQ ID NO:552~562、571または572のいずれかに記載のヌクレオチド配列によってコードされるものである。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:552~562、571または572のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0361】

いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドであるBIMは、バリエーションTACIポリペプチドがSEQ ID NO:564~570または573~585のいずれかに記載のヌクレオチド配列によってコードされるものである。いくつかの態様では、バリエーションTACIポリペプチドは、SEQ ID NO:564~570または573~585のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0362】

（表2）例示的なバリエーションTACI BIM

30

40

50

名称	変異	ECD (CRD1/CRD2)		ECD (CRD2)	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
516 (WT) TACI CRD1/CRD2 528 (WT) TACI CRD2	野生型	516	551	528	563
517 TACI CRD1/CRD2 673 TACI CRD2	L82P	517	552	673	
518 TACI CRD1/CRD2 674 TACI CRD2	D85E, K98T	518	553	674	
519 TACI CRD1/CRD2 675 TACI CRD2	I87L, K98T	519	554	675	
520 TACI CRD1/CRD2	R60G, Q75E, L82P	520	555		
521 TACI CRD1/CRD2	R60G, C86Y	521	556		
522 TACI CRD1/CRD2 676 TACI CRD2	A101D	522	557	676	
523 TACI CRD1/CRD2 677 TACI CRD2	C86Y	523	558	677	
524 TACI CRD1/CRD2	W40R, L82P, F103Y	524	559		
525 TACI CRD1/CRD2	W40R, Q59R, T61P, K98T	525	560		
526 TACI CRD1/CRD2 678 TACI CRD2	L82P, I87L	526	561	678	
527 TACI CRD1/CRD2 679 TACI CRD2	G76S, P97S	527	562	679	
682 TACI CRD1/CRD2 529 TACI CRD2	D85V	682		529	564
683 TACI CRD1/CRD2 530 TACI CRD2	E74V	683		530	565
684 TACI CRD1/CRD2 531 TACI CRD2	R84L	684		531	566
685 TACI CRD1/CRD2 532 TACI CRD2	K77E, R84L, F103Y	685		532	567
686 TACI CRD1/CRD2 533 TACI CRD2	Y79F, Q99E	686		533	568

10

20

30

40

50

名称	変異	ECD (CRD1/CRD2)		ECD (CRD2)	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
687 TACI CRD1/CRD2 534 TACI CRD2	Y79F	687		534	569
536 TACI CRD1/CRD2 680 TACI CRD2	R84G	688		535	570
536 TACI CRD1/CRD2 680 TACI CRD2	L83S, F103S	536	571	680	
537 TACI CRD1/CRD2 681 TACI CRD2	L82H	537	572	681	
689 TACI CRD1/CRD2 538 TACI CRD2	A101D	689		538	573
690 TACI CRD1/CRD2 539 TACI CRD2	K77E, R84Q	690		539	574
691 TACI CRD1/CRD2 540 TACI CRD2	K77E, A101D	691		540	575
692 TACI CRD1/CRD2 541 TACI CRD2	K77E, F78Y, Y102D	692		541	576
693 TACI CRD1/CRD2 542 TACI CRD2	Q75E, R84Q	693		542	577
694 TACI CRD1/CRD2 543 TACI CRD2	Q75R, R84G, I92V	694		543	578
695 TACI CRD1/CRD2 544 TACI CRD2	K77E, A101D, Y102D	695		544	579
696 TACI CRD1/CRD2 545 TACI CRD2	R84Q	696		545	580
697 TACI CRD1/CRD2 546 TACI CRD2	R84Q, S88N, A101D	697		546	581
698 TACI CRD1/CRD2 547 TACI CRD2	K77E	698		547	582
699 TACI CRD1/CRD2 548 TACI CRD2	R84Q, F103V	699		548	583
700 TACI CRD1/CRD2 549 TACI CRD2	K77E, Q95R, A101D	700		549	584
701 TACI CRD1/CRD2 550 TACI CRD2	I87M, A101D	701		550	585
769 TACI CRD2	Q75E			769	
770 TACI CRD2	Q75E, K77E			770	
771 TACI CRD2	Q75E, F78Y			771	
772 TACI CRD2	Q75E, A101D			772	

10

20

30

40

50

名称	変異	ECD (CRD1/CRD2)		ECD (CRD2)	
		AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO
773 TACI CRD2	Q75E, Y102D			773	
774 TACI CRD2	K77E, F78Y, R84Q			774	
775 TACI CRD2	F78Y			775	
776 TACI CRD2	F78Y, R84Q			776	
777 TACI CRD2	F78Y, A101D			777	
778 TACI CRD2	F78Y, Y102D			778	
779 TACI CRD2	R84Q, A101D			779	
780 TACI CRD2	R84Q, Y102D			780	
781 TACI CRD2	A101D, Y102D			781	
792 TACI CRD2	Y102D			792	
793 TACI CRD2	<u>K77E, F78Y</u>			793	
794 TACI CRD2	<u>K77E, Y102D</u>			794	

10

20

30

【0363】

いくつかの態様では、BIMは、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、少なくとも1つのTD（例えば、少なくとも1つのCRD、例えば、CRD1および/またはCRD2）を含む、TACIの野生型ECDもしくは非改変ECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:709に記載のECD配列；(ii) SEQ ID NO:709に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(ii)は、CRD1および/もしくはCRD2を含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRI/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:709に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるTACI配列である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:709に記載のN末端メチオニンを欠く、SEQ ID NO:709の残基2～166を含むTACI配列である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:709のアミノ酸2～166として記載される配列からなるかまたはそれから本質的になるTACI配列である。

40

【0364】

いくつかの態様では、BIMは、TACIのCRD1およびCRD2を含み、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、TACIの野生型ECDもしくは非

50

改変ECDの結合部分、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:719に記載の配列；(i) SEQ ID NO:719に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(iii)は、CRD1および/もしくはCRD2の一部を含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRI/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:719に記載の配列を含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:719に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるTACI配列である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:718に記載の配列；(ii) SEQ ID NO:718に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(iii)は、CRD1および/もしくはCRD2の一部を含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRI/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:718に記載の配列を含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:718に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるTACI配列である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:516に記載の配列；(ii) SEQ ID NO:516に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(iii)は、CRD1および/もしくはCRD2の一部を含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRI/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:516に記載の配列を含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:516に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるTACI配列である。

【0365】

いくつかの態様では、BIMは、TACIのCRD2のみを含み、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、TACIの野生型ECDもしくは非改変ECDの結合部分、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:528に記載の配列；(ii) SEQ ID NO:528に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(iii)は、CRD2の一部を含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRI/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:528に記載の配列を含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:528に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるTACI配列である。

【0366】

いくつかの態様では、BIMは、参照TACI配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸置換(substitution)(変異または置換(replacement))を含むvTDを有するECDまたはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片を含むバリエーションTACIである。参照TACI配列は、上記のセクションIIに記載されているいずれかを含むことができる。前記も1つのアミノ酸置換は、上記のセクションIIに記載されているアミノ酸置換のいずれかを含むことができる。例えば、BIMは、表2に記載のアミノ酸置換のいずれかを含むvTDを有するECDまたはその特異的結合断片を含むバリエーションTACIであり得る。いくつかの例では、変異は、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列を含む参照TACI内に作製され

る。いくつかの例では、変異は、例えば、SEQ ID NO:516に記載されているように、TACIのCRD1ドメインおよびCRD2ドメインを含む参照TACI内に作製される。いくつかの例では、変異は、例えば、SEQ ID NO:528に記載されているように、CRD2を保持するためにN末端アミノ酸残基およびC末端アミノ酸残基の欠失によってさらに切断された参照TACI内に作製される。

【0367】

いくつかの態様では、BIMは、CRD1およびCRD2を含む細胞外ドメイン（ECD）配列、例えば、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに記載のバリエーションTACIポリペプチドを含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列を含むバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つの特異的結合断片を含むバリエーションTACIポリペプチドであり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

【0368】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに記載のバリエーションTACI細胞外ドメイン（ECD）配列からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:517~527、536、537、682~701のいずれか1つの特異的結合断片からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションTACIポリペプチドであり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

【0369】

いくつかの態様では、BIMは、参照TACIポリペプチドのCRD2を含むがCRD1を欠く細胞外ドメイン（ECD）配列を含むバリエーションTACIポリペプチド、例えば、SEQ ID NO:529~535、538~550、673~681、769~794のいずれか1つに記載のバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:529~535、538~550、673~681のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列を含むバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:529~535、538~550、673~681、769~794のいずれか1つの特異的結合断片を含むバリエーションTACIポリペプチドであり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

【0370】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681、769～794のいずれか1つに記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681、769～794のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～681、769～794のいずれか1つの特異的結合断片からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションTACIポリペプチドであり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）TACIに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

10

【0371】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:535に記載の配列を含むバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:535に記載の配列から本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:535に記載の配列からなるバリエーションTACIポリペプチドである。

20

【0372】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:541に記載の配列を含むバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:541に記載の配列から本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:541に記載の配列からなるバリエーションTACIポリペプチドである。

【0373】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:542に記載の配列を含むバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:542に記載の配列から本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:542に記載の配列からなるバリエーションTACIポリペプチドである。

30

【0374】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:688に記載の配列を含むバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:688に記載の配列から本質的になるバリエーションTACIポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:688に記載の配列からなるバリエーションTACIポリペプチドである。

【0375】

2. BCMA

いくつかの態様では、BIMは、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、TD（例えばCRD）を含む野生型BCMA ECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、TD（例えばCRD）を含むバリエーションBCMA ECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、上記のセクションII（例えば表1）に記載の配列のいずれかを有するBCMAポリペプチドまたはそのバリエーションである。

40

【0376】

いくつかの態様では、BIMは、APRIL、BAFF、および/もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合する、TD（例えばCRD）を含む、BCMAの野生型ECDもしくは非改変ECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:710に記載のECD配列；（ii）SEQ ID NO:710に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%

50

、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を含むか；または (iii) は、CRDを含む (i) もしくは (ii) の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRI/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i) もしくは (ii) の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:710に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるBCMA配列である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:710に記載のN末端メチオニンを欠く、SEQ ID NO:710の残基2～54を含むBCMA配列である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:710のアミノ酸2～54として記載される配列からなるかまたはそれから本質的になるBCMA配列である。

10

【0377】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:356に記載の配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、APRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合するアミノ酸配列、を含むか；または (iii) は、CRDの一部を含む (i) もしくは (ii) の断片もしくは部分であって、該部分が、APRIL、BAFF、もしくはAPRI/BAFFヘテロ三量体に結合する、(i) もしくは (ii) の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:356に記載の配列を含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:356に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるBCMA配列である。

20

【0378】

いくつかの態様では、BIMは、参照BCMA配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸置換 (substitution) (変異または置換 (replacement)) を含むvTDを有するECDまたはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片を含むバリエーションBCMAである。参照BCMA配列は、上記のセクションIIに記載されているいずれかを含むことができる。前記もう1つのアミノ酸置換は、上記のセクションIIに記載されているアミノ酸置換のいずれかを含むことができる。例えば、BIMは、表1に記載のアミノ酸置換のいずれかを含むvTDを有するECDまたはその特異的結合断片を含むバリエーションBCMAであり得る。いくつかの例では、変異は、SEQ ID NO:710に記載のアミノ酸配列を含む参照BCMA内に作製される。いくつかの例では、変異は、BCMAのCRDドメインを含む参照BCMA内に作製される。いくつかの例では、変異は、SEQ ID NO:356に記載の参照BCMA内に作製される。

30

【0379】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載のバリエーションBCMAポリペプチドを含む。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照 (例えば、非改変または野生型) BCMAに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列を含むバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つの特異的結合断片を含むバリエーションBCMAポリペプチドであり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはBAFF/APRILヘテロ三量体と結合し、参照 (例えば、非改変または野生型) BCMAに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

40

【0380】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載のバリエーションBCMA細胞外ドメイン (ECD) 配列からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも9

50

5%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、または99%の同一性を示し、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を保持するポリペプチド配列からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:357~435のいずれか1つの特異的結合断片からなるかまたはそれから本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドであり、特異的結合断片は、BAFF、APRIL、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体に結合し、参照（例えば、非改変または野生型）BCMAに存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む連続配列を含む。

【0381】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:381に記載の配列を含むバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:381に記載の配列から本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:381に記載の配列からなるバリエーションBCMAポリペプチドである。

【0382】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:405に記載の配列を含むバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:405に記載の配列から本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:405に記載の配列からなるバリエーションBCMAポリペプチドである。

【0383】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:406に記載の配列を含むバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:406に記載の配列から本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:406に記載の配列からなるバリエーションBCMAポリペプチドである。

【0384】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:410に記載の配列を含むバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:410に記載の配列から本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:410に記載の配列からなるバリエーションBCMAポリペプチドである。

【0385】

いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:411に記載の配列を含むバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:411に記載の配列から本質的になるバリエーションBCMAポリペプチドである。いくつかの態様では、BIMは、SEQ ID NO:411に記載の配列からなるバリエーションBCMAポリペプチドである。

【0386】

B. T細胞阻害分子（TIM）

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質は、T細胞刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに結合するTIMを含む。いくつかの局面では、T細胞刺激受容体は、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）を含む細胞質領域、またはT細胞の活性化を誘導、媒介もしくは増強するために細胞内のシグナル伝達経路に関与する1つもしくは複数のアダプタータンパク質と相互作用する細胞質領域を含む。いくつかの態様では、アダプタータンパク質は、刺激受容体の細胞質領域内のホスホチロシン残基に特異的な結合ドメインを含む。いくつかの態様では、T細胞刺激受容体は、TCR複合体の成分を含むか、またはTCRシグナル伝達を増大もしくは増強する共受容体もしくは共刺激分子である。いくつかの態様では、T細胞刺激受容体は、その任意の哺乳動物オルソログを含む、TCR、CD3、CD4、CD8、CD28、ICOSまたはCD2である。いくつかの態様では、T細胞刺激受容体標的は、ヒトTCR、ヒトCD3、ヒトCD4、ヒトCD8、ヒトCD28、ヒトICOSまたはヒトCD2である。いくつかの態様では、T細胞刺激受容体は、ヒトT細胞上に発現される。

【0387】

いくつかの態様では、TIMは、T細胞刺激受容体に直接、例えば、TCR複合体の成分、

またはTCRシグナル伝達を増大もしくは増強する共受容体もしくは共刺激分子に直接結合する。いくつかの態様では、TIMは、その任意の哺乳動物オルソログを含む、TCR、CD3、CD4、CD8、CD28、ICOSまたはCD2に結合する。いくつかの態様では、TIMは、ヒトTCR、ヒトCD3、ヒトCD4、ヒトCD8、ヒトCD28、ヒトICOSまたはヒトCD2に結合する。

【0388】

場合によっては、TIMは、T細胞刺激受容体のリガンドに結合する。いくつかの態様では、TIMは、TCR複合体の成分のリガンド、またはTCRシグナル伝達を増大もしくは増強する共受容体もしくは共刺激分子のリガンドに結合する。いくつかの態様では、TIMは、TCR分子、CD3分子、CD4分子、CD8分子、CD28分子、ICOS分子またはCD2分子、例えば、T細胞、例えばヒトT細胞上に発現されるそのような分子のリガンドに結合する。いくつかの態様では、TIMは、CD28のリガンド、例えば、T細胞、例えばヒトT細胞上に発現されるCD28のリガンドに結合する。いくつかの態様では、リガンドは、CD80またはCD86、例えば、ヒトCD80またはヒトCD86である。いくつかの態様では、リガンドは、APC上に発現される。

【0389】

いくつかの態様では、TIMは、T細胞刺激受容体に結合するか、またはT細胞刺激受容体のリガンドに結合する抗体または抗原結合断片である。いくつかの態様では、TIMは、その任意の哺乳動物オルソログを含む、TCR、CD3、CD4、CD8、CD28、ICOSまたはCD2に結合する抗体または抗原結合断片である。いくつかの態様では、抗体または抗原結合断片は、ヒトTCR、ヒトCD3、ヒトCD4、ヒトCD8、ヒトCD28、ヒトICOSまたはヒトCD2、例えば、ヒトT細胞上に発現されるそのような分子に結合する。いくつかの態様では、抗体または抗原結合断片は、CD80またはCD86に結合する。いくつかの態様では、抗体または抗原結合断片は、ヒトCD80またはヒトCD86、例えば、ヒトAPC上に発現されるそのような分子に結合する。

【0390】

いくつかの態様では、TIMは、T細胞刺激受容体もしくはT細胞刺激受容体のリガンドの結合パートナーであるか、またはそれを含む。TIMとして使用され得る分子の中には、IgSFタンパク質メンバー、特に、T細胞刺激受容体またはそれらのリガンドであるIgSFメンバーの細胞外ドメインがある。

【0391】

いくつかの局面では、TIMは、T細胞刺激受容体に結合する、例えば、TCR、CD3、CD4、CD8、CD28、ICOSもしくはCD2に結合するIgSFファミリーメンバーのIgDであるか、もしくはそれを含むか、またはT細胞刺激受容体に結合するその特異的断片もしくはvIgDである。特定の態様では、T細胞刺激受容体はCD28またはICOSであり、TIMはCD28またはICOSに結合する。CD28もしくはICOSの結合パートナーであるか、またはCD28もしくはICOSに結合する例示的なIgSFファミリーメンバーには、例えば、CD80、CD86およびICOSL、例えば、ヒトCD80、ヒトCD86またはヒトICOSLが含まれる。いくつかの例では、TIMは、野生型CD80、野生型CD86もしくは野生型ICOSLのIgDであるか、もしくはそれを含むか、またはそのvIgDであるか、もしくはそれを含み、TIMは、CD28に特異的に結合する。

【0392】

他の局面では、TIMは、T細胞刺激受容体のリガンドに結合する、例えば、CD80もしくはCD86に結合するIgSFファミリーメンバーのIgDであるか、もしくはそれを含むか、またはT細胞刺激受容体のリガンドに結合するその特異的断片もしくはvIgDである。CD80もしくはCD86の結合パートナーであるか、またはCD80もしくはCD86に結合する例示的なIgSFファミリーメンバーには、例えば、ヒトCTLA-4などのCTLA-4が含まれる。いくつかの例では、TIMは、野生型CTLA-4のIgDであるか、もしくはそれを含むか、またはそのvIgDであるか、もしくはそれを含み、TIMは、CD80またはCD86に特異的に結合する。提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質内にTIMとして含めるた

10

20

30

40

50

めの例示的な配列には、国際PCT公開出願番号WO2019/074983に記載されている分子が含まれる。

【0393】

いくつかの態様では、本明細書において提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質は、可溶性タンパク質であり、および/または膜貫通ドメインを含む部分を含まない。当業者であれば、IgSFのタンパク質を含む細胞表面タンパク質が、典型的には、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメイン（ECD）を有すること、ならびにそのようなタンパク質の可溶性形態が、細胞外ドメイン、またはその免疫学的に活性な部分配列を使用して作製され得ることを理解するであろう。したがって、いくつかの態様では、TIMは、IgSFメンバーの膜貫通ドメインまたは膜貫通ドメインの一部を欠く。いくつかの態様では、TIMは、IgSFメンバーの細胞内（細胞質）ドメインまたは細胞内ドメインの一部を欠く。いくつかの態様では、TIMは、IgVドメインなどのIgSFドメインを含むECDドメインもしくはその一部またはその特異的結合断片のみを含む。

10

【0394】

例えば、いくつかの局面では、TIMは、T細胞刺激受容体のリガンドに結合する、少なくとも1つのIgD（例えばIgV）を含む、IgSF受容体のECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片であるか、またはそれを含む。例えば、TIMは、CD80またはCD86に結合する、少なくとも1つのIgD（例えばIgV）を含む、CTLA-4のECD、またはCTLA-4の特異的結合部分もしくは特異的結合断片を含むことができる。いくつかの態様では、TIMは、少なくとも1つのIgD（例えばIgV）を含む、IgSF受容体のECD、もしくはその特異的結合部分もしくは特異的結合断片からなるか、またはそれから本質的になり、例えば、IgD（例えばIgV）を含む、CTLA-4のECD、もしくはCTLA-4のECDの特異的結合部分もしくは特異的結合断片からなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの態様では、TIMは、T細胞刺激受容体のリガンドの受容体のECDの完全長配列未満である。いくつかの態様では、TIMは、1つのvIgD（例えばIgV）、もしくは1つのみのvIgD（例えばIgV）の特異的結合断片であるか、またはそれのみを含む。いくつかの態様では、TIMは、T細胞刺激受容体のリガンドの受容体のIgVからなるかまたはそれから本質的になり、例えば、CTLA-4のIgVのみからなるかまたはそれから本質的になる。いくつかの態様では、IgD（例えばIgV）を含むECDまたはその結合部分もしくは結合断片を含むTIMの配列は、限定されることなく、ヒト、マウス、カニクイザルまたはラットを含む哺乳動物配列である。いくつかの態様では、TIM配列は、ヒトであり、および/またはヒトタンパク質に結合する。

20

30

【0395】

いくつかの局面では、vIgDは、同じ分子に対する非改変IgDまたは野生型IgDの結合活性と比較して、結合活性の増加、例えば、T細胞刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに対する結合親和性の増加を示す親和性改変ドメインである。いくつかの態様では、TIMは、IgSFメンバー、例えばCTLA-4のIgDと比較して1つまたは複数のアミノ酸置換を有するvIgDを含み、1つまたは複数のアミノ酸置換は、T細胞刺激受容体またはT細胞刺激受容体のリガンドである同族結合パートナーに結合親和性の増加を付与するかまたはもたらす。

40

【0396】

いくつかの態様では、TIMは、T細胞刺激受容体もしくはT細胞刺激受容体のリガンドの結合パートナーの野生型IgDもしくは非改変IgDと比較して、IgDに1つもしくは複数のアミノ酸改変、例えば、1つもしくは複数の置換（substitution）（あるいは、「変異」または「置換（replacement）」）、欠失もしくは付加を含むvIgDであるか、またはそれを含む。いくつかの局面では、vIgDは、T細胞刺激受容体またはT細胞刺激受容体のリガンドのIgSF結合パートナーのIgDドメインに、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変、例えば、アミノ酸置換、欠失または付加を含む。改変（例えば置換）は、IgVドメインまたはIgCドメインに存在し得る。いくつかの態様では、vIgDは、IgVドメインまたはその

50

特異的結合断片に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変（例えば置換）を有する。いくつかの態様では、vIgDは、IgCドメインまたはその特異的結合断片に最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変（例えば置換）を有する。いくつかの態様では、vIgDは、野生型IgDもしくは非改変IgDまたはその特異的結合断片と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0397】

提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質におけるTIMの非限定的な例は、以下のサブセクションに記載されている。本明細書において記載されるTIMのいずれかは、セクションIII.Aに記載のBIMと組合わせられ得る。

【0398】

1. リガンド結合TIM、例えばCTLA-4

T細胞刺激受容体のリガンドに結合するT細胞分子（TIM）を含む免疫調節タンパク質が本明細書において提供される。いくつかの局面では、T細胞刺激受容体は、CD28、例えばヒトCD28であり、および/またはT細胞刺激受容体のリガンドは、CD80もしくはCD86、例えば、ヒトCD80もしくはヒトCD86である。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質のTIMは、CD80またはCD86の細胞外部分またはエクドメインに結合する。いくつかの態様では、TIMは、細胞の表面、例えば、APCの表面上のCD80またはCD86に結合する。

【0399】

いくつかの態様では、TIMは、CD80もしくはCD86に結合する抗体であるか、またはその抗原結合抗体断片（例えば、FabまたはscFv）である。いくつかの態様では、抗体または抗原結合抗体断片は、ヒトCD80またはヒトCD86に結合する。いくつかの態様では、抗体は、抗CD80抗体もしくは抗原結合断片または抗CD86抗体もしくは抗原結合断片のVHおよびVLを含む一本鎖可変断片（例えばscFv）である。

【0400】

いくつかの態様では、TIMは、CD80もしくはCD86、例えば、ヒトCD80もしくはヒトCD86に結合する、IgSFファミリーメンバーのIgD（例えばIgV）もしくはその特異的結合断片、例えば、非改変IgDもしくは野生型IgD、もしくはvIgD、もしくはその特異的結合断片であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、野生型CTLA-4、例えばヒトCTLA-4などのCTLA-4ポリペプチドのIgDもしくはそのvIgDである1つもしくは複数のIgDであるか、またはそれを含む。いくつかの局面では、TIMは、野生型CTLA-4または非改変CTLA-4のIgDと比較して1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失または付加）を含むvIgDである1つまたは複数のIgD（例えばIgV）を含み、いくつかの局面では、CD80またはCD86へのTIMの結合の増加をもたらす。提供される免疫調節タンパク質内にTIMとして含めるためのCTLA-4結合パートナーの例示的なIgDまたはvIgDが記載されている。いくつかの態様では、TIMは、対応する野生型IgDもしくは非改変IgDと比較して、CD80もしくはCD86に対する結合親和性などの結合活性の増加を示すvIgDポリペプチドであるか、またはそれを含む。提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質においてTIMとして使用するためのCTLA-4の例示的なIgDまたはvIgDには、国際PCT公開出願番号WO2019/074983に記載されている分子が含まれる。

【0401】

CTLA-4は、CD80および/またはCD86相互作用の調節を介してT細胞活性化を減弱させることによって自己免疫疾患を処置するための治療薬として利用されてきた。具体的には、アバタセプトおよびベラタセプトは、それぞれ関節リウマチおよび移植の状況で使用するためのFDA承認治療薬である。アバタセプトは、抗体のFc部分に融合された野生型CTLA-4 IgSFドメインである。アバタセプトのCTLA-4部分の配列は、SEQ ID NO:1に記載されている。ベラタセプトは、CD80リガンドおよびCD86リガンドに対する増加

10

20

30

40

50

した親和性を付与するための、SEQ ID NO:1に記載の野生型参照CTLA-4 ECD配列の31および106位に対応する、31位のアラニンに対するチロシンの置換と、106位のロイシンに対するグルタミン酸の置換 (A31Y/L106E) とを含む、CTLA-4 IgSFドメインの改変バリエーションである (Kremer et al., N Engl J Med.2003;349 (20):1907-1915;Larsen et al,Am J Transplant.2005;5 (3):443-453)。ペラタセプトのCTLA-4部分の配列は、SEQ ID NO:672として記載されている。

【0402】

いくつかの態様では、TIMは、CTLA-4の完全長配列ではない。いくつかの局面では、TIMは、可溶性ポリペプチドであり、膜発現されず、かつ/またはCTLA-4の膜貫通ドメインおよび/もしくは細胞質ドメインを欠く。いくつかの態様では、TIMは、IgDまたはvIgDを含む細胞外ドメイン (ECD) またはその特異的結合断片のみを含み、例えば、IgVドメインもしくはIgCドメインもしくはその特異的結合断片、またはそれらの組合せのみを含む。

10

【0403】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載のECD配列であるかもしくはそれを含むか、またはその特異的結合断片である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:2に記載のECD配列であるかもしくはそれを含むか、またはその特異的結合断片である。いくつかの態様では、TIMは、ヒトCTLA-4などのCTLA-4のIgD (例えばIgV) 配列であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:191に記載のIgD (例えばIgV) 配列であるかもしくはそれを含むか、またはその特異的結合断片である。

20

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNEL
TFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCP
DSD (SEQ ID NO:1)

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNEL
TFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCP
DSDQ (SEQ ID NO:2)

30

HVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFL
DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY (SEQ ID NO:191)

【0404】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載の配列；(ii) SEQ ID NO:1に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、CD80もしくはCD86に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(iii)は、IgD (例えばIgV) を含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分が、CD80もしくはCD86に結合する、(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載の配列を含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるCTLA-4配列である。

40

【0405】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:2に記載の配列；(ii) SEQ ID NO:2に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、CD80もしくはCD86に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(iii)は、IgD (例えばIgV) を含む(i)もしくは(ii)の断片もしくは部分であって、該部分が、CD80もしくはCD

50

86に結合する、(i) もしくは (ii) の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:2に記載の配列を含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:2に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるCTLA-4配列である。

【0406】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:191に記載の配列；(ii) SEQ ID NO:191に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示し、CD80もしくはCD86に結合するアミノ酸配列、を含むか；または(iii)は、IgD(例えばIgV)を含む(i) もしくは (ii) の断片もしくは部分であって、該部分が、CD80もしくはCD86に結合する、(i) もしくは (ii) の断片もしくは部分、である。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:191に記載の配列を含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:191に記載の配列からなるかまたはそれから本質的になるCTLA-4配列である。

【0407】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、野生型CTLA-4もしくは非改変CTLA-4のIgDに1つもしくは複数のアミノ酸改変、例えば置換を含むvIgDであるかまたはそれを含むTIMを含む。いくつかの態様では、本明細書において提供される改変は、SEQ ID NO:1、2もしくは191に記載の非改変IgDを含むTIMに、またはSEQ ID NO:1、2もしくは191に対して85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を有する配列に存在し得る。いくつかの態様では、CTLA-4のvIgDを含むTIMは、SEQ ID NO:1、2または191のいずれかに記載の配列と少なくとも約85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0408】

いくつかの態様では、TIMは、CD80もしくはCD86に対する野生型IgDもしくは非改変IgDの結合活性と比較して、CD80もしくはCD86に対する結合親和性などの結合活性の増加を有する親和性改変IgSFドメインであるvIgDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、CD80またはCD86に対する結合活性、例えば結合親和性の増加は、少なくとも約5%、例えば、少なくとも約10%、15%、20%、25%、35%、50%、75%、100%、200%またはそれ以上増加する。いくつかの態様では、結合活性、例えば結合親和性の増加は、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍または50倍を超える。そのような例では、野生型IgDまたは非改変IgDは、1つまたは複数のアミノ酸改変(例えば置換)を含まないことを除いて、vIgDと同じ配列を有する。

【0409】

いくつかの態様では、CD80またはCD86に対するTIMの平衡解離定数(K_d)は、 $1 \times 10^{-5} M$ 、 $1 \times 10^{-6} M$ 、 $1 \times 10^{-7} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $1 \times 10^{-10} M$ もしくは $1 \times 10^{-11} M$ 未満、または $1 \times 10^{-12} M$ 以下であり得る。いくつかの態様では、TIMは、100 pmまたは約100 pmから、5000 pm、100 pmまたは約100 pmから、2000 pm、100 pmまたは約100 pmから、1500 pm、100 pmまたは約100 pmから、1000 pm、100 pmまたは約100 pmから、800 pm、100 pmまたは約100 pmから、500 pm、100 pmまたは約100 pmから、400 pm、400 pmまたは約400 pmから、4000 pm、400 pmまたは約400 pmから、2000 pm、400 pmまたは約400 pmから、1500 pm、400 pmまたは約400 pmから、1000 pm、400 pmまたは約400 pmから、800 pm、400 pmまたは約400 pmから、500 pm、500 pmまたは約500 pmから、5000 pm、500 pmまたは約500 pmから、2000 pm、500 pmまたは約500 pmから、1500 pm、500 pmまたは約500 pmから、1000 pm、500 pmまたは約500 pmから、800 pm、800 pmまたは約800 pmから、5000 pm、800 pmまたは約800 pmから、2000 pm、800 pmまたは約800 pmから、1500 pm、800 pmまたは約800 pmから、1000 pm、1000 pmまたは約1000

pmから、5000pm、1000pmまたは約1000pmから、2000pm、1000pmまたは約1000pmから、1500pm、1500pmまたは約1500pmから、5000pm、1500～2000pmまたは約1500～2000pmから、2000pm～50000pmの K_d でCD80またはCD86に結合する。いくつかの態様では、TIMは、200pM、300pM、400pM、500pM未満の K_d でCD80またはCD86に結合する。いくつかの態様では、TIMは、500pm超または約500pm超であるが2000pm未満または約2000pm未満、例えば、500pmもしくは約500pmから、1500pm、500pmもしくは約500pmから、1250pm、500pmもしくは約500pmから、1000pm、500pmもしくは約500pmから、750pm、750pmもしくは約750pmから、1500pm、750pmもしくは約750pmから、1250pm、750pmもしくは約750pmから、1000pm、1000pmもしくは約1000pmから、2000pm、1000pmもしくは約1000pmから、1500pm、または1500pmもしくは約1500pmから、2000pmの K_d でCD80またはCD86に結合する。

10

【0410】

特に指示しない限り、CTLA-4 ECDまたはそのIgD（例えばIgV）のvIgDに存在するアミノ酸改変は、SEQ ID NO:1または2に記載の非改変ECD配列の位置のナンバリングに対応するアミノ酸位置番号によって指定される。例えば、参照配列とSEQ ID NO:1または2とのアライメントによって、そのIgSFドメイン（例えばIgV）を含むECDまたはその一部の改変、例えばアミノ酸置換の対応する位置を同定することは、当業者のレベルの範囲内である。本開示全体にわたる改変の一覧では、アミノ酸位置は中央に示されており、対応する非改変（例えば野生型）アミノ酸は、番号の前に列挙され、同定されたバリエーションアミノ酸置換は、番号の後に列挙されている。改変がその位置の欠失である場合、「del」が示され、改変がその位置での挿入である場合、「ins」が示されている。場合によっては、挿入は、中央に示されたアミノ酸位置とともに列挙され、対応する非改変（例えば野生型）アミノ酸は、番号の前後に列挙され、同定されたバリエーションアミノ酸挿入は、非改変（例えば野生型）アミノ酸の後に列挙されている。

20

【0411】

いくつかの態様では、TIMは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸改変、例えば置換を有するvIgDを含む。1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、野生型CTLA-4または非改変CTLA-4のエクトドメイン（細胞外ドメイン）内に存在し得る。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、CTLA-4のECDドメインまたはその特異的結合断片内にある。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、CTLA-4のIgVドメインまたはその特異的結合断片内にある。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、CTLA-4のIgCドメインまたはその特異的結合断片内にある。いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変、例えば置換は、CTLA-4のIgVドメインまたはその特異的結合断片内、およびCTLA-4の単数もしくは複数のIgCドメイン、またはその特異的結合断片内にある。

30

【0412】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1に記載の位置を基準として、6、10、12、14、15、16、18、19、20、22、24、26、27、28、29、30、31、33、35、37、38、41、42、43、45、46、47、48、53、54、55、56、58、59、61、63、64、65、67、69、71、72、73、75、76、82、85、86、87、89、91、93、95、96、97、98、99、105、106、108、110、113、115、116、117、118、119、120、121、122、124、125および/もしくは126位に対応する、CTLA-4の非改変IgD、もしくはその特異的結合断片に1つもしくは複数のアミノ酸改変、例えば置換を有するvIgDであるか、またはそれを含む。

40

【0413】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1または2に記載の位置を基準として、12、18、26、29、31、53、56、58、63、72、98、99、105、106および/または117位に対応する、非改変CTLA-4またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸

50

改変、例えば置換を有するvlgDを含む。いくつかの態様では、TIMは、
L12F, L12H, L12P, I18A,

I18F, I18N, I18T, I18V, A26D, A26S, A26T, G29R, G29W, A31Y, T53S, M56K, M56L, M56R, M56T,
M56V, N58D, N58S, L63H, L63P, S72G, S72T, L98Q, L98R, M99I, M99L, Y105F, Y105L, L106E,
L106I, L106R, I117E, I117L, I117M, および/もしくはI117T

から選択される1つもしくは複数のアミノ酸改変、もしくはその保存的アミノ酸置換を有する、CTLA-4のvlgDであるか、またはそれを含む。

【0414】

いくつかの態様では、TIMは、

A6T, V10A, L12F, L12H, L12I, L12P, S14N, S15P, R16C, R16G,

R16H, I18A, I18F, I18N, I18T, I18V, A19V, S20N, V22A, V22I, E24Q, A26D, A26S, A26T, S27P,
P28L, G29R, G29W, K30R, A31Y, E33M, E33V, R35K, T37S, V38I, Q41L, A42S, A42T, A42V,
D43N, Q45H, V46E, T47A, E48R, T53S, Y54F, M55R, M55T, M55V, M56K, M56L, M56R, M56T,
M56V, N58D, N58S, E59D, E59G, T61A, T61I, T61N, T61R, T61S, L63H, L63P, D64E, D64N, D64V,
D65G, I67N, I67T, I67V, T69A, T69I, T69S, T71A, T71I, S72G, S72T, S73R, N75D, Q76R, Q82H,
Q82R, R85G, A86T, M87A, M87K, M87T, M87V, T89A, T89M, T89S, L91R, I93L, I93V, K95R,
V96I, E97Q, L98Q, L98R, M99I, M99L, Y105F, Y105L, L106E, L106I, L106N, L106R, L106V, I108F,
I108V, N110K, N110S, N110Y, Q113H, Y115H, Y115N, V116A, I117E, I117K, I117L, I117M, I117T,
P119H, E120D, P121S, C122P, D124P, D124I, S125I, S125P, D126P, および/もしくはD126T

から選択される1つもしくは複数のアミノ酸改変、もしくはその保存的アミノ酸置換を有する、CTLA-4のvlgDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、
L12F, L12H, L12I, L12P, I18A, I18F, I18N, I18T, I18V, A26D,

A26S, A26T, G29R, G29W, E33M, E33V, T53S, M55R, M55T, M55V, M56K, M56L, M56R, M56T,
M56V, N58D, N58S, L63H, L63P, S72G, S72T, M87A, M87K, M87T, M87V, L98Q, L98R, M99I,
M99L, Y105F, Y105L, L106I, L106N, L106R, L106V, I117E, I117K, I117L, I117M, および/もしくは I117T

からの1つもしくは複数のアミノ酸改変、もしくはその保存的アミノ酸置換を有するvlgDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、I12F、L12P、I18T、A26T、G29W、T53S、M55T、M56K、M56T、N58S、S72G、M99L、L63P、L98Q、Y105L、L106Iおよび/もしくはI117Lから選択される1つもしくは複数のアミノ酸改変、もしくはその保存的アミノ酸置換を有するvlgDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、L12P、I18T、A26T、G29W、A31Y、T53S、M55T、M56K、N58S、S72G、M99L、L63P、L98Q、Y105L、L106E、L106Iおよび/もしくはI117Lから選択される1つもしくは複数のアミノ酸改変、もしくはその保存的アミノ酸置換を有するvlgDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、A26T、G29W、L63P、S72G、L98Q、M99L、Y105Lおよび/もしくはL106Iから選択される1つもしくは複数のアミノ酸改変、もしくはその保存的アミノ酸置換を有するvlgDであるか、またはそれを含む。

【0415】

いくつかの態様では、TIMは、

10

20

30

40

50

A6T, V10A, L12F, L12H, L12I, L12P, S14N, S15P, R16C, R16G,
 R16H, I18A, I18F, I18N, I18T, I18V, A19V, S20N, V22A, V22I, E24Q, A26D, A26S, A26T, S27P,
 P28L, G29R, G29W, K30R, A31Y, E33M, E33V, R35K, T37S, V38I, Q41L, A42S, A42T, A42V,
 D43N, Q45H, V46E, T47A, E48R, T53S, Y54F, M55R, M55T, M55V, M56K, M56L, M56R, M56T,
 M56V, N58D, N58S, E59D, E59G, T61A, T61I, T61N, T61R, T61S, L63H, L63P, D64E, D64N, D64V,
 D65G, I67N, I67T, I67V, T69A, T69I, T69S, T71A, T71I, S72G, S72T, S73R, N75D, Q76R, Q82H,
 Q82R, R85G, A86T, M87A, M87K, M87T, M87V, T89A, T89M, T89S, L91R, I93L, I93V, K95R,
 V96I, E97Q, L98Q, L98R, M99I, M99L, Y105F, Y105L, L106E, L106I, L106N, L106R, L106V, I108F,
 I108V, N110K, N110S, N110Y, Q113H, Y115H, Y115N, V116A, I117E, I117K, I117L, I117M, I117T,
 P119H, E120D, P121S, C122P, D124P, D124I, S125I, S125P, D126P, および/もしくはD126T

10

の中から選択される2つ以上のアミノ酸改変を有するvlgDであるか、またはそれを含む。

【0416】

いくつかの態様では、TIMは、非改変CTLA-4ポリペプチドもしくは野生型CTLA-4ポリペプチド、もしくはその特異的結合断片に、A26T、G29W、T53S、L63P、S72G、L98Q、M99L、Y105Lおよび/もしくはL106Iに対応するアミノ酸置換を有する、CTLA-4のvlgDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、アミノ酸置換

20

A26T/G29W, A26T/T53S, A26T/L63P, A26T/S72G, A26T/L98Q, A26T/M99L, A26T/Y105L,
 A26T/L106I, A26T/G29W, G29W/T53S, G29W/L63P, G29W/S72G, G29W/L98Q, G29W/M99L,
 G29W/Y105L, G29W/L106I, A26T/T53S, G29W/T53S, T53S/L63P, T53S/S72G, T53S/L98Q,
 T53S/M99L, T53S/Y105L, or T53S/L106I, A26T/L63P, G29W/L63P, T53S/L63P, L63P/S72G,
 L63P/L98Q, L63P/M99L, L63P/Y105L, or L63P/L106I, A26T/S72G, G29W/S72G, T53S/S72G,
 L63P/S72G, S72G/L98Q, S72G/M99L, S72G/Y105L もしくは S72G/L106I, A26T/L98Q, G29W/L98Q,
 T53S/L98Q, L63P/L98Q, S72G/L98Q, L98Q/M99L, L98Q/Y105L or L98Q/L106I, A26T/M99L,
 G29W/M99L, T53S/M99L, L63P/M99L, S72G/M99L, L98Q/M99L, M99L/Y105L, M99L/L106I,
 A26T/Y105L, G29W/Y105L, T53S/Y105L, L63P/Y105L, S72G/Y105L, L98Q/Y105L, M99L/Y105L,
 Y105L/L106I, A26T/L106I, G29W/L106I, T53S/L106I, L63P/L106I, S72G/L106I, L98Q/L106I,
 M99L/L106I, Y105L/L106I

30

を含む、CTLA-4のvlgDであるか、またはそれを含む。バリエーションCTLA-4ポリペプチドは、提供される態様に従って、さらなるアミノ酸改変（例えば置換）、例えば、本明細書において記載されるいずれかを含み得る。

【0417】

40

いくつかの態様では、アミノ酸改変、例えば置換は、

A31Y/L106E, A6T/A26T/M55T/M99L/Y105L, V10A/G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L/P121S,
V10A/L63P/D64V/S72G/L98Q/M99L/Y105L, V10A/L63P/L98Q/Y105L,
L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L, L12F/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106R,
L12F/K30R/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L,
L12H/I18V/A42T/M55T/N58D/L98R/Y105L/L106I/P121S, L12H/E33M/L98Q/Y105L,
L12H/M55T/E59D/L63P/M99L, L12H/L63P/S72G/L98Q/Y105L,
L12I/M55T/M56V/I67T/M99L/L106R/I108F,
L12P/R16H/A26T/T61S/L63P/M87V/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L,
L12P/I18T/A26T/M55T/T69S/S72G/M99L/Y105L, L12P/A26T, L12P/A26T/L63P,
L12P/A26T/L63P/S72G/T89M/L98Q/M99L/Y105L, L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L,
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I, L12P/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L,
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L, L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106I,
L12P/G29W/D43N/N58S/L63P/L98Q/M99L/Y105L,
L12P/M56V/L63P/V96I/L98Q/M99L/Y105L/Y115H, L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L,

10

20

30

40

50

L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N, L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N/I117L,
S14N/R16C/I18T/M56K/T61A/L63P/A86T/M99L, S15P/I18V/M56T/L98Q/M99L/Y105L,
R16C/G29W/E33V/M55T/L63P/L98Q/Y105L, I18A/L63P/S72G/L98Q/Y105L,
I18F/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P121S, I18N/A26T/L63H/T89A/L98Q/M99L/Y105L,
I18N/L63P/S72T/M87T/L98Q/Y105L/N110S,
I18T/A26S/M55T/M56V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117K,
I18T/A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L, I18T/A26T/L63P/Q82R/L98Q/Y105L,
I18T/G29R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, I18T/G29W/L63P/L98Q/Y105L, 10
I18T/E48R/L63P/T69S/L98Q/Y105L/N110Y, I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L,
I18T/L63P/S72G/M87K/L98Q/M99L/Y105L, I18T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L,
I18T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108V, I18V/A26T/L63P/D64E/L98Q/Y105L/L106R/N110K,
I18V/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L, A19V/G29W/R35K/L63P/L98Q/M99L/Y105L,
S20N/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L, V22A/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P119H,
V22I/L63P/L98Q/Y105L/I117M, E24Q/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L,
A26D/S72G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/A42V/Q45H/I67N/M87K/E97Q/M99L,
A26T/V46E/L63P/D65G/L98Q, A26T/T47A/M56K/L63P/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L,
A26T/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L, A26T/T53S/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L, 20
A26T/Y54F/M56K/M99L/Y105L, A26T/M55R/L98Q/M99L/Y105L,
A26T/M55T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/M55T/L63P/L98Q/M99L/Y105L,
A26T/L63P/D65G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/L63P/M87V/N110K/I117E,
A26T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L,
A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L, A26T/I67N/S72G/L98Q/M99L/Y105L,
S27P/M56K/L63P/S72G/S73R/T89A/M99L/Y105L/I117M,
P28L/E33V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, P28L/E33V/L63P/S72G/L98R/M99L/Y105L,
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L,
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/I108V, 30
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/P121S,
G29W/T53S/M56K/T61N/L63P/L98Q/Y105L, G29W/T53S/M56K/L63P/Q82H/L98Q/M99I/Y105L,
G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L, G29W/T53S/L63P/S72G/L98Q/Y105L,
G29W/M55V/E59G/L63P/L98Q/Y105L, G29W/M56T/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L,
G29W/N58D/I67V/L98Q/M99L/Y105L, G29W/N58S/L63P/D64N/L98Q/M99L/Y105L,
G29W/N58S/L63P/T69I/L98Q/M99L/Y105L, G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L,
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I, G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106V,
G29W/N58S/L63P/S72G/M87V/L98Q/Y105L, G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L,
G29W/N58S/L63P/M87T/L98Q/M99L/Y105L, G29W/N58S/L63P/L98Q/Y105L, 40

G29W/E59G/L63P/L98Q/Y105L, G29W/T61I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L,
 G29W/L63P/D65G/S72G/L98Q/Y105L, G29W/L63P/I67V/S72G/L98Q/Y105L,
 G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I, G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L,
 G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L,
 G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S, G29W/L63P/L98Q/M99L/Y105L,
 G29W/S72G/Q76R/L98Q/Y105L/L106I/Q113H,
 G29W/M87K/T89S/L98Q/M99L/Y105L/I108V/I117L, G29W/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L,
 G29W/L98Q/M99L/Y105L, E33M/A42T/L98Q/Y105L, E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L,
 E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108F, E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L,
 E33M/Q82H/L98Q/M99L/Y105L, E33V/A42S/M55T/L98Q/M99L/Y105L, T37S/M56V/L98Q/Y105L,
 V38I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, Q41L/Y54F/M56K/M99L/I108F, T53S/M56V/L98Q/Y105L,
 M55T/L63P/T71I/M99L/Y105L, M55T/S72G/L98Q/M99L/Y105L, M55T/E97Q/M99L/Y105F,
 M56K/L63P/N75D/V96I/M99L/Y105L/L106I, M56L/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L,
 M56R/L63P/L98Q/M99L/Y105L, M56T/L91R/L98Q/Y105L,
 M56V/E59G/L63P/S72G/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L/I117E,
 T61A/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, L63P/T69A/L98Q/M99L/Y105L/L106R/V116A,
 L63P/S72G/M87A/L98Q/Y105L, L63P/S72G/I93L/L98Q/M99L/Y105L,
 L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L, L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L,
 L63P/S72G/L98Q/Y105L, L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L, L63P/S72G/Y105L,
 L63P/M87K/M99L/L106R, L63P/Q82H/L98Q/M99L/Y105L, L63P/K95R, L63P/L98Q,
 L63P/L98Q/M99L/Y105L, L63P/L98Q/M99L/Y105L/L106I, L63P/L98Q/M99L/Y105L/I108V,
 L63P/L98Q/M99L/Y105L/I117M, L63P/L98Q/Y105L, L63P/L98Q/V116A, L63P/L98R/N110K,
 L63P/M99L/Y105L/I108F, I67V/S72G/Q82H/T89A/L98Q/M99L/Y105L,
 S72G/R85G/L98Q/M99L/Y105L/L106I, S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117T, L98Q/M99L/Y105L,
 L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117T, L98Q/M99L/Y105L/L106I/Y115N, L98Q/Y105L,およびL98R/N110K

10

20

30

である。

【0418】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1もしくは2に記載の位置を基準として、アミノ酸改変C122Sをさらに含む、CTLA-4のvlgDであるか、またはそれを含む。

【0419】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:1もしくは2に記載の位置を基準として、アミノ酸改変C122Sを含む、CTLA-4のvlgDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:668に記載のアミノ酸配列を有する。

40

【0420】

いくつかの態様では、TIMは、表3に記載の野生型CTLA-4のIgD（例えばIgV）、もしくは表3に列挙された改変（例えば置換）のいずれかを含むそのvlgDであるか、またはそれを含む。表3はまた、CTLA-4の細胞外ドメイン（ECD）またはIgVドメインのSEQ ID NOを参照して、例示的な配列を提示する。示されるように、所与のドメインに対応する正確な遺伝子座または残基は、例えば、そのドメインを同定または分類するために使用される方法に応じて変動し得る。また、場合によっては、所与のドメイン（例えばIgV）の隣接するN末端アミノ酸および/またはC末端アミノ酸もまた、例えば、発現され

50

た場合にドメインの適切なフォールディングを確実にするために、TIMの配列に含めることができる。したがって、表3のSEQ ID NOの例示は限定と解釈されるべきではないことが理解される。例えば、バリエーションCTLA-4ポリペプチドの特定のドメイン、例えばIgVドメインは、それぞれのSEQ ID NOに記載のアミノ酸配列よりも数アミノ酸長くまたは短く、例えば、1～10、例えば、1、2、3、4、5、6または7アミノ酸長くまたは短くてよい。

【0421】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:3～190のいずれか1つに記載のバリエーションCTLA-4 ECDであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:3～190のいずれか1つに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、もしくは99%の同一性を示し、野生型CTLA-4もしくは非改変CTLA-4に存在しない、例えば、SEQ ID NO:1もしくは2に存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む配列であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:3～190のいずれか1つに記載のECD配列のいずれかの特異的結合断片であるか、またはそれを含み、野生型CTLA-4または非改変CTLA-4に存在しない、例えば、SEQ ID NO:1または2に存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む。

【0422】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:192～355のいずれか1つに記載のバリエーションIgV配列であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:192～355のいずれか1つに記載のIgV配列のいずれかに対して少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性、もしくは99%の同一性を示し、野生型CTLA-4もしくは非改変CTLA-4に存在しない、例えば、SEQ ID NO:191に存在しないアミノ酸改変、例えば置換を含む配列であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:192～355のいずれか1つに記載のIgV配列のいずれかの特異的結合断片であり、野生型CTLA-4または非改変CTLA-4に存在しない、例えば、SEQ ID NO:191に記載のアミノ酸改変、例えば置換を含む。

【0423】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:92に記載の配列を含むバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:92に記載の配列から本質的になるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:92に記載の配列からなるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。

【0424】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:113に記載の配列を含むバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:113に記載の配列から本質的になるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:113に記載の配列からなるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。

【0425】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:165に記載の配列を含むバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:165に記載の配列から本質的になるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:165に記載の配列からなるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。

【0426】

いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:186に記載の配列を含むバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:186に記載の配列から本質的になるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。いくつかの態様では、TIMは、SEQ ID NO:186に記載の配列からなるバリエーションCTLA-4ポリペプチドである。

【 0 4 2 7 】

(表 3) IgDまたはvIgDを含む例示的なバリエーションCTLA-4 TIM

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	1,2	191
C122S	668	
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L	3	192
L63P/L98R/N110K	4	193
L12P/A26T	5	194
L12P/A26T/L63P	6	195
L63P/L98Q/Y105L	7	196
L98Q/Y105L	8	197
L63P	9	198
L98R/N110K	10	199
L12P/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	11	200
E33M/Q82H/L98Q/M99L/Y105L	12	201
L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	13	202
S14N/R16C/I18T/M56K/T61A/L63P/A86T/M99L	14	203
S27P/M56K/L63P/S72G/S73R/T89A/M99L/Y105L/I117M	15	204
M56K/L63P/N75D/V96I/M99L/Y105L/L106I	16	205
L63P/S72G/Y105L	17	206
L63P/L98Q/M99L/Y105L/I117M	18	207
L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L	19	202
A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	20	208
L63P/L98Q/V116A	21	209
G29W/L98Q/M99L/Y105L	22	210
T37S/M56V/L98Q/Y105L	23	211
A26T/Y54F/M56K/M99L/Y105L	24	212
L12P/I18T/A26T/M55T/T69S/S72G/M99L/Y105L	25	213
V22I/L63P/L98Q/Y105L/I117M	26	214
A26T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	27	215
E33M/A42T/L98Q/Y105L	28	216
M55T/E97Q/M99L/Y105F	29	217
M55T/S72G/L98Q/M99L/Y105L	30	218
R16C/G29W/E33V/M55T/L63P/L98Q/Y105L	31	219
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106I	32	192

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
M56L/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	33	220
S15P/I18V/M56T/L98Q/M99L/Y105L	34	221
I18T/G29W/L63P/L98Q/Y105L	35	222
L63P/Q82H/L98Q/M99L/Y105L	36	223
L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117T	37	224
L98Q/M99L/Y105L/L106I/Y115N	38	224
M55T/L63P/T71I/M99L/Y105L	39	225
A26T/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L	40	226
I18T/A26T/L63P/Q82R/L98Q/Y105L	41	227
L12H/M55T/E59D/L63P/M99L	42	228
I18T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108V	43	229
I18T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	44	230
T61A/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	45	231
V38I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	46	232
L63P/S72G/I93L/L98Q/M99L/Y105L	47	233
L12I/M55T/M56V/I67T/M99L/L106R/I108F	48	234
I18N/A26T/L63H/T89A/L98Q/M99L/Y105L	49	235
I18T/E48R/L63P/T69S/L98Q/Y105L/N110Y	50	236
I18N/L63P/S72T/M87T/L98Q/Y105L/N110S	51	237
G29W/M56T/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	52	238
G29W/N58S/L63P/M87T/L98Q/M99L/Y105L	53	239
G29W/N58S/L63P/D64N/L98Q/M99L/Y105L	54	240
I18T/L63P/S72G/M87K/L98Q/M99L/Y105L	55	241
M56V	56	242
L63P/K95R	57	243
L63P/L98Q	58	209
L98Q/M99L/Y105L	59	224
L63P/M87K/M99L/L106R	60	244
L63P/M99L/Y105L/I108F	61	245
V10A/L63P/L98Q/Y105L	62	246
M56T/L91R/L98Q/Y105L	63	247
A26T/L63P/M87V/N110K/I117E	64	248
G29W/L63P/L98Q/M99L/Y105L	65	249
A26T/V46E/L63P/D65G/L98Q	66	250
G29W/N58S/L63P/L98Q/Y105L	67	251
G29W/E59G/L63P/L98Q/Y105L	68	252
L12H/L63P/S72G/L98Q/Y105L	69	253
A6T/A26T/M55T/M99L/Y105L	70	254
A26T/L63P/D65G/L98Q/M99L/Y105L	71	255
V10A/L63P/D64V/S72G/L98Q/M99L/Y105L	72	256
L12P/G29W/D43N/N58S/L63P/L98Q/M99L/Y105L	73	257
I18V/A26T/L63P/D64E/L98Q/Y105L/L106R/N110K	74	258

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
A19V/G29W/R35K/L63P/L98Q/M99L/Y105L	75	259
L12P/A26T/L63P/S72G/T89M/L98Q/M99L/Y105L	76	260
P28L/E33V/L63P/S72G/L98R/M99L/Y105L	77	261
E24Q/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	78	262
I18T/G29R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	79	263
L63P/L98Q/M99L/Y105L	80	207
Q41L/Y54F/M56K/M99L/I108F	81	264
S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117T	82	265
M56R/L63P/L98Q/M99L/Y105L	83	266
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L	84	267
L63P/L98Q/M99L/Y105L/L106I	85	207
A26T/M55R/L98Q/M99L/Y105L	86	268
L63P/S72G/M87A/L98Q/Y105L	87	269
A26D/S72G/L98Q/M99L/Y105L	88	270
V22A/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P119H	89	271
A26T/M55T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	90	272
E33V/A42S/M55T/L98Q/M99L/Y105L	91	273
G29W/N58S/L63P/Q82R/L98Q/Y105L	92	274
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L	93	267
A26T/I67N/S72G/L98Q/M99L/Y105L	94	275
L12F/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106R	95	276
S20N/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	96	277
G29W/T61I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	97	278
G29W/N58S/L63P/T69I/L98Q/M99L/Y105L	98	279
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N	99	280
L63P/T69A/L98Q/M99L/Y105L/L106R/V116A	100	281
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	101	282
G29W/L63P/D65G/S72G/L98Q/Y105L	102	283
T53S/M56V/L98Q/Y105L	103	284
L63P/S72G/L98Q/Y105L	104	285
I18A/L63P/S72G/L98Q/Y105L	105	286
G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L	106	287
I18V/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	107	288
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	108	289
G29W/L63P/I67V/S72G/L98Q/Y105L	109	290
G29W/M55V/E59G/L63P/L98Q/Y105L	110	291
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L	111	289
L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	112	285
L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L	113	292
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	114	293
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	115	293
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	116	289

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	117	283
A26T/T53S/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	118	294
G29W/N58S/L63P/S72G/M87V/L98Q/Y105L	119	295
G29W/S72G/Q76R/L98Q/Y105L/L106I/Q113H	120	296
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106V	121	283
A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	122	297
G29W/N58D/I67V/L98Q/M99L/Y105L	123	298
I67V/S72G/Q82H/T89A/L98Q/M99L/Y105L	124	299
S72G/R85G/L98Q/M99L/Y105L/L106I	125	300
A26T/T47A/M56K/L63P/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L	126	301
A26T/M55T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	127	302
L12H/I18V/A42T/M55T/N58D/L98R/Y105L/L106I/P121S	128	303
I18T/A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L	129	304
L12F/K30R/S72G/Q82R/L98Q/M99L/Y105L	130	305
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N/I117L	131	316
G29W/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L	132	306
P28L/E33V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	133	307
G29W/T53S/M56K/L63P/Q82H/L98Q/M99I/Y105L	134	308
I18F/L63P/L98Q/M99L/Y105L/P121S	135	309
L63P/L98Q/M99L/Y105L/I108V	136	207
A26T/A42V/Q45H/I67N/M87K/E97Q/M99L	137	310
M56V/E59G/L63P/S72G/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L/I117E	138	311
G29W/M87K/T89S/L98Q/M99L/Y105L/I108V/I117L	139	278
L12P/M56V/L63P/V96I/L98Q/M99L/Y105L/Y115H	140	312
G29W/T53S/M56K/T61N/L63P/L98Q/Y105L	141	313
I18T/A26S/M55T/M56V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117K	142	314
I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	143	315
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	144	316
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108F	145	267
L12P/R16H/A26T/T61S/L63P/M87V/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L	146	317
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/P121S	147	318
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S	148	289
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	149	318
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/I108V	150	318
G29W/T53S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	151	319
V10A/G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L/P121S	152	320
A31Y/L106E	153,	321
A31Y/L106E/C122S	155,	321
T89A/L98Q/M99L/Y105L/L106I/Y115N/E120D/C122P/D124P/S125I/D126P	157	322
N58S/L63P/T71A/S72G/L98Q/M99L/Y105L/D124I/S125P/D126T	158	323
R16G/E33M/N58S/E59G/L63P/L98Q/Y105L/E120D/C122P/D124P/S125I/D126P	159	324
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S/D126T	160	325

10

20

30

40

50

変異	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
L12H/E33M/L98Q/Y105L	161	326
T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	162	327
I18T/A26T/M55T/M56K/L63P/L98Q/M99L/Y105L	163	328
I18T/A26T/M56K/L63P/L98Q/Y105L	164	329
T53S/L63P/L98Q	165	330
T53S/L63P/Y105L	166	331
T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q	167	332
T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/Y105L	168	333
T53S/M56K/N58S/L63P/L98Q/Y105L	169	334
T53S/M56K/N58S/M87V/L98Q/Y105L	170	335
T53S/M56K/L63P/M87V/L98Q/Y105L	171	336
T53S/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	172	337
M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	173	338
E33V/L98Q/Y105L	174	339
E33V/M99L/Y105L	175	340
E33V/L98Q/M99L	176	341
E33V/M99L	177	342
L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q	178	343
L12F/R16H/G29W/M56T/Y105L	179	344
L12F/R16H/G29W/L98Q/Y105L	180	345
L12F/R16H/M56T/L98Q/Y105L	181	346
G29W/M56T/L98Q/Y105L	182	347
L12F/G29W/L98Q/Y105L	183	348
L12F/L98Q/Y105L	184	349
R16H/L98Q/Y105L	185	350
G29W/L98Q/Y105L	186	351
M56T/L98Q/Y105L	187	352
L12F/R16H/G29W/M56T/S72G/L98Q/Y105L	188	353
G29W/M56T/S72G/L98Q/Y105L	189	354
I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/P102L/Y105L	190	355

【 0 4 2 8 】

C. 形式

本明細書において提供される1つまたは複数のBIMと1つまたは複数のTIMとを含むマルチドメイン免疫調節タンパク質は、例えば、一本鎖ポリペプチド融合体として、または多量体（例えば、二量体、三量体、四量体または五量体）分子として、様々な方法で形式化され得る。特定の形式は、免疫調節タンパク質のBIMがB細胞刺激受容体のリガンドに特異的に結合し、TIMがT細胞刺激受容体、またはT細胞刺激受容体のリガンドに特異的に結合するように選択される。いくつかの局面では、特定の形式は、T細胞刺激受容体およびB細胞刺激受容体の活性の減弱をもたらすように、例えば、T細胞およびB細胞によってそれぞれ媒介される免疫応答を低減または低下させるように選択される。いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質のモジュール形式は、B細胞刺激受容体とT細胞刺激受容体およびそれらのリガンドとの間の相互作用を伴う免疫シナプスでの活性を調節するための免疫調節タンパク質を操作または生成するための柔軟性をもたらす。

【 0 4 2 9 】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、マルチドメイン免疫調節タンパク質の形式は、T細胞刺激受容体の架橋または関与を回避するように選択される。したがって、いくつかの局面では、提供される免疫調節タンパク質は、T細胞刺激受容体への多価結合を示さない。例えば、TIMがT細胞刺激受容体、例えばCD28に結合する生成された免疫調節タンパク質では、免疫調節タンパク質の比較的小さい分子量、単量体ポリペプチド融合体および/または一本鎖ポリペプチド融合体が企図される。

【0430】

いくつかの態様では、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質は、1つまたは複数のBIMと1つまたは複数のTIMとを含み得る。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、本明細書において記載される1つまたは複数のBIMと、本明細書において記載される任意の1つまたは複数のTIMとを含み得る。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、いくつかの局面では複数が含まれる場合、同じであるかまたは同一の配列である正確に1、2、3、4、5つのBIMを含む。いくつかの態様では、複数の、例えば、2、3、4または5つの各々は、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、別のBIMに連結される。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、いくつかの局面では複数が含まれる場合、同じであるかまたは同一の配列である正確に1、2、3、4、5つのTIMを含む。いくつかの態様では、複数のTIM、例えば、2、3、4または5つの各々は、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、別のTIMに連結される。

【0431】

いくつかの態様では、マルチドメイン免疫調節タンパク質は、少なくとも1つのBIMと少なくとも1つのTIMとを含むポリペプチドを含む。いくつかの局面では、1つまたは複数のBIM分子のうちの少なくとも1つは、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、1つまたは複数のTIMのうちの少なくとも1つに連結される。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、いずれかの順序で、直接的に、またはリンカーを介して間接的にTIMに連結されたBIMを含むポリペプチドを含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのBIMは、ポリペプチド内で少なくとも1つのTIMに対してアミノ末端側にある。いくつかの態様では、少なくとも1つのBIMは、ポリペプチド内で少なくとも1つのTIMに対してカルボキシ末端側にある。

【0432】

単一ポリペプチド鎖の態様に加えて、いくつかの態様では、1つもしくは複数のBIMおよび/または1つもしくは複数のBIMを含むポリペプチドの2、3、4つまたはそれ以上を互いに共有結合または非共有結合させることができる。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリペプチド鎖は1つまたは複数のBIMを含み、少なくとも1つのポリペプチド鎖は1つまたは複数のTIMを含む。いくつかの態様では、少なくとも2つのポリペプチド鎖の各々は、少なくとも1つのBIMと少なくとも1つのTIMとを含む。したがって、単量体タンパク質、二量体タンパク質および高次（例えば、3、4、5またはそれ以上）多量体タンパク質が本明細書において提供される。例えば、いくつかの態様では、それぞれ1つもしくは複数のBIMおよび/または1つもしくは複数のTIMを含む正確に2つのポリペプチドを互いに共有結合または非共有結合させて、二量体を形成することができる。いくつかの態様では、2つのポリペプチドは、多量体化ドメインを介して結合され得、いくつかの局面では、BIMおよびTIMの一方または両方は、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、多量体化ドメインに連結される。そのような態様では、多量体化ドメインは、同じであり得るか、または異なり得る。いくつかの態様では、Fc領域などの多量体化ドメインは、鎖間システインジスルフィド結合を介した2つのポリペプチド鎖の結合を促進する。2つ以上のポリペプチドを含む組成物は、同一の配列もしくは実質的に同一の配列のポリペプチド（例えばホモ二量体）、または非同一の配列のポリペプチド（例えばヘテロ二量体）であり得る。

【0433】

いくつかの態様では、マルチドメイン免疫調節タンパク質は、タグまたは部分をさらに含むことができる。

【0434】

提供される形式に含めるための構成要素の非限定的な例は、以下のサブセクションでさらに説明される。提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の例示的なFc融合形式を図16に示す。

【0435】

1. リンカー

本明細書において提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質では、リンカー（スペーサーという用語と区別なく使用される）を使用して、ポリペプチドの成分、例えば、本明細書において提供される任意のBIMおよび/またはTIMを接続することができる。場合によっては、リンカーは、ペプチドもしくはポリペプチド配列（例えば、合成ペプチドまたは合成ポリペプチド配列）であるか、または2つの部分を接続することができる非ペプチドリリンカーである。いくつかの局面では、リンカーは、例えば、免疫調節タンパク質の機能的特性を維持するために、個々の残基の構造的柔軟性および他の立体構造的特徴を維持するために、またはポリペプチド融合タンパク質のドメインの二次構造レベル、三次構造レベルもしくは四次構造レベルで、使用または選択される。リンカーはまた、追加の有益な特性、例えば、哺乳動物発現系内のタンパク質発現の増加、安定性および溶解度などの生物物理学的特性の改善、タンパク質の精製および検出の改善、ならびに/または酵素活性の増加をタンパク質にもたらしすることができる。いくつかの例では、2つ以上のリンカーは、タンデムに連結され得る。

【0436】

いくつかの局面では、リンカーはペプチドリリンカーであり得る。他の局面では、リンカーは、化学的連結剤およびヘテロ二官能性連結剤を含む。場合によっては、リンカーは切断可能ではない。他の場合には、リンカーは、リンカーの配列内に位置し得るか、またはリンカー配列のいずれかの末端でリンカーに隣接し得る1つまたは複数のプロテアーゼ切断可能部位を含むことができる。

【0437】

複数のリンカーがBIM、TIMまたは他の部分の間で免疫調節タンパク質に存在する場合、リンカーの各々は、同じであり得るか、または異なり得る。一般に、リンカーまたは複数のリンカーは、ポリペプチド分子に柔軟性をもたらす。

【0438】

いくつかの態様では、1つまたは複数の「ペプチドリリンカー」は、免疫調節タンパク質のBIM、TIMまたは他の部分を連結する。いくつかの態様では、ペプチドリリンカーは、単一のアミノ酸残基またはそれ以上の長さであり得る。いくつかの態様では、ペプチドリリンカーは、少なくとも1個のアミノ酸残基を有するが、長さが20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下のアミノ酸残基である。いくつかの態様では、リンカーは可撓性リンカーである。連結部分は、例えば、Huston et al. (1988) PNAS 85:5879-5883、Whitlow et al. (1993) Protein Engineering 6:989-995、およびNewton et al. (1996) Biochemistry 35:545-553に記載されている。他の好適なペプチドリリンカーには、米国特許第4,751,180号または米国特許第4,935,233号に記載されているもののいずれかが含まれる。

【0439】

いくつかの例では、ペプチドリリンカーは、アミノ酸の第1の直鎖状配列を、天然に連結されていないかまたは天然では遺伝的に融合されていない、アミノ酸の第2の直鎖状配列に連結または遺伝的に融合するアミノ酸配列を含むペプチド（またはポリペプチド）（例えば、天然ペプチド、または天然に存在しないペプチド）を含む。例えば、ペプチドリリンカーは、天然に存在するポリペプチド（例えば、付加、置換または欠失などの変異を含む）の改変形態である、天然に存在しないポリペプチドを含み得る。別の例では、ペプチドリリンカーは、天然に存在しないアミノ酸を含み得る。別の例では、ペプチドリリンカーは、天然に存在しない直鎖状配列で存在する、天然に存在するアミノ酸を含み得る。さらに別の例では、ペプチドリリンカーは、天然に存在するポリペプチド配列を含み得る。連結部分

はまた、天然に存在するアミノ酸の誘導体および類似体、ならびに当技術分野において公知の疎水性または非疎水性の様々な天然に存在しないアミノ酸（D-またはL-）を含み得る。

【0440】

例示的なペプチドリinkerは、式 $\text{Ser}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ 残基（または $(\text{Gly-Ser})_n$ 残基を有するリンカーであり、いくつかのGlu残基またはLys残基は、溶解度を増加させるために全体に分散しており、式中、 n は、1～20の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20であり得る。他の例示的なリンカーには、式 $[(\text{Gly})_x\text{-Ser}_y]_z$ を有するペプチドリinkerが含まれ、式中、 x は1～4であり、 y は0または1であり、 z は1～50である。他の例では、ペプチドリinkerは、配列 G_n を含み、式中、 n は、1～100の整数であり得る。別の例では、ペプチドリinkerの配列は、 $(GA)_n$ または $(GGS)_n$ であり得る。

【0441】

いくつかの態様では、リンカーは、（1文字アミノ酸コードで）:GGGGS（「4GS」; SEQ ID NO:593）、または4GSリンカーの多量体、例えば、2、3、4もしくは5個の4GSリンカーのリピートである。いくつかの態様では、ペプチドリinkerは、 $(GGGGS)_2$ （SEQ ID NO:594）、 $(GGGGS)_3$ （SEQ ID NO:595）、 $(GGGGS)_4$ （SEQ ID NO:600）、または $(GGGGS)_5$ （SEQ ID NO:671）である。いくつかの態様では、リンカーはまた、単独で、または別のペプチドリinker（4GSリンカーまたはその多量体など）に加えて、一連のアラニン残基を含むことができる。いくつかの態様では、各系列のアラニン残基の数は、2、3、4、5または6アラニンである。いくつかの態様では、リンカーは剛性リンカーである。例えば、リンカーは α ヘリカルリンカーである。いくつかの態様では、リンカーは、（1文字アミノ酸コードで）:EAAAK（SEQ ID NO:711）、またはEAAAKリンカーの多量体、例えば、SEQ ID NO:712（2xEAAAK）、SEQ ID NO:713（3xEAAAK）、SEQ ID NO:714（4xEAAAK）、SEQ ID NO:715（5xEAAAK）もしくはSEQ ID NO:665（6xEAAAK）に記載されているような2、3、4、5もしくは6個のEAAAKリンカーのリピートである。いくつかの態様では、リンカーは、クロニングによっておよび/または制限部位から導入されたアミノ酸をさらに含むことができ、例えば、リンカーは、制限部位BAMHIの使用によって導入されたアミノ酸GS（1文字アミノ酸コードで）を含むことができる。いくつかの態様では、リンカー（1文字アミノ酸コードで）は、GSGGGGS（SEQ ID NO:590）またはGGGGSSA（SEQ ID NO:596）である。いくつかの例では、リンカーは、2xGGGGS、続いて3つのアラニンである（GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO:721）。

【0442】

いくつかの態様では、所望のペプチドリinkerをコードするポリヌクレオチドは、任意の好適な従来技術を使用して、提供される免疫調節タンパク質内の任意のTIM、BIMまたは他の部分をコードするポリヌクレオチドの間に、および提供される免疫調節タンパク質内の任意のTIM、BIMまたは他の部分をコードするポリヌクレオチドと同じリーディングフレームに、ならびに別の部分の間に挿入され得る。

【0443】

2. 多量体化ドメイン

いくつかの態様では、1つまたは複数のBIMおよび/またはTIMを含む免疫調節タンパク質は、二量体、三量体、四量体または五量体などの多量体である。二量体形式の場合、免疫調節タンパク質は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む。いくつかの態様では、第1および/または第2のポリペプチドは、BIM、TIMもしくはその両方であるか、またはそれを含む。局面では、BIMおよび/またはTIMは、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、多量体化ドメインに連結される。いくつかの局面では、多量体化ドメインは、分子の半減期を増加させる。リンカーは、上記のいずれかを含むことができる。

【0444】

一例では、本明細書において提供される免疫調節タンパク質は二量体である。場合によっては、免疫調節タンパク質は、同じである、すなわち、同一のBIMおよびTIMを含む同じアミノ酸配列を各々有する第1および第2のポリペプチドサブユニットを含むホモ二量体である。ホモ二量体は、バリエーションポリペプチドをコードする核酸分子で細胞を形質転換することによって形成され得、分泌時に、ポリペプチドサブユニットの残基間に共有結合相互作用または非共有結合相互作用をもたらして、二量体の形成を媒介する。

【0445】

別の例では、免疫調節タンパク質は、異なる第1および第2のポリペプチドサブユニットを含むヘテロ二量体である。そのような例では、第1または第2のポリペプチドサブユニットの一方または両方は、BIMおよびTIMのアミノ酸配列を含む。場合によっては、第1および第2のポリペプチドサブユニットの両方が、BIMのアミノ酸配列とTIMのアミノ酸配列とを含み得る。ヘテロ二量体は、第1のポリペプチドサブユニットをコードする第1の核酸分子と、第2の異なるポリペプチドサブユニットをコードする第2の核酸分子とで細胞を形質転換することによって形成され得る。いくつかの局面では、ヘテロ二量体は、二量体の形成を媒介する2つのポリペプチドサブユニットの残基間の共有結合相互作用または非共有結合相互作用の結果として、細胞からの発現および分泌時に産生される。そのようなプロセスでは、一般に、ホモ二量体およびヘテロ二量体を含む二量体分子の混合物が形成される。ヘテロ二量体の生成では、精製のための追加の工程が必要であり得る。例えば、第1および第2のポリペプチドは、金属キレートまたは他のエピトープを有するタグを含むように操作され得、タグは様々である。タグ化ドメインは、ウエスタンブロットによる検出、免疫沈降、またはバイオアッセイにおける活性枯渇/ブロッキングを可能にするために、金属-キレートクロマトグラフィーおよび/または抗体による迅速な精製に使用され得る。

【0446】

免疫調節タンパク質の2つ以上のポリペプチドの相互作用は、それら自体が相互作用して安定な構造を形成することができる任意の部分または他のポリペプチドへの直接的または間接的なそれらの連結によって促進され得る。例えば、別個のコードされたポリペプチド鎖は、多量体化によって連結され得、それにより、ポリペプチドの多量体化は、多量体化ドメインによって媒介される。典型的には、多量体化ドメインは、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間の安定なタンパク質-タンパク質相互作用の形成をもたらす。

【0447】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質の2つ以上の個々のポリペプチドは、多量体化によって、例えば、二量体分子、三量体分子、四量体分子または五量体分子として連結され得る。場合によっては、個々のポリペプチドは同じである。例えば、三量体分子は、同じ個々のポリペプチドの3コピーから形成され得る。他の例では、四量体分子は、同じ個々のポリペプチドの4コピーから生成される。さらなる例では、五量体分子は、同じ個々のポリペプチドの5コピーから生成される。構成のいくつかの態様では、BIMおよび/またはTIMを含む免疫調節タンパク質の個々のポリペプチドは、多量体化ドメインに融合される。多量体化ドメインは、ポリペプチド鎖の二量体化、三量体化、四量体化または五量体化を促進するものであり得る。

【0448】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、多量体、例えば二量体を形成する。いくつかの態様では、二量体は、免疫調節タンパク質の2つのポリペプチドが同じであるホモ二量体である。いくつかの態様では、二量体は、免疫調節タンパク質の2つのポリペプチドが異なるヘテロ二量体である。

【0449】

いくつかの態様では、多量体化ドメインは、安定なタンパク質-タンパク質相互作用を形成することができるいずれかを含む。多量体化ドメインは、免疫グロブリン配列（例えばFcドメイン；例えば、国際特許公開番号WO93/10151およびWO2005/063816 US；米国特許出願公開第2006/0024298号；米国特許第5,457,035号を参照）；ロイシンジ

ッパー（例えば、核形質転換タンパク質fosおよびjun、もしくはがん原遺伝子c-myc由来、またはGeneral Control of Nitrogen (GCN4) 由来）（例えば、Busch and Sassone-Corsi (1990) Trends Genetics, 6:36-40; Gentz et al., (1989) Science, 243:1695-1699を参照）；疎水性領域；親水性領域；またはホモ多量体もしくはヘテロ多量体のキメラ分子間に分子間ジスルフィド結合を形成する遊離チオールを介して相互作用することができる。さらに、多量体化ドメインは、ホールを含むアミノ酸配列に相補的な突起部を含むアミノ酸配列を含み得、例えば、米国特許第5,731,168号、国際特許公開番号WO98/50431およびWO2005/063816; Ridgway et al. (1996) Protein Engineering, 9:617-621などに記載されている。そのような多量体化領域は、立体相互作用が安定な相互作用を促進するだけでなく、キメラ単量体の混合物からホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成をさらに促進するように操作され得る。一般に、突起部は、第1のポリペプチドの界面からの小さなアミノ酸側鎖をさらに大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）によって置換することによって構築される。任意で、大きなアミノ酸側鎖をさらに小さなもの（例えば、アラニンまたはトレオニン）によって置換することによって、突起部と同一または類似のサイズの補填的な空洞が、第2のポリペプチドの界面上に作製される。例示的な多量体化ドメインを以下に記載する。

10

【0450】

BIMおよび/またはTIMは、キメラポリペプチドを形成するために、場所を問わないが典型的にはそのN末端またはC末端を介して、多量体化ドメインのN末端またはC末端に連結され得る。連結は、直接的、またはリンカーを介して間接的であり得る。また、キメラポリペプチドは、融合タンパク質であり得るか、または共有結合相互作用もしくは非共有結合相互作用などによる化学結合によって形成され得る。例えば、多量体化ドメインを含むキメラポリペプチドを調製する場合、BIMおよび/またはTIMの全部または一部をコードする核酸を、多量体化ドメイン配列をコードする核酸に、直接的もしくは間接的に、または任意でリンカードメインを介して、機能的に連結することができる。場合によっては、構築物は、BIMおよび/またはTIMのC末端が多量体化ドメインのN末端に連結されているキメラタンパク質をコードする。いくつかの例では、構築物は、BIMおよび/またはTIMのN末端が多量体化ドメインのN末端またはC末端に連結されているキメラタンパク質をコードすることができる。

20

【0451】

ポリペプチド多量体は、直接的または間接的に、2つの同じまたは異なるBIMおよび/またはTIMを多量体化ドメインに直接的または間接的に連結することによって作製された2つのキメラタンパク質を含む。多量体化ドメインがポリペプチドであるいくつかの例では、BIMおよび/またはTIMならびに多量体化ドメインをコードする遺伝子融合体が、適切な発現ベクターに挿入される。得られたキメラタンパク質または融合タンパク質は、組換え発現ベクターによって形質転換された宿主細胞内で発現され、多量体に集合することが可能になり得、多量体化ドメインは、相互作用して多価ポリペプチドを形成する。BIMおよび/またはTIMへの多量体化ドメインの化学結合は、ヘテロ二官能性リンカーを使用して行われ得る。

30

【0452】

融合タンパク質などの得られたキメラポリペプチド、およびそれから形成された多量体は、任意の好適な方法、例えば、プロテインAまたはプロテインGカラムでのアフィニティークロマトグラフィーなどによって精製され得る。異なるポリペプチドをコードする2つの核酸分子で細胞を形質転換する場合、ホモ二量体およびヘテロ二量体の形成が起こる。発現条件は、ホモ二量体形成よりもヘテロ二量体形成が優先されるように調整され得る。

40

【0453】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、免疫グロブリンFc（「免疫調節Fc融合体」をもたらす）に結合したBIMおよび/またはTIMを含む。いくつかの態様では、BIMおよび/またはTIMの結合は、FcのN末端にある。いくつかの態様では、BIMおよび/ま

50

たはTIMの結合は、FcのC末端にある。いくつかの態様では、2つ以上のBIMおよび/またはTIM（同じまたは異なる）が、N末端およびC末端に独立して結合される。したがって、ホモ多量体ポリペプチドまたはヘテロ多量体ポリペプチドは、別個のBIMおよび/またはTIM含有ポリペプチドの共発現から生成され得る。第1および第2のポリペプチドは、同じであり得るか、または異なり得る。いくつかの態様では、第1および/または第2のポリペプチドはそれぞれ、Fc配列に連結された2つ以上のBIMおよび/またはTIMを含む。いくつかの態様では、第1および/または第2のポリペプチドはそれぞれ、Fc配列に連結された3つのTIMおよび1つのBIMを含む。提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の例示的なFc融合形式を図16に示す。

【0454】

いくつかの態様では、Fcは、マウスFcまたはヒトFcである。いくつかの態様では、Fcは、哺乳動物IgG1 Fc領域、IgG2 Fc領域、IgG3 Fc領域もしくはIgG4 Fc領域、またはヒトIgG1 Fc領域、IgG2 Fc領域、IgG3 Fc領域もしくはIgG4 Fc領域である。

【0455】

いくつかの態様では、Fcは、ヒトIgG1などのIgG1に由来する。いくつかの態様では、Fcは、EUナンバリングによる356位および358位に残基Glu（E）およびMet（M）を含むアロタイプを有する、SEQ ID NO:586に記載のIgG1 Fcである。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:586に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:586に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。他の態様では、Fcは、ヒトG1m1アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO:597に記載されているように、356および358位にAsp（D）およびLeu（L）を含む残基などを含むIgG1 Fcである。したがって、場合によっては、本明細書において提供されるFcは、アロタイプG1 m1の残基を再構成するためのアミノ酸置換E356DおよびM358Lを含み得る。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:597に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0456】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列を有する。
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGPPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:597)

【0457】

いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:755に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:756に記載の配列を含む。いくつかの態様では、本明細書において提供される構築物に使用されるFc領域は、C末端リジン残基をさらに欠くことができる。

【0458】

いくつかの態様では、Fcは、ヒトIgG2などのIgG2に由来する。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:726に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:726に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:726に記載の配列を有するIgG2 Fc領域である。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:822に記載の配列を有するIgG2 Fc領域である。

【0459】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、Fcは、ヒトIgG4などのIgG4に由来する。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:727に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:727に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、IgG4 Fcは、ヒトIgG4のCH3ドメインがヒトIgG1のCH3ドメインによって置換されており、凝集体形成の阻害を示す安定化Fc、ヒトIgG4のCH3ドメインおよびCH2ドメインが、それぞれヒトIgG1のCH3ドメインおよびCH2ドメインによって置換されている抗体、またはヒトIgG4の、Kabatらによって提案されたEUインデックスに示される409位のアルギニンがリジンによって置換されており、凝集体形成の阻害を示す抗体である（例えば、米国特許第8,911,726号を参照。いくつかの態様では、Fcは、Fabアーム交換によって治療用抗体と内因性IgG4との間の組換えを妨げることが示されているS228P変異を含むIgG4である（例えば、Labrijn et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27 (8) :767-71を参照。）いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:728に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:728に対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:728に記載のIgG4 Fc領域である。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:823に記載のIgG4 Fc領域である。

10

【0460】

いくつかの態様では、Fc領域は、その正常な機能のうちの1つまたは複数を変化させる（例えば、低下させる）ためのもう1つの改変を含む。一般に、Fc領域は、免疫グロブリンの主な機能である抗原結合能に加えて、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞傷害（ADCC）などのエフェクター機能を担う。さらに、Fc領域に存在するFcRn配列は、インビボFcRn受容体へのコンジュゲーションによってインビボ半減期を増加させることにより、血清中のIgGレベルを調節する役割を果たす。いくつかの態様では、そのような機能は、提供されるFc融合タンパク質とともに使用するためのFcでは低下または変化させることができる。

20

【0461】

いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変をFc領域に導入し、それによって、Fc領域バリエーションを生成してもよい。いくつかの態様では、Fc領域バリエーションは、低下したエフェクター機能を有する。エフェクター機能を変化させることができる、Fc配列に対する変化または変異の多くの例がある。例えば、国際公開公報第00/42072号、国際公開公報第2006019447号、国際公開公報第2012125850号、国際公開公報第2015/107026号、米国特許第2016/0017041号およびShields et al. J Biol. Chem. 9 (2) :6591-6604 (2001) は、FcRへの結合が改善または減少した例示的なFcバリエーションを記載している。これらの刊行物の内容は、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

30

【0462】

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質は、低下したエフェクター機能を示すFc領域を含み、これにより、インビボでの免疫調節タンパク質の半減期が重要であるが、ある特定のエフェクター機能（CDCおよびADCCなど）が不要または有害である用途の望ましい候補になる。CDCおよび/またはADCC活性の低下/枯渇を確認するために、インビトロおよび/またはインビボ細胞傷害アッセイを行うことができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを行って、免疫調節タンパク質がFcγR結合を欠く（したがって、おそらくADCC活性を欠く）が、FcRn結合能を保持することを、確実にすることができる。ADCC、NK細胞を媒介するための初代細胞はFcγRIIIのみを発現するが、単球はFcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) の464頁の表2に要約されている。関心対象の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. U

40

50

SA 83:7059-7063 (1986) を参照)、および Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 米国特許第 5,821,337 号 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987) を参照) に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を使用してもよい (例えば、フローサイトメトリーのための ACT1 (商標) 非放射性細胞傷害アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, Calif.; および CytoTox 96 (商標) 非放射性細胞傷害アッセイ (Promega, Madison, Wis. を参照)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。代替的にまたは追加的に、関心対象の分子の ADCC 活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) に開示されているような動物モデルを対象として評価され得る。免疫調節タンパク質が C1q に結合することができず、したがって CDC 活性を欠くことを確認するために、C1q 結合アッセイを行ってもよい。例えば、国際公開公報第 2006/029879 号および国際公開公報第 2005/100402 号の C1q および C3c 結合 ELISA を参照されたい。補体活性化を評価するために、CDC アッセイを行ってもよい (例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); および Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004) を参照)。FcRn 結合およびインビボクリアランス/半減期の決定は、当技術分野において公知の方法を使用して行うこともできる (例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006) を参照)。

10

20

【0463】

エフェクター機能が低下した免疫調節タンパク質には、EU ナンバリングによる、Fc 領域残基 238、265、269、270、297、327 および 329 のうちの 1 つまたは複数が置換されたものが含まれる (米国特許第 6,737,056 号)。そのような Fc 変異体には、残基 265 および 297 がアラニンに置換されたいわゆる「DANA」Fc 変異体を含め、EU ナンバリングによる、アミノ酸位置 265、269、270、297 および 327 のうちの 2 つ以上に置換を有する Fc 変異体が含まれる (米国特許第 7,332,581 号)。

【0464】

いくつかの局面では、野生型 Fc は、エフェクター活性を低下させるために、または Fc を Fc エフェクター機能に関して不活性にするために、1 つまたは複数のアミノ酸置換によって改変される。例示的なエフェクターレス変異または不活性変異には、本明細書において記載されるものが含まれる。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質の Fc 領域は、234、235、236、237、238、239、270、297、298、325 および 329 位 (EU ナンバリングにより示される) のアミノ酸のうちのいずれか 1 つまたは複数が、天然 Fc 領域と比較して異なるアミノ酸によって置換されている Fc 領域を有する。Fc 領域のこのような変化は、上記の変化に限定されず、これらには、例えば、Current Opinion in Biotechnology (2009) 20 (6), 685-691 に記載されている脱グリコシル化鎖 (N297A および N297Q)、IgG1-N297G、IgG1-L234A/L235A、IgG1-L234A/L235E/G237A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A および IgG4-L236E などの変化; 国際公開公報第 2008/092117 号に記載されている G236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R および N325LL328R などの変化; 233、234、235 および 237 位 (EU ナンバリングにより示される) におけるアミノ酸挿入; ならびに国際公開公報第 2000/042072 号に記載されている部位における変化が含まれる。FcR への結合が改善または減少したある特定の Fc バリエーションが記載されている。(例えば、米国特許第 6,737,056 号; 国際公開公報第 2004/056312 号、国際公開公報第 2006019447 号、および Shields et al., J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001) を参照。)

30

40

【0465】

いくつかの態様では、半減期を増加させるおよび/または新生児型 Fc 受容体 (FcRn)

50

への結合を改善する1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションFc領域を含む免疫調節タンパク質が提供される。半減期が増加し、FcRnへの結合が改善された抗体は、米国特許第2005/0014934号 (Hinton et al.) または国際公開公報第2015107026号に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つまたは複数の置換を有するFc領域を含む。そのようなFcバリエーションには、EUナンバリングによる、Fc領域残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434のうちの1つまたは複数に置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものが含まれる (米国特許第7,371,826号)。

【0466】

10

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質のFc領域は、EUナンバリングによる、1つまたは複数のアミノ酸置換C220S、C226Sおよび/またはC229Sを含む。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質のFc領域は、1つまたは複数のアミノ酸置換R292CおよびV302Cを含む。Fc領域バリエーションの他の例に関するDuncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; および国際公開公報第94/29351号を参照されたい。

【0467】

いくつかの態様では、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開公報第99/51642号、およびIdusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000) に記載されているように、Fc領域に対して、C1q結合および/または補体依存性細胞傷害 (CDC) の減少をもたらす変化が加えられる。

20

【0468】

いくつかの態様では、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むバリエーションFc領域を含む免疫調節タンパク質が提供され、バリエーションFc領域は、野生型IgG1、例えば野生型ヒトIgG1に由来する。いくつかの態様では、野生型IgG1 Fcは、EUナンバリングによる356および358位に残基Glu (E) およびMet (M) を含むアロタイプを有する、SEQ ID NO:586に記載のFcであり得る。いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:586に記載のアミノ酸配列に由来する。他の態様では、野生型IgG1 Fcは、ヒトG1m1アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO:597に記載されているように、356および358位にAsp (D) およびLeu (L) を含む残基を含む。したがって、場合によっては、バリエーションFcは、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列に由来する。

30

【0469】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586または597に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを含く (EUナンバリングによるK447delに対応する)。

【0470】

いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:586のナンバリングによる、N82Gである (EUナンバリングによるN297Gに対応する) 少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、Fcは、SEQ ID NO:586のナンバリングによる、R77CまたはV87Cである (EUナンバリングによるR292CまたはV302Cに対応する) 少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含む。いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、SEQ ID NO:586のナンバリングによるC5Sアミノ酸改変 (EUナンバリングによるC220Sに対応する) をさらに含む。例えば、いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、以下のアミノ酸改変、すなわち、EUナンバリングによるN297G、および以下のアミノ酸改変、すなわち、C220S、R292CまたはV302Cのうちの1つまたは複数 (SEQ ID NO:586を基準として、N82G、および以下のアミノ酸改変、すなわち、C5S、R77CまたはV87Cのうちの1つまたは複数に対応する) を含み、例えば、Fc領域は、SEQ ID NO:598に記載の配列を含む。

40

【0471】

いくつかの態様では、バリエーションFcは、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234

50

A/L235E/G237Aを含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、EUナンバリングによる、アミノ酸置換A330S/P331Sを含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、アミノ酸置換L234A/L235E/G237A/A330S/P331Sを含む（Gross et al. (2001) Immunity 15:289）。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:757に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:758に記載の配列を含む。いくつかの態様では、本明細書において提供される構築物に使用されるFc領域は、C末端リジン残基をさらに欠くことができる。

【0472】

いくつかの態様では、本明細書において提供される免疫調節タンパク質構築物に使用されるバリエーションFcは、EUナンバリングによる、エフェクターレス変異L234A、L235E およびG237Aを含み得る。いくつかの態様では、野生型Fcは、1つまたは複数のシステイン残基の除去によって、例えば、EUナンバリングによる220位（C220S）のセリン残基へのシステイン残基の置換によって、さらに改変される。エフェクター機能が低下した例示的な不活性Fc領域は、SEQ ID NO:599およびSEQ ID NO:591に記載されており、それぞれSEQ ID NO:586またはSEQ ID NO:597に記載のアロタイプに基づく。いくつかの態様では、本明細書において提供される構築物に使用されるFc領域は、C末端リジン残基をさらに欠くことができる。いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S、L234A、L235EまたはG237Aのうちの1つまたは複数を含み、例えば、Fc領域は、SEQ ID NO:589、591、599または724に記載の配列を含む。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:589に記載の配列を有する。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:591に記載の配列を有する。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:599に記載の配列を有する。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:724に記載の配列を有する。

【0473】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:589に記載の配列を有するバリエーションFcである。

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:589)

【0474】

いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:824に記載の配列を有するバリエーションFcである。

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:824)

【0475】

いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S、L235P、L234V、L235A、G236delまたはS267Kのうちの1つまたは複数を含み、例えば、Fc領域はSEQ ID NO:722に記載の配列を含む。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く（EUナンバリングによるK447delに対応する）。

【0476】

いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S、R292C、N297G、V302Cのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID N

O:586に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く（EUナンバリングによるK447delに対応する）。免疫調節タンパク質構築物に使用するための例示的なバリエーションFc領域は、SEQ ID NO:723に記載されている。

【0477】

いくつかの態様では、バリエーションFc領域は、アミノ酸改変C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様では、Fc領域は、SEQ ID NO:586に記載の、野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く（EUナンバリングによるK447delに対応する）。免疫調節タンパク質構築物に使用するための例示的なバリエーションFc領域は、SEQ ID NO:725に記載されている。

【0478】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、第1の免疫調節Fc融合ポリペプチドと、第2の免疫調節Fc融合ポリペプチドとを含むホモ二量体であり、第1および第2のポリペプチドは同じである。いくつかの態様では、第1のFcポリペプチド融合体は、Fc領域と、1つまたは複数のBIMおよび/またはTIMとを含み、第2のポリペプチド融合体は、同じFc領域と、同じ1つまたは複数のBIMおよび/またはTIMとを含む。そのような態様では、Fc領域は、上記のいずれかであり得る。

【0479】

免疫調節ポリペプチドに含めるためのそのようなFc領域の例を表4に記載する。

【0480】

（表4）例示的なFc領域、野生型またはバリエーション（エフェクターレス）

Fc変異 (EUナンバリング)	356E/358M アロタイプ SEQ ID NO	356D/358L アロタイプ SEQ ID NO
(野生型)	586	597 (C220S, K447del を伴う)
C220S, R292C, N297G, V302C	598	
C220S, R292C, N297G, V302C, K447del	726	
C220S, L234A, L235E, G237A	599	591
C220S, L234A, L235E, G237A, K447del	724	589
L234A, L235E, G237A, K447del, ヒンジの欠失を伴う		824
C220S, L235P, L234V, L235A, G236del, S267K	722	
C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/K447del	725	
L234A, L235E, G237A, A330S, P331S		758
L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, ヒンジの欠失を伴う		757

【0481】

いくつかの態様では、少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）と、少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:586または597に記載の野生型IgG1と比較して低下したエフェクター活性を示すバリエーションFc領域と、を含む免疫調節タンパク質が、提供される。いくつかの態様では、バリエーションFcは、SEQ ID NO:591、598、599、722、589、723、724、725、757、758もしくは824のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:591、598、599、722、589、723、724、725、757、758もしくは824のい

ずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。例えば、少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）と、少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:589に記載のバリエーションFc領域と、を含む免疫調節タンパク質が、本明細書において提供される。態様では、提供される免疫調節タンパク質は、細胞から産生および発現される場合、2つの同一のポリペプチド鎖を含むホモ二量体である。

【0482】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、第1の免疫調節Fc融合ポリペプチドと、第2の免疫調節Fc融合ポリペプチドとを含み、第1および第2のポリペプチドは異なる。いくつかの態様では、第1のFcポリペプチド融合体は、Fc領域と、1つまたは複数のBIMおよび/またはTIMとを含み、第2のポリペプチド融合体は、Fc領域と、1つまたは複数のBIMおよび/またはTIMとを含む。そのような態様では、Fc領域は、ヘテロ二量体の形成を促進するかまたは容易にする領域であり得る。

【0483】

いくつかの態様では、第1および第2の免疫調節Fc融合ポリペプチドの一方または両方のFcドメインは、Fc分子の界面がヘテロ二量体化を容易にするおよび/または促進するように改変されるような改変（例えば置換）を含む。Fc鎖のヘテロ二量体化を促進する方法には、例えば、一連の「ノブ・イントゥ・ホール」変異を含めることによる、またはFcの静電的ステアリングを生じさせて異なるポリペプチド鎖間の引力相互作用を促進する変異を含むことによる、Fc領域の変異誘発が含まれる。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子のFc領域は、1つまたは複数の他のFc変異、例えば、上記のいずれかをさらに含み得る。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子は、エフェクター機能を低下させる変異を有するFc領域を含む。いくつかの態様では、そのようなFc領域は、EUナンバリングによる、変異C220S、L234A、L235Eおよび/またはG237Aを含む。いくつかの態様では、Fc骨格内の上記変異のいずれかは、EUナンバリングによる356および358位に残基Glu（E）およびMet（M）を含むアロタイプ内に作製され得る。他の態様では、Fc骨格内の上記変異のいずれかは、EUナンバリングによる356および358位に残基Asp（D）およびLeu（L）を含むアロタイプ内に作製され得る。

【0484】

いくつかの態様では、第1および第2のFc含有ポリペプチドの複合体化を促進するように突起部が空洞内に配置可能であるように、改変は、突起部（ノブ）を第1のFcポリペプチドに導入し、空洞（ホール）を第2のFcポリペプチドに導入することを含む。ポリペプチド内に突起部または空洞を作製するための置換および/または改変の標的となるアミノ酸は、典型的には、第2のポリペプチドの界面で1つまたは複数のアミノ酸と相互作用または接触する界面アミノ酸である。

【0485】

いくつかの態様では、突起部（ノブ）アミノ酸を含むように改変された第1のポリペプチドは、第1のポリペプチドの界面から突出し、したがって第2のポリペプチドの隣接する界面の補填的な空洞（ホール）に配置可能である少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸によって、天然または元のアミノ酸を置換することを含む。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基よりも大きな側鎖体積を有するものである。当業者であれば、アミノ酸残基の特性を決定および/または評価して、突起部を作製するための理想的な置換アミノ酸であるアミノ酸残基を同定する方法を知っている。いくつかの態様では、突起部を形成するための置換残基は、天然に存在するアミノ酸残基であり、これらには、例えば、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）またはトリプトファン（W）が含まれる。いくつかの例では、置換のために同定される元の残基は、小さい側鎖を有するアミノ酸残基、例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、トレオニンまたはバリンなどである。

【0486】

いくつかの態様では、空洞（ホール）を含むように改変された第2のポリペプチドは、第2のポリペプチドの界面から陥凹しており、したがって第1のポリペプチドの界面からの対応する突起部を収容することができる少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸によって、天然または元のアミノ酸を置換することを含むものである。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基よりも小さな側鎖体積を有するものである。当業者であれば、アミノ酸残基の特性を決定および/または評価して、空洞の形成のための理想的な置換残基であるアミノ酸残基を同定する方法を知っている。一般に、空洞を形成するための置換残基は、天然に存在するアミノ酸であり、これらには、例えば、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）およびバリン（V）が含まれる。いくつかの例では、置換のために同定される元のアミノ酸は、大きな側鎖を有するアミノ酸、例えば、チロシン、アルギニン、フェニルアラニンまたはトリプトファンなどである。

10

【0487】

例えば、ヒトIgG1のCH3界面は、各表面から1090 Å²埋没する4本の逆平行βストランド上に位置する各ドメイン上の16残基を含む（例えば、Deisenhofer et al. (1981) *Biochemistry*, 20:2361-2370; Miller et al., (1990) *J Mol. Biol.*, 216, 965-973; Ridgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621; 米国特許第5,731,168号を参照）。突起部または空洞を作製するためのCH3ドメインの改変は、例えば、米国特許第5,731,168号; 国際特許出願WO98/50431およびWO2005/063816; ならびにRidgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621に記載されている。いくつかの例では、突起部または空洞を作製するためのCH3ドメインの改変は、典型的には、2つの中心逆平行βストランド上に位置する残基を標的とする。目的は、作製された突起部が、パートナーCH3ドメイン内の補填的な空洞によって収容されるのではなく、周囲の溶媒中に突出することによって収容され得るリスクを最小限に抑えることである。

20

【0488】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子は、「ノブ鎖」のCH3ドメインにT366W変異を含み、「ホール鎖」のCH3ドメインにT366S、L368A、Y407V変異を含む。場合によっては、例えば、「ノブ」鎖または「ホール」鎖のCH3ドメインにY349C変異を導入し、他方の鎖のCH3ドメインにE356C変異またはS354C変異を導入することによって、CH3ドメイン間の追加の鎖間ジスルフィド架橋も使用することができる（Merchant, A.M., et al., *Nature Biotech.* 16 (1998) 677-681）。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインの一方にS354C、T366W変異を含み、2つのCH3ドメインの他方にY349C、T366S、L368A、Y407V変異を含む。例えば、ノブFcは、S354CおよびT366Wを含む、SEQ ID NO:669に記載の配列を含み得、ホールFcは、変異Y349C、T366S、L368AおよびY407Vを含む、SEQ ID NO:670に記載の配列を含み得る。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインの一方にE356C、T366W変異を含み、2つのCH3ドメインの他方にY349C、T366S、L368A、Y407V変異を含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインの一方にY349C、T366W変異を含み、2つのCH3ドメインの他方にE356C、T366S、L368A、Y407V変異を含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子は、2つのCH3ドメインの一方にY349C、T366W変異を含み、2つのCH3ドメインの他方にS354C、T366S、L368A、Y407V変異を含む。他のノブ・イン・ホール技術の例は、例えば、EP 1870459A1に記載されているように、当技術分野において公知である。

30

40

【0489】

いくつかの態様では、CH3突起部（ノブ）または空洞（ホール）改変を含むFcバリエーションは、例えば、融合ポリペプチドを形成するために、マルチドメイン免疫調節ポリペプチドに、場所を問わないが典型的にはそのN末端またはC末端を介して、1つまたは複数のBIMまたはTIMのN末端またはC末端に連結され得る。連結は、直接的、またはリンカーを介して間接的であり得る。典型的には、ノブおよびホール分子は、CH3突起部改変を含むFcバリエーションに連結された第1のスタック免疫調節ポリペプチドと、CH3空洞改変を含むFcバリエーションに連結された第2のスタック免疫調節ポリペプチドとの共発現によ

50

って生成される。

【0490】

ノブおよびホールFcポリペプチドの例示的な配列は、それぞれSEQ ID NO:716および717に記載されている。いくつかの態様では、ノブまたはホールFc領域は、SEQ ID NO:586に記載の野生型Fcまたは非改変Fcの232位に対応するC末端リジンを欠く（EUナンバリングによるK447delに対応する）。ノブおよびホールFcポリペプチドの例示的な配列は、それぞれSEQ ID NO:669および670に記載されている。

【0491】

いくつかの態様では、少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）および/または少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:716に記載の第1のバリエーションFcと、を含む、第1のポリペプチドと；少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）および/または少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:717に記載の第2のバリエーションFcと、を含む、第2のポリペプチドと、を含む、免疫調節タンパク質が提供される。いくつかの態様では、少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）および/または少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:669に記載の第1のバリエーションFcと、を含む、第1のポリペプチドと；少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）および/または少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:670に記載の第2のバリエーションFcと、を含む、第2のポリペプチドと、を含む、免疫調節タンパク質が提供される。態様では、提供される免疫調節タンパク質は、細胞から産生および発現される場合、2つの異なるポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体である。例えば、ポリペプチドの1つはTIMを発現することができ、ポリペプチドの1つはBIMを発現することができる。

【0492】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体の各ポリペプチドのFc領域は、静電的に適合したFc鎖の共発現が好ましい引力相互作用を補助し、それによって、所望のFcヘテロ二量体形成を促進するのに対して、好ましくない反発性電荷相互作用が望ましくないFcホモ二量体形成を抑制するように、Fc二量体界面を横切る変化した電荷極性への変異を含む（Guneskaran et al. (2010) JBC, 285:19637-19646）。いくつかの態様では、BIMおよび/またはTIMを含む少なくとも1つのポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO:729に記載の正に荷電した残基（例えば、EUナンバリングによるE356K、E357Kおよび/またはD399K;記載される指定されたK鎖）への変異を含むFcに、直接的または間接的に連結される。そのような態様では、BIMおよび/またはTIMを含むヘテロ二量体の他方のポリペプチドは、例えば、SEQ ID NO:730に記載の負に荷電した残基（例えば、EUナンバリングによるK370D、K392DおよびK409D;指定されたD鎖）への変異を含むFcに、直接的または間接的に連結される。細胞内で共発現される場合、K鎖とD鎖との間の会合が可能であるが、該鎖は、電荷反発のために実質的に自己会合しない。

【0493】

いくつかの態様では、少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）および/または少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:729に記載の第1のバリエーションFcと、を含む、第1のポリペプチドと；少なくとも1つのBIM（例えば、セクションIII.Aに記載されている）および/または少なくとも1つのTIM（例えば、セクションIII.Bに記載されているいずれか）と、SEQ ID NO:730に記載の第2のバリエーションFcと、を含む、第2のポリペプチドと、を含む、免疫調節タンパク質が提供される。態様では、提供される免疫調節タンパク質は、細胞から産生および発現される場合、2つの異なるポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体である。例えば、ポリペプチドの1つはTIMを発現することができ、ポリペプチドの1つはBIMを発現することができる。

【0494】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、マルチドメインポリペプチドの個々のポリペプチド、または単一ドメインポリペプチドの個々のポリペプチドは、三量体、四量体または五量体である免疫調節タンパク質を形成する多量体化ドメインに連結される。いくつかの態様では、そのような分子の個々のポリペプチドは同じである。いくつかの態様では、そのような多量体化ドメインは、軟骨オリゴマー基質タンパク質 (COMP) 集合ドメイン、血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質 (VASP) 四量体化ドメインまたはZymoZipper (ZZ) 12.6ドメインである。

【0495】

いくつかの態様では、多量体化ドメインは、軟骨オリゴマー基質タンパク質 (COMP) 集合ドメインの一部である (Voulgaraki et al., Immunology (2005) 115 (3) :337-346。いくつかの例では、COMPは、SEQ ID NO:734に記載のアミノ酸配列 (例えば、完全長COMPのアミノ酸29~72、Uniprotアクセス番号P49747)、もしくはSEQ ID NO:734に対して85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を有する配列であるか、またはそれを含む。

10

【0496】

いくつかの態様では、多量体化ドメインは、血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質 (VASP) 四量体化ドメインである (Bachmann et al., J Biol Chem (1999) 274 (33) :23549-23557)。いくつかの態様では、VASPは、SEQ ID NO:735に記載のアミノ酸配列 (例えば、完全長VASPのアミノ酸343~375; Uniprotアクセス番号P50552)、もしくはSEQ ID NO:735に対して85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を有する配列であるか、またはそれを含む。

20

【0497】

いくつかの態様では、多量体化ドメインは、ZymoZipper (ZZ) 12.6ドメインである。いくつかの態様では、ZZドメインは、SEQ ID NO:736に記載のアミノ酸配列 (米国特許第7,655,439号を参照)、もしくはSEQ ID NO:736に対して85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を有する配列であるか、またはそれを含む。

30

【0498】

いくつかの構成では、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第1および第2のポリペプチドは、検出および/または精製のための部分に連結され得る。いくつかの局面では、第1および第2のポリペプチドは、異なるタグまたは部分に連結される。いくつかの局面では、第1および第2のポリペプチドのタグまたは部分は、ポリ-ヒスチジンタグ (HHHHHH; SEQ ID NO:702)、フラグタグ (DYKDDDDK; SEQ ID NO:588)、Mycタグ、または蛍光タンパク質タグ (例えば、SEQ ID NO:731、732または733に記載のEGFP) から独立して選択される。いくつかの例では、BIMを含む第1のポリペプチドと、TIMを含む第2のポリペプチドとは、それぞれ、検出および/または精製のための部分、例えば、ポリ-ヒスチジンタグ (HHHHHH; SEQ ID NO:702) および/またはフラグタグ (DYKDDDDK; SEQ ID NO:588) をさらに含む。

40

【0499】

いくつかの態様では、BIMおよび/またはTIMは、Fc配列に直接的に連結される。いくつかの態様では、BIMおよび/またはTIMは、例えば、リンカーを介してFc配列に間接的に連結される。いくつかの態様では、1つまたは複数の「ペプチドリンカー」は、BIMおよび/またはTIMとFcドメインとを連結する。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、単一のアミノ酸残基またはそれ以上の長さであり得る。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、少なくとも1個のアミノ酸残基を有するが、長さが20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下のアミノ酸残基である。例示的なリンカーは、サブセクション「リンカー」に記載されている。

【0500】

50

いくつかの態様では、リンカーは、(1文字アミノ酸コードで):GGGGS(「4GS」;SEQ ID NO:593)、または4GSリンカーの多量体、例えば、2、3、4もしくは5個の4GSリンカーのリピートである。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、(GGGGS)₂(SEQ ID NO:594)、(GGGGS)₃(SEQ ID NO:595)、(GGGGS)₄(SEQ ID NO:600)、または(GGGGS)₅(SEQ ID NO:671)である。いくつかの態様では、リンカーはまた、単独で、または別のペプチドリンカー(4GSリンカーまたはその多量体など)に加えて、一連のアラニン残基を含むことができる。いくつかの態様では、リンカー(1文字アミノ酸コードで)は、GSGGGGS(SEQ ID NO:590)またはGGGGSSA(SEQ ID NO:596)である。いくつかの例では、リンカーは、2xGGGGS、続いて3つのアラニンである(GGGGSGGGGSAAA;SEQ ID NO:721)。

10

【0501】

免疫調節タンパク質をコードする核酸分子も提供される。いくつかの態様では、免疫調節タンパク質の産生のために、免疫調節タンパク質をコードする核酸分子が、適切な発現ベクターに挿入される。得られた免疫調節タンパク質は、Fc部分間に形成された鎖間ジスルフィド結合によってFcドメイン間の構築が起こり、二量体、例えば二価の免疫調節タンパク質を生じる前記発現によって形質転換された宿主細胞において発現され得る。

【0502】

BIM、TIMおよびFcを含む、得られた免疫調節タンパク質は、プロテインAまたはプロテインGカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって容易に精製され得る。ヘテロ二量体の生成では、精製のための追加の工程が必要であり得る。例えば、異なる免疫調節タンパク質をコードする2つの核酸で細胞を形質転換する場合、Fcドメインを有する免疫調節タンパク質もジスルフィド結合ホモ二量体として発現されるため、ヘテロ二量体の形成は生化学的に達成されなければならない。したがって、ホモ二量体は、鎖間ジスルフィドの破壊に有利な条件下で還元され得るが、鎖内ジスルフィドには影響を及ぼさない。場合によっては、異なる免疫調節タンパク質単量体を等モル量で混合し、酸化させてホモ二量体およびヘテロ二量体の混合物を形成する。この混合物の成分をクロマトグラフィー技術によって分離する。あるいは、下記のノブ・イントゥ・ホール法を使用して、1つまたは複数のBIMおよび/またはTIMを含むFc融合分子を含む免疫調節タンパク質を遺伝子操作し発現させることによって、このタイプのヘテロ二量体の形成を偏らせることができる。

20

30

【0503】

3. タグまたは部分

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質内にBIMおよび/またはTIMを含む1つまたは複数のポリペプチドは、タグまたは部分をさらに含むことができる。いくつかの態様では、さらなる部分は、タンパク質、ペプチド、小分子または核酸である。場合によっては、免疫調節タンパク質は、複数のさらなる部分、例えば、2、3、4、5または6個のさらなる部分に、直接的または間接的に連結される。

【0504】

いくつかの態様では、部分は、半減期延長分子である。そのような半減期延長分子の例には、限定されることなく、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、Pro/Ala/Ser(PAS)、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータサブユニットのC末端ペプチド(CTP)、ポリエチレングリコール(PEG)、アミノ酸の長い非構造化親水性配列(XTEN)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、アルブミン結合小分子、またはそれらの組合せが挙げられる。

40

【0505】

いくつかの態様では、BIMおよび/またはTIMを含む免疫調節ポリペプチドは、アミノ酸Pro、AlaおよびSerから構成される立体構造的に無秩序なポリペプチド配列を含むことができる(例えば、国際公開公報第2008/155134号、SEQ ID NO:904を参照)。場合によっては、アミノ酸リピートは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28

50

、29、30個またはそれ以上のアミノ酸残基であり、各リピートは、Ala残基、Ser残基およびPro残基を含む。したがって、BIMおよび/またはTIMが直接的に、またはリンカーを介して間接的にPro/Ala/Ser (PAS) に連結されているPAS化 (PASylated) タンパク質である免疫調節タンパク質が、本明細書において提供される。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加のリンカー構造が使用され得る。

【0506】

いくつかの態様では、部分は、免疫調節タンパク質の検出または精製を容易にする。場合によっては、免疫調節タンパク質、例えば、その多量体（例えば、二量体、三量体、四量体または五量体）の少なくとも1つまたは各ポリペプチドは、連結されたタグまたは部分、例えば、親和性タグまたは精製タグを含む。いくつかの局面では、そのようなタグまたは部分は、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、ポリペプチドのN末端および/またはC末端に連結され得る。様々な好適なポリペプチドタグおよび/または融合ドメインが公知であり、これらには、限定されることなく、ポリ-ヒスチジン (His) タグ (SEQ ID NO:702)、FLAGタグ (SEQ ID NO:588)、Mycタグ、および蛍光タンパク質タグ（例えば、SEQ ID NO:734、735または736に記載のEGFPが含まれる。場合によっては、タグは、少なくとも6個のヒスチジン残基 (SEQ ID NO:702に記載) を含むHisタグである。

【0507】

場合によっては、BIMおよびTIMを含む免疫調節タンパク質は、部分の様々な組合せをさらに含む。例えば、BIMまたはTIMを含む免疫調節タンパク質は、1つまたは複数のポリヒスチジンタグおよびFLAGタグをさらに含む。場合によっては、部分の組合せ、例えば、2つ以上の部分は、同じポリペプチド上に含められ得る。場合によっては、部分の組合せ、例えば、2つ以上の部分は、例えば、ヘテロ二量体免疫調節ポリペプチドに関する態様に関連して、異なるポリペプチドに含められ得る。

【0508】

IV. 核酸、ベクター、およびポリペプチドまたは細胞を産生する方法

本明細書において提供される免疫調節タンパク質のいずれかをコードする、集合的に「核酸」と呼ばれる単離された核酸または組換え核酸が本明細書において提供される。いくつかの態様では、以下に記載される全てを含め、本明細書において提供される核酸は、本明細書において提供される免疫調節タンパク質の組換え産生（例えば発現）に有用である。いくつかの態様では、以下に記載される全てを含め、本明細書において提供される核酸は、本明細書において提供される免疫調節タンパク質、例えば、本明細書において提供されるBCMA融合タンパク質またはマルチドメイン免疫調節タンパク質の発現に有用である。本明細書において提供される核酸は、RNAの形態またはDNAの形態であり得、mRNA、cRNA、組換えRNAまたは合成RNA、および組換えDNAまたは合成DNA、ならびにcDNAを含む。本明細書において提供される核酸は、典型的にはDNA分子、通常二本鎖DNA分子である。ただし、本発明のヌクレオチド配列のいずれかを含む一本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、およびハイブリッドDNA/RNA核酸、またはそれらの組合せも提供される。

【0509】

場合によっては、免疫調節タンパク質をコードする核酸に、異種（非天然）シグナルペプチドを加えることができる。これは、例えば、アミノ末端シグナル配列を含まないBCMA融合タンパク質または提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の発現の場合に所望され得る。いくつかの態様では、シグナルペプチドは、免疫グロブリン (IgG重鎖またはIgG-カップ軽鎖など)、サイトカイン（例えば、インターロイキン-2 (IL-2) またはCD33）、血清アルブミンタンパク質（例えば、HSAまたはアルブミン）、ヒトアズロシジンプレタンパク質シグナル配列、ルシフェラーゼ、トリプシノゲン（例えば、キモトリプシノゲンまたはトリプシノゲン）、または細胞からタンパク質を効率的に発現させ、いくつかの局面では、細胞からタンパク質を分泌することができる他のシグナルペプチドに由来するシグナルペプチドである。例示的なシグナルペプチドには、表5に記載のいず

れかが含まれる。

【0510】

(表5) 例示的なシグナルペプチド

SEQ ID NO	シグナルペプチド	ペプチド配列
SEQ ID NO: 737	HSAシグナルペプチド	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 738	Ig カッパ軽鎖	MDMRAPAGIFGFLLVLPFGYRS
SEQ ID NO: 739	ヒトアズロシジンプレタンパク質 シグナル配列	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO: 740	IgG 重鎖シグナルペプチド	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO: 741	IgG 重鎖シグナルペプチド	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO: 742	IgG 重鎖シグナルペプチド	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 743	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 744	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDWTWRFLFVVAATGVQS
SEQ ID NO: 745	IgG 重鎖シグナルペプチド	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO: 746	IgG 重鎖シグナルペプチド	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO: 747	IgG 重鎖シグナルペプチド	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 748	IgG カッパ軽鎖 シグナル配列：	MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC
SEQ ID NO: 749	IgG カッパ軽鎖 シグナル配列：	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA
SEQ ID NO: 750	ガウシア(Gaussia) ルシフェラーゼ	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO: 751	ヒトアルブミン	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 752	ヒトキモトリプシノゲン	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO: 753	ヒトインターロイキン-2	MQLLSIALILALV
SEQ ID NO: 754	ヒトトリプシノゲン-2	MNLLLILTFVAAAVA

10

20

【0511】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質は、発現された際にシグナルペプチドを含み、シグナルペプチド（またはその一部）は、分泌時に免疫調節タンパク質から切断される。

30

【0512】

免疫調節タンパク質、例えば、本明細書において提供されるBCMA融合タンパク質またはマルチドメイン免疫調節タンパク質の産生に有用な組換え発現ベクターおよび組換え宿主細胞も本明細書において提供される。

【0513】

上記で提供された態様のいずれかでは、本明細書において提供される免疫調節ポリペプチドをコードする核酸は、組換えDNAおよびクローニング技術を使用して細胞に導入され得る。そのために、免疫調節ポリペプチドをコードする組換えDNA分子が調製される。そのようなDNA分子を調製する方法は、当技術分野において周知である。例えば、ペプチドをコードする配列は、好適な制限酵素を使用してDNAから切除され得る。あるいは、DNA分子は、ホスホラミダイト法などの化学合成技術を使用して合成され得る。また、これらの技術の組合せを使用することもできる。いくつかの例では、組換え核酸または合成核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生成され得る。免疫調節タンパク質をコードするDNAインサートは、当業者に知られているように、適切な形質導入/トランスフェクションベクターにクローニングされ得る。核酸分子を含む発現ベクターも提供される。

40

【0514】

いくつかの態様では、発現ベクターは、タンパク質の発現に適した条件下で適切な細胞内で免疫調節タンパク質を発現させることができる。いくつかの局面では、核酸分子または発現ベクターは、適切な発現制御配列に機能的に連結された免疫調節タンパク質をコー

50

ドするDNA分子を含む。DNA分子がベクターに挿入される前または後のいずれかに、この機能的連結を行う方法は周知である。発現制御配列には、プロモーター、活性化因子、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル、および転写または翻訳の制御に関与する他のシグナルが含まれる。

【0515】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質の発現は、発現を制御または調節するためにプロモーターまたはエンハンサーによって制御される。プロモーターは、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質をコードする核酸分子の一部に機能的に連結される。

【0516】

DNA分子をその上に有する得られた組換え発現ベクターは、適切な宿主を形質転換するために使用される。この形質転換は、当技術分野において周知の方法を使用して行われ得る。いくつかの態様では、本明細書において提供される核酸は、得られた可溶性免疫調節ポリペプチドが培養培地、宿主細胞または宿主細胞ペリプラズムから回収されるように、免疫調節ポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結された分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。他の態様では、適切な発現制御シグナルが、免疫調節ポリペプチドの膜発現を可能にするように選択される。さらに、市販のキットおよび受託製造会社を利用して、本明細書において提供される操作された細胞または組換え宿主細胞を作製することもできる。

【0517】

いくつかの態様では、DNA分子をその上に有する得られた発現ベクターは、適切な細胞を形質転換する、例えば形質導入するために使用される。導入は、当技術分野において周知の方法を使用して行われ得る。例示的な方法には、ウイルス、例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルス、形質導入、トランスポゾン、およびエレクトロポレーションを介することを含む、受容体をコードする核酸の移入のための方法が含まれる。いくつかの態様では、発現ベクターはウイルスベクターである。いくつかの態様では、核酸は、レンチウイルス形質導入法またはレトロウイルス形質導入法によって細胞に移入される。

【0518】

ポリペプチドまたは操作された細胞の調製では、哺乳動物T細胞またはAPCを含む多数の公的に入手可能な周知の哺乳動物宿主細胞のいずれかを使用することができる。細胞の選択は、当技術分野において認識されている多数の要因に依存する。これらには、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、DNA分子によってコードされるペプチドの毒性、形質転換率、ペプチドの回収の容易さ、発現特性、生物学的安全性、およびコストが含まれる。これらの要因のバランスは、あらゆる細胞が特定のDNA配列の発現に等しく有効であり得るわけではないという理解をもって取り決められなければならない。

【0519】

いくつかの態様では、宿主細胞は哺乳動物細胞である。好適な哺乳動物宿主細胞の例には、アフリカミドリザル腎臓細胞 (Vero; ATCC CRL 1587)、ヒト胎児由来腎臓細胞 (293-HEK; ATCC CRL 1573)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK-21、BHK-570; ATCC CRL 8544、ATCC CRL 10314)、イヌ腎臓細胞 (MDCK; ATCC CCL 34)、チャイニーズハムスター卵巢細胞 (CHO-K1; ATCC CCL 61; CHO DG44 (Chasin et al, Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986))、ラット下垂体細胞 (GH1; ATCC CCL 82)、HeLa S3細胞 (ATCC CCL 2.2)、ラット肝がん細胞 (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) SV40形質転換サル腎臓細胞 (COS-1; ATCC CRL 1650) およびマウス胚細胞 (NIH-3T3; ATCC CRL 1658) が挙げられる。

【0520】

いくつかの態様では、宿主細胞は、様々な真核細胞 (例えば、酵母細胞において) であり得るか、またはチャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞もしくはHEK293細胞などの哺乳動物細胞によるものであり得る。いくつかの態様では、宿主細胞は懸濁細胞であり、ポリペプチドは、培養懸濁液中、例えば、培養懸濁CHO細胞、例えばCHO-S細胞内で

10

20

30

40

50

操作または産生される。いくつかの例では、細胞株は、DG44およびDUXB11などのDHFRが欠損している (DHFR-) CHO細胞株である。いくつかの態様では、細胞は、グルタミンシンターゼ (GS) が欠損している、例えば、CHO-S細胞、CHOK1 SV細胞およびCHOZN (R) GS-/-細胞である。いくつかの態様では、懸濁CHO細胞などのCHO細胞は、CHO-S-2H2細胞、CHO-S-クローン14細胞またはExpiCHO-S細胞であり得る。

【0521】

いくつかの態様では、宿主細胞は、原核細胞 (例えば、大腸菌を用いる) であってもよい。形質転換された組換え宿主は、可溶性タンパク質を得るために、ポリペプチド発現条件下で培養され、次いで、精製される。組換え宿主細胞は、所望のポリペプチドが発現されるように従来の発酵条件下で培養され得る。そのような発酵条件は、当技術分野において周知である。最後に、本明細書において提供されるポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィーを含む、当技術分野において周知の多数の方法のいずれかによって組換え細胞培養物から回収および精製され得る。所望であれば、成熟タンパク質の構成を完了する際に、タンパク質リフォールディング工程を使用することができる。最後に、最終精製工程では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用することができる。

【0522】

いくつかの態様では、組換えベクターはウイルスベクターである。例示的な組換えウイルスベクターには、レンチウイルスベクターゲノム、ポックスウイルスベクターゲノム、ワクシニアウイルスベクターゲノム、アデノウイルスベクターゲノム、アデノウイルス関連ウイルスベクターゲノム、ヘルペスウイルスベクターゲノムおよびアルファウイルスベクターゲノムが含まれる。ウイルスベクターは、生きている、弱毒化されている、複製条件付きもしくは複製欠損、非病原性 (欠損)、複製コンピテントウイルスベクターであり得、および/または異種遺伝子産物、例えば、本明細書において提供されるバリエーション免疫調節ポリペプチドを発現するように改変される。ウイルスを生成するためのベクターはまた、転写負荷または翻訳負荷を増加または減少させる任意の方法を含む、ウイルスの弱毒化を変化させるように改変され得る。

【0523】

使用され得る例示的なウイルスベクターには、改変ワクシニアウイルスベクター (例えば、Guerra et al., J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8:1445-47 (1992); Gheradi et al., J. Gen. Virol. 86:2925-36 (2005); Mayr et al., Infection 3:6-14 (1975); Hu et al., J. Virol. 75:10300-308 (2001); 米国特許第5,698,530号、米国特許第6,998,252号、米国特許第5,443,964号、米国特許第7,247,615号および米国特許第7,368,116号を参照); アデノウイルスベクターもしくはアデノウイルス関連ウイルスベクター (例えば、Molin et al., J. Virol. 72:8358-61 (1998); Narumi et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19:936-41 (1998); Mercier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6188-93 (2004); 米国特許第6,143,290号; 米国特許第6,596,535号; 米国特許第6,855,317号; 米国特許第6,936,257号; 米国特許第7,125,717号; 米国特許第7,378,087号; 米国特許第7,550,296号を参照); マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、エコトロピックレトロウイルス、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) および組合せに基づくものを含むレトロウイルスベクター (例えば、Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-39 (1992); Johann et al., J. Virol. 66:1635-40 (1992); Sommerfelt et al., Virology 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-78 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-24 (1991); Miller et al., Mol. Cell Biol. 10:4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4:43 1992; Cornetta et al., Hum. Gene Ther. 2:215 (1991) を参照); ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1)、HIV-2、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス、サル免疫不全ウイルス (SIV) およびマエディ・ビスナウイルスに基づく

ものを含むレンチウイルスベクター（例えば、Pfeifer et al., *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211 (2001); Zufferey et al., *J. Virol.* 72:9873, 1998; Miyoshi et al., *J. Virol.* 72:8150, 1998; Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman et al., *J. Virol.* 69:2729, 1995; Nightingale et al., *Mol. Therapy*, 13:1121, 2006; Brown et al., *J. Virol.* 73:9011 (1999); 国際公開公報第2009/076524号; 国際公開公報第2012/141984号; 国際公開公報第2016/011083号; McWilliams et al., *J. Virol.* 77:11150, 2003; Powell et al., *J. Virol.* 70:5288, 1996を参照)、もしくはその任意のバリエーション、ならびに/または上記のウイルスのいずれかを生成するために使用され得るベクターが含まれる。いくつかの態様では、組換えベクターは、例えば、RNAウイルスの場合、パッケージング細胞株内でウイルスゲノムの発現を調節することができる調節配列、例えば、プロモーター配列またはエンハンサー配列を含むことができる（例えば、米国特許第5,385,839号および米国特許第5,168,062号を参照）。

10

【0524】

いくつかの局面では、核酸または発現ベクターは、適切な発現制御配列に機能的に連結された免疫調節タンパク質をコードする核酸配列を含む。免疫調節タンパク質をコードする核酸配列がベクターに挿入される前または後のいずれかに、この機能的連結を行う方法は周知である。発現制御配列には、プロモーター、活性化因子、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリ阿德ニル化シグナル、および転写または翻訳の制御に関する他のシグナルが含まれる。プロモーターは、免疫調節タンパク質をコードする核酸配列の一部に機能的に連結され得る。

20

【0525】

転写調節配列は、RNA合成の開始を指示するのに十分なプロモーター領域を含む。好適な真核生物プロモーターには、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター (Hammer et al., *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273 (1982))、ヘルペスウイルスのTKプロモーター (McKnight, *Cell* 31:355 (1982))、SV40初期プロモーター (Benoist et al., *Nature* 290:304 (1981))、ラウス肉腫ウイルスプロモーター (Gorman et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 79:6777 (1982))、サイトメガロウイルスプロモーター (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1980))、およびマウス乳がんウイルスプロモーターが含まれる（一般に、Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), pages 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)を参照）。プロモーターおよびエンハンサーの1つの有用な組合せは、骨髄増殖性肉腫ウイルスプロモーターおよびヒトサイトメガロウイルスエンハンサーによって提供される。

30

【0526】

あるいは、原核生物プロモーターが真核生物プロモーターによって調節される場合、原核生物プロモーター、例えば、バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターを使用して、哺乳動物細胞内の免疫調節タンパク質の産生を制御することができる (Zhou et al., *Mol. Cell. Biol.* 10:4529 (1990)、およびKaufman et al., *Nucl. Acids Res.* 19:4485 (1991))。

40

【0527】

発現ベクターは、リン酸カルシウムトランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、マイクロプロジェクトイル媒介送達、エレクトロポレーションなどを含む様々な標準的な技術を使用して宿主細胞に導入され得る。トランスフェクトされた細胞を選択し、増殖させて、宿主細胞ゲノムに安定に組み込まれた発現ベクターを含む組換え宿主細胞を提供することができる。真核細胞にベクターを導入するための技術、および優性の選択可能なマーカーを使用してそのような安定な形質転換体を選択するための技術は、例えば、Ausubel (1995) およびMurray (ed.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991) によって記載されている。

【0528】

50

例えば、1つの好適な選択可能なマーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性をもたらす遺伝子である。この場合、例えばG-418などのネオマイシン型薬物の存在下で選択が行われる。選択系を使用して、関心対象の遺伝子の発現レベルを増加させることもでき、このプロセスは「増幅」と呼ばれる。増幅は、低レベルの選択剤の存在下でトランスフェクタントを培養し、次いで、導入された遺伝子の高レベルの産物を産生する細胞を選択するために選択剤の量を増加させることによって行われる。好適な増幅可能な選択可能なマーカーは、メトトレキサートに対する耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼである。他の薬物耐性遺伝子（例えば、ハイグロマイシン耐性、多剤耐性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）も使用することができる。あるいは、変化した表現型を導入するマーカー、例えば緑色蛍光タンパク質、またはCD4、CD8、クラスI MHC、胎盤アルカリホスファターゼなどの細胞表面タンパク質を使用して、FACS選別または磁気ビーズ分離技術などの手段によって、トランスフェクトされた細胞をトランスフェクトされていない細胞から選別してもよい。

10

【0529】

いくつかの態様では、本明細書において提供されるポリペプチドは、合成方法によっても作製され得る。固相合成は、小さなペプチドを作製する最も費用効果の高い方法であるため、個々のペプチドを作製する好ましい技術である。例えば、周知の固相合成技術には、保護基、リンカーおよび固相支持体の使用、ならびに特異的な保護反応条件および脱保護反応条件、リンカー開裂条件、スカベンジャーの使用、および固相ペプチド合成の他の局面が含まれる。次いで、ペプチドを本明細書において提供されるポリペプチドに組み立てることができる。

20

【0530】

V. 薬学的組成物

本明細書において記載される提供される免疫調節タンパク質のいずれかを含有する組成物が本明細書において提供される。薬学的組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含むことができる。例えば、薬学的組成物は、例えば、組成物のpH、モル浸透圧濃度、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解速度もしくは放出速度、吸着または浸透を改変、維持または保存するための1つまたは複数の賦形剤を含有することができる。そのような組成物は、緩衝液、例えば、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水など；炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、

30

【0531】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、粉末、カプセルまたは錠剤などの固体である。例えば、薬学的組成物の成分は、凍結乾燥され得る。いくつかの態様では、固体薬学的組成物は、投与前に液体に再構成または溶解される。

【0532】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、液体、例えば、水溶液（生理食塩水またはリンガー液など）に溶解した免疫調節タンパク質である。いくつかの態様では、薬学的組成物のpHは、約4.0～約8.5（約4.0～約5.0、約4.5～約5.5、約5.0～約6.0、約5.5～約6.5、約6.0～約7.0、約6.5～約7.5、約7.0～約8.0、または約7.5～約8.5など）である。

40

【0533】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、充填剤、結合剤、コーティング、保存剤、潤滑剤、香味剤、甘味剤、着色剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤または安定剤を含む。薬学的に許容される充填剤の例には、セルロース、第二リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルトール、アルファ化デンプン、コーンスターチまたはジャガイモデンプンが挙げられる。薬学的に許容される結合剤の例には、ポリビニ

50

ルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロースまたはセルロースが挙げられる。薬学的に許容されるコーティングの例には、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼインまたはゼラチンが挙げられる。薬学的に許容される崩壊剤の例には、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースまたはデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられる。薬学的に許容される潤滑剤の例には、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸が挙げられる。薬学的に許容される保存剤の例には、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸またはソルビン酸が挙げられる。薬学的に許容される甘味剤の例には、スクロース、サッカリン、アスパルテームまたはソルビトールが挙げられる。薬学的に許容される緩衝剤の例には、カーボネート、シトレート、グルコネート、アセテート、ホスフェートまたはタータレートが挙げられる。

10

【0534】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、生成物の制御放出または持続放出のための作用物質、例えば、注射可能なミクロスフェア、生体侵食性粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソームをさらに含む。

【0535】

いくつかの態様では、薬学的組成物は無菌である。滅菌は、滅菌濾過膜による濾過、または放射線によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用した滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに行われ得る。非経口投与用組成物は、凍結乾燥形態または溶液中で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルに入れられる。

20

【0536】

薬学的に許容される担体は、薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクルであり得る。例えば、担体は、液体充填剤もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒もしくは封入材料、またはそれらの何らかの組合せであり得る。担体の各成分は、製剤の他の成分と適合性でなければならないという点で「薬学的に許容される」ものでなければならない。それはまた、それが遭遇し得る任意の組織、器官、または身体の一部との接触に適していなければならない、これは、その治療上の利益を過度に上回る毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性または任意の他の合併症のリスクを有してはならないことを意味する。

30

【0537】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、対象に投与される。一般に、薬学的組成物の投与量および投与経路は、標準的な薬学的慣行に従って、対象のサイズおよび状態に従って決定される。例えば、治療有効用量は、細胞培養アッセイで、またはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタもしくはサルなどの動物モデルのいずれかを対象として最初に推定され得る。動物モデルを使用して、適切な濃度範囲および投与経路を決定してもよい。次いで、そのような情報を使用して、ヒトへの投与に有用な用量および経路を決定することができる。正確な投与量は、処置を必要とする対象に関連する要因を考慮して決定される。投与量および投与は、十分なレベルの活性化化合物を提供するために、または所望の効果を維持するために調整される。考慮され得る要因には、疾患状態の重症度、対象の一般的な健康状態、対象の年齢、体重および性別、投与の時間および頻度、薬物の組合せ、反応感受性、ならびに治療に対する応答が含まれる。

40

【0538】

長時間作用型薬学的組成物は、特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて、3～4日ごと、毎週、または2週間に1回投与され得る。投与頻度は、使用される製剤中の分子の薬物動態パラメータに依存する。典型的には、組成物は、所望の効果を達成する投与量に達するまで投与される。したがって、組成物は、単回用量として、または複数回用量として（同じまたは異なる濃度/投与量で）経時的に、または連続注入として投与され得る。適切な投与量のさらなる改良は、常用的に行われる。適切な投与量は、適切な用量

50

反応データの使用によって確認され得る。

【0539】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、経口的に、経皮的に、吸入により、静脈内に、動脈内に、筋肉内に、創傷部位への直接適用、手術部位への適用、腹腔内に、坐剤により、皮下に、皮内に、経皮的に、噴霧により、胸膜内に、脳室内に、関節内に、眼内に、または脊髄内に、を含む任意の経路を介して対象に投与される。

【0540】

提供される薬学的製剤は、例えば、静脈内注入に適した形態であり得る。

【0541】

いくつかの態様では、薬学的組成物の投与量は、単回用量または反復用量である。いくつかの態様では、用量は、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回以上対象に投与される。いくつかの態様では、約1回以上（約2回以上、約3回以上、約4回以上、約5回以上、約6回以上、または約7回以上など）の用量が1週間に投与される。いくつかの態様では、複数回用量が、数日、数週間、数ヶ月または数年にわたって投与される。いくつかの態様では、一連の処置は、約1回以上の用量（約2回以上の用量、約3回以上の用量、約4回以上の用量、約5回以上の用量、約7回以上の用量、約10回以上の用量、約15回以上の用量、約25回以上の用量、約40回以上の用量、約50回以上の用量、または約100回以上の用量など）である。

【0542】

いくつかの態様では、薬学的組成物の投与用量は、対象の体重1kg当たり約1μg以上のタンパク質（対象の体重1kg当たり約2μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約5μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約10μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約25μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約50μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約100μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり250μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約500μg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約1mg以上のタンパク質、対象の体重1kg当たり約2mg以上のタンパク質、または対象の体重1kg当たり約5mg以上のタンパク質など）である。

【0543】

VI. 免疫調節タンパク質の活性および免疫調節を評価する方法

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質、例えば、本明細書において提供されるBCMA融合タンパク質またはマルチドメイン免疫調節タンパク質は、免疫調節活性を示す。提供される免疫調節タンパク質、例えば、BCMA融合タンパク質またはマルチドメイン免疫調節タンパク質は、B細胞活性、例えば、B細胞の増殖、分化または生存のうちの1つまたは複数を調節することができる。場合によっては、提供される免疫調節タンパク質、例えばマルチドメイン免疫調節タンパク質は、T細胞の活性化または応答をさらに調節し得る。いくつかの態様では、T細胞の活性化または応答は、低下、減少または減弱する。

【0544】

免疫調節タンパク質の機能は、同族結合パートナーに結合するタンパク質の能力を評価するための様々な手法を使用して検査され得る。例えば、BCMA融合タンパク質は、APRILまたはBAFFへの結合について評価され得る。本明細書におけるマルチドメイン免疫調節タンパク質の場合、該タンパク質は、同族結合パートナー、例えば、T細胞刺激受容体のリガンド（例えば、CD80またはCD86）への結合、もしくはT細胞刺激受容体（例えばCD28）への直接の結合、および/またはB細胞刺激受容体のリガンド（例えば、APRILまたはBAFF）への結合について評価され得る。結合親和性を評価するため、および/または結合分子（例えば免疫調節タンパク質）が特定の結合パートナーに特異的に結合するかどうかを決定するための様々なアッセイが公知である。例えば、当技術分野において周知の多数の結合アッセイのいずれかを使用して、結合パートナー、例えば、APRILまたはBAFFに対する結合分子、例えば免疫調節タンパク質の結合親和性を決定することは、当業者のレベルの範囲内である。様々な結合アッセイが公知であり、これらには、限

10

20

30

40

50

定されることなく、例えば、本明細書において記載されるものを含め、ELISA K_D 、Kin ExA、フローサイトメトリーおよび/または表面プラズモン共鳴装置)が含まれる。そのような方法には、限定されることなく、BIAcore (登録商標)、Octet (登録商標) またはフローサイトメトリーを伴う方法が含まれる。例えば、いくつかの態様では、表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析を使用して、2つのタンパク質間の複合体の結合キネティクスおよび結合定数を決定するために、BIAcore (登録商標) 機器を使用することができる (例えば、Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; および米国特許第5,283,173号、米国特許第5,468,614号、または均等物を参照)。SPRは、分子が表面に結合するかまたは表面から解離する際のセンサ表面での分子の濃度の変化を測定する。SPRシグナルの変化は、表面に近い質量濃度の変化に正比例し、それによって、2つの分子間の結合キネティクスの測定を可能にする。複合体の解離定数は、緩衝液がチップ上を通過する際の時間に対する屈折率の変化をモニタリングすることによって決定することができる。あるタンパク質の別のタンパク質への結合を測定するための他の好適なアッセイには、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) およびラジオイムノアッセイ (RIA) などのイムノアッセイ、または蛍光、UV吸収、円偏光二色性もしくは核磁気共鳴 (NMR) によってタンパク質の分光学的特性もしくは光学的特性の変化をモニタリングすることによる結合の決定が含まれる。他の例示的なアッセイには、限定されることなく、ウェスタンブロット、ELISA、分析用超遠心、分光法、フローサイトメトリー、配列決定、および発現されたポリヌクレオチド、またはタンパク質の結合を検出するための他の方法が含まれる。

10

20

【0545】

提供される免疫調節タンパク質はまた、T細胞またはB細胞の活性の調節を評価するための様々な評価のいずれかで評価され得る。そのようなアッセイの1つは、細胞増殖アッセイである。試験化合物 (例えば免疫調節タンパク質) の存在下または非存在下で細胞を培養し、例えば、トリチウム標識したチミジンの取り込みを測定することによって、または3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) の代謝分解に基づく比色アッセイによって、細胞増殖を検出する (Mosman, J. Immunol. Meth. 65:55-63, 1983)。代替的なアッセイ形式では、レポーター遺伝子を発現するようにさらに操作された細胞が使用される。レポーター遺伝子は、受容体連結経路に応答性であるプロモーターエレメントに連結され、アッセイでは、レポーター遺伝子の転写の活性化が検出される。細胞抽出物中で容易にアッセイされる多数のレポーター遺伝子、例えば、大腸菌lacZ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) および血清応答エレメント (SRE) が当技術分野において公知である (例えば、Shaw et al., Cell 56:563-72, 1989を参照)。例示的なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子である (de Wet et al., Mol. Cell. Biol. 7:725, 1987)。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、当技術分野において公知の方法を使用して発光によって検出される (例えば、Baumgartner et al., J. Biol. Chem. 269:29094-101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41:11, 1993)。ルシフェラーゼ活性アッセイキットは、例えば、Promega Corp., Madison, Wisから市販されている。

30

40

【0546】

提供される免疫調節タンパク質は、Grossら、国際公開番号WO00/40716に記載されているように、可溶性APRILまたは可溶性BAFFによるヒトB細胞の刺激を阻害する能力を特徴とし得る。要約すると、例えばCD19磁気ビーズ分離 (例えば、Miltenyi Biotec Auburn, CA) を使用して、末梢血単核球からヒトB細胞を単離する。精製されたB細胞は、刺激条件下、例えば、可溶性APRILの存在下、さらに漸増設定濃度の免疫調節タンパク質の存在下でインキュベートされ得る。B細胞は、増殖を測定するために、増殖色素によって標識され得るか、または $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -チミジンによって標識され得る。B細胞の数は、経時的に決定され得る。

【0547】

50

転写因子、例えば、NF- κ B、NFAT-1およびAP-1の機能的な制御下でレポーター遺伝子を発現するレポーター細胞株は、TACIまたはBCMAを発現するように作製され得る。例えば、レポーター細胞は、Jurkat細胞株および他のBリンパ腫細胞株を含むことができる。これらの細胞と可溶性BAFFリガンドまたは可溶性APRILリガンドとのインキュベーションにより、これらの構築物内のレポーター遺伝子を介してシグナルが伝達される。このシグナル伝達を調節するための提供される免疫調節タンパク質の効果を評価することができる。

【0548】

自己免疫状態または炎症状態を伴うものを含むある特定の疾患状態における提供される免疫調節タンパク質のインビボ有効性を試験するために、十分に確立された動物モデルが利用可能である。例えば、自己免疫疾患の動物モデルには、例えば、SLE（全身性エリテマトーデス）のモデルとして機能するMRL-lpr/lprまたはNZB×NZW F1コンジェニックマウス系統が含まれる。そのような動物モデルは当技術分野において公知であり、例えば、Autoimmune Disease Models A Guidebook, Cohen and Miller eds. Academic Pressを参照されたい。New Zealand Black (NZB) マウスとNew Zealand White (NZW) マウスとの交配の子孫は、ヒトのSLEによく似た自然発生形態のSLEを発症する。NZBWとして知られる子孫マウスは、1ヶ月齢でT細胞に対するIgM自己抗体を発達させ始め、5～7ヶ月齢までに、Ig抗DNA自己抗体が主要な免疫グロブリンとなる。ポリクローナルB細胞機能亢進は、自己抗体の過剰産生をもたらす。これらの自己抗体、特に、一本鎖DNAに対する自己抗体の沈着は、タンパク尿、高窒素血症、および腎不全による死亡として臨床的に現れる糸球体腎炎の発症に関連する。自然発生SLEに罹患したマウスでは、腎不全は主要な死因であり、NZBW系統では、このプロセスは慢性的かつ閉塞性である。この疾患は、雄よりも雌の方が急速かつ重症であり、平均生存期間は雄の406日間と比較してわずか245日間である。雌マウスの多くは、7～9ヶ月齢までに症候性（タンパク尿）になるが、一部の雌マウスは、症状を発症する時点で、はるかに若齢または高齢であり得る。NZBWマウスに見られる致死性免疫腎炎（fatal immune nephritis）は、ヒトSLEに見られる糸球体腎炎と極めて類似しており、これにより、この自然発生マウスモデルは、潜在的なSLE治療薬の試験にとって極めて魅力的になる（Puterman and Naparstek, Murine Models of Spontaneous Systemic Lupus Erythematosus, Autoimmune Disease Models: A Guidebook, chapter 14, pp.217-34, 1994; Mohan et al., J. Immunol. 154:1470-80, 1995; and Daikh et al., J. Immunol. 159:3104-08, 1997）。症状と、疾患の経過に対する変化とを改善する効果を評価するために、これらのマウスへの提供される免疫調節タンパク質の投与を評価することができる。

【0549】

炎症およびループス様疾患の別のマウスモデルには、SLEのbm12誘導性マウスモデルがある（Klarquist and Janssen, 2015, J. Vis. Exp. (105), e53319）。雌I-A^{bm12}B6 (C) -H2-Ab1^{bm12}/KhEgJ（「bm12」）マウス由来の脾細胞懸濁液を、雌C57BL/6NJレシピエントマウスに養子移入する。H2-Ab1^{bm12}はH2-Ab1^bと3ヌクレオチド異なり、MHCクラスII I-A分子の β 鎖内で3アミノ酸の変化をもたらす。レシピエント抗原提示細胞によるドナーbm12 CD4⁺T細胞のアロ活性化は、自己抗体産生、免疫細胞サブセットの変化、および軽度の腎疾患を含む、SLEによく似た症状を伴う慢性GVHDをもたらす。免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎は、該モデルでは後期に発症し、主に、IgG1抗体、IgG2b抗体、IgG2c抗体およびIgG3抗体に結合した自己抗原から構成される。このモデルのエンドポイントは、抗dsDNA抗体の濃度、選択されたIgGアイソタイプ、血中尿素窒素（BUN）、および血清中のクレアチニン、脾臓および子宮頸部LN内の免疫細胞サブセット組成、ならびに腎臓組織像を含み得る。

【0550】

いくつかの態様では、シェーグレン症候群（SjS）のマウスモデルを使用することができる。Zhou et al., 2016 Sci. Rep. 6, 39105によって公開されたプロトコールの修正

版に基づいて、抗マウス (m) PD-L1抗体の反復投与を使用して、雌の、糖尿病を起こしやすい非肥満性糖尿病 (NOD) マウスでは、SjS疾患、および糖尿病の発症の加速を誘導することができる。6週齢から開始して、100 μ gの抗PD-L1抗体を試験0、2、4および6日目にマウスに腹腔内 (IP) 注射し、提供される免疫調節タンパク質を用いて様々な日にマウスを処置する。エンドポイント分析のための対照としてナイーブマウスを含める。全マウスを典型的には試験10日目に 殺し、各マウス由来の顎下腺 (SMG) および脾臓を組織病理評価のために採取して、唾液腺炎および脾臓炎の徴候および重症度を評価する。様々な日に血糖値を測定することができる。

【0551】

いくつかの態様では、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) のマウスモデルを使用することができる。これらのモデルは、ヒト多発性硬化症に似ており、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) またはプロテオリピドタンパク質 (PLP) などの神経タンパク質へのT細胞活性化の結果として脱髄を生じる。抗原の接種は、CD4+、クラスII MHC拘束性T細胞 (Th1) の誘導をもたらす。EAEに対するプロトコルを変更すると、該モデルの急性変種、慢性再発性変種、または受動的移入変種を作製することができる (Weinberg et al., J. Immunol. 162:1818-26, 1999; Mijaba et al., Cell. Immunol. 186:94-102, 1999; および Glabinski, Meth. Enzym. 288:182-90, 1997)。症状と、疾患の経過に対する変化とを改善するための提供される免疫調節タンパク質の投与を評価することができる。

【0552】

いくつかの態様では、マウスがヒト関節リウマチ (RA) によく似た慢性炎症性関節炎を発症するコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) モデルを使用することができる。CIAは、RAと同様の免疫学的特徴および病理学的特徴を共有しているため、これは、潜在的なヒト抗炎症性化合物をスクリーニングするための理想的なモデルとなる。CIAモデルを使用することの別の利点は、発病機序が分かっていることである。II型コラーゲン上のT細胞エピトープおよびB細胞エピトープが同定されており、免疫媒介性関節炎に関連する様々な免疫学的パラメータ (遅延型過敏症および抗コラーゲン抗体) および炎症性パラメータ (サイトカイン、ケモカインおよびマトリックス分解酵素) が決定されており、該モデルを対象として試験化合物の有効性を評価するために使用され得る (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3:407-20, 1999; Williams et al., Immunol. 89:9784-788, 1992; Myers et al., Life Sci. 61:1861-78, 1997; および Wang et al., Immunol. 92:8955-959, 1995)。症状と、疾患の経過に対する変化とを改善するための提供される免疫調節タンパク質の投与を評価することができる。

【0553】

いくつかの態様では、マウスにオボアルブミンを注射し、抗原を用いて経鼻的に再刺激し、これにより、喘息と同様に気管支内で喘息反応が生じると、喘息などの気管支感染のモデルを作製することができる。症状と、疾患の経過に対する変化とを改善するための提供される免疫調節タンパク質の投与を評価することができる。

【0554】

いくつかの態様では、重症筋無力症 (MG) が、マウスモデルを利用することができる別の自己免疫疾患である。MGは、ニコチン性アセチルコリン受容体 (AChR) に対する自己抗体の産生を伴う神経筋伝達の障害である。MGは、後天性または遺伝性であり、異常な衰弱と、運動時の疲労とを含む臨床的特徴を伴う。MGのマウスモデルが確立されている。(Christadoss et al., Establishment of a Mouse Model of Myasthenia Gravis Which Mimics Human Myasthenia Gravis Pathogenesis for Immune Intervention, in Immunobiology of Proteins and Peptides VIII, Atassi and Bixler, eds., 1995, pp. 195-99.) 実験的自己免疫性重症筋無力症 (EAMG) は、AChRに対する抗体の存在を特徴とする抗体媒介疾患である。これらの抗体は受容体を破壊し、不完全な神経筋電気インパルスをもたらす、筋力を低下させる。EAMGモデルでは、ニコチン性アセチルコリン受容体を用いてマウスを免疫する。MGの臨床徴候は、2

10

20

30

40

50

回目の免疫化の数週間後に明らかになる。EAMGは、ラジオイムノアッセイ (Christadoss and Dauphinee, *J. Immunol.* 136:2437-40, 1986; および Lindstrom et al., *Methods Enzymol.* 74:432-60, 1981) による AChR 抗体の血清レベルの測定、筋肉 AChR の測定、または筋電図検査 (Wu et al. *Protocols in Immunology*. Vol. 3, Eds. Coligen, Kruisbeek, Margulies, Shevach, and Strober. John Wiley and Sons, New York, p.15.8.1, 1997) を含むいくつかの方法によって評価される。

【0555】

インビボモデルのための別の使用には、動物への抗原負荷の送達、それに続く免疫調節タンパク質の投与、ならびに T 細胞応答および B 細胞応答の測定が含まれる。T 細胞依存性免疫応答および T 細胞非依存性免疫応答は、Perez-Melgosa et al., *J. Immunol.* 163:1123-7, 1999 に記載されているように測定され得る。B 細胞応答に対する効果を測定するために、定期的な抗原負荷 (例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ヒツジ赤血球 (SRBC)、オボアルブミンまたはコラーゲン) に供され、その後、提供される免疫調節タンパク質を投与された動物における免疫応答を行うことができる。

【0556】

放射性標識された免疫調節タンパク質と組合わせて薬物動態試験を使用して、そのようなポリペプチドの分布および半減期をインビボで決定することができる。

【0557】

T 細胞応答に対する活性を評価するためのアッセイも評価することができる。IFN-ガンマまたは他のエフェクターサイトカインを測定する T 細胞活性化アッセイを使用することができる。免疫調節タンパク質は、T 細胞活性化後のエフェクターサイトカイン分泌を抑制するかまたは減少させる能力について評価され得る。免疫学的活性の増強または抑制を決定するためのアッセイには、培養上清中のインターフェロン-ガンマサイトカインレベルを測定する MLR (混合リンパ球反応) アッセイ (Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 Sep; 2 (9) :846-56)、SEB (ブドウ球菌エンテロトキシン B)、T 細胞刺激アッセイ (Wang et al., *Cancer Immunol Res.* 2014 Sep; 2 (9) :846-56)、および抗 CD3 T 細胞刺激アッセイ (Li and Kurlander, *J Transl Med.* 2010; 8:104) が含まれる。T 細胞活性化は IFN-ガンマサイトカインの分泌に関連するため、これらのインビトロヒト T 細胞アッセイからの培養上清中の IFN-ガンマレベルの検出は、市販の ELISA キットを使用してアッセイすることができる (Wu et al., *Immunol Lett* 2008 Apr 15; 117 (1) :57-62)。アッセイには、標準的な ⁵¹Cr 放出アッセイ (例えば、Milone et al., (2009) *Molecular Therapy* 17:1453-1464 を参照)、もしくはフローベースの細胞傷害アッセイ、またはインピーダンスベースの細胞傷害アッセイ (Peper et al. (2014) *Journal of Immunological Methods*, 405:192-198) を含め、細胞傷害性を評価するためのアッセイも含まれる。いくつかの態様では、使用されるアッセイは、抗 CD3 共固定化アッセイである。このアッセイでは、追加の組換えタンパク質の有無にかかわらず、固定化された抗 CD3 によって初代 T 細胞を刺激する。通常 24 ~ 72 時間の時点で、培養上清を回収する。別の態様では、使用されるアッセイは、混合リンパ球反応 (MLR) である。このアッセイでは、同種 APC を用いて初代 T 細胞を模倣する。通常 24 ~ 72 時間の時点で、培養上清を回収する。標準的な ELISA 技術によって、培養上清中でヒト IFN-ガンマレベルを測定する。場合によっては、市販のキットが供給業者から入手可能であり、製造業者の推奨に従ってアッセイを行うことができる。

【0558】

いくつかの態様では、免疫調節タンパク質が IFN-ガンマ発現を調節する能力、例えば、IFN-ガンマ発現を増加または減少させる能力についてアッセイする際に、T 細胞レポーターアッセイを使用することができる。いくつかの態様では、T 細胞は、Jurkat T 細胞株であるか、または Jurkat T 細胞株に由来する。レポーターアッセイでは、レポーター細胞株 (例えば Jurkat レポーター細胞) はまた、免疫調節タンパク質の同族結合パートナーである受容体を過剰発現するように生成される。いくつかの態様では、レポーター T 細胞はまた、レポーターに機能的に連結された、T 細胞活性化に応答性な誘導性プロモ-

ターを含有するレポーター構築物を含む。いくつかの態様では、レポーターは、蛍光レポーターまたは発光レポーターである。いくつかの態様では、レポーターはルシフェラーゼである。いくつかの態様では、プロモーターは、CD3シグナル伝達に応答性である。いくつかの態様では、プロモーターはNFATプロモーターである。いくつかの態様では、プロモーターは、共刺激シグナル伝達、例えばCD28共刺激シグナル伝達に応答性である。いくつかの態様では、プロモーターはIL-2プロモーターである。レポーターアッセイの局面では、例えば、T細胞共刺激受容体の野生型リガンドを発現する抗原提示細胞（APC）との共インキュベーションによって、レポーター細胞株が刺激される。いくつかの態様では、APCは人工APCである。人工APCは、当業者に周知である。いくつかの態様では、人工APCは、1つまたは複数の哺乳動物細胞株、例えば、K562細胞、CHO細胞または293細胞に由来する。

10

【0559】

VII. 治療的適用

本明細書において記載される薬学的組成物（本明細書において記載される免疫調節タンパク質を含む薬学的組成物を含む）は、疾患の処置などの様々な治療的適用に使用され得る。例えば、いくつかの態様では、薬学的組成物は、哺乳動物の炎症性障害もしくは自己免疫障害、がん、臓器移植、ウイルス感染および/または細菌感染を処置するために使用される。薬学的組成物は、疾患を処置するために免疫応答を調節（例えば、低減）することができる。

【0560】

20

そのような方法および使用には、例えば、疾患、状態または障害を有する対象への分子またはそれを含有する組成物の投与を伴う、治療方法および使用が含まれる。記載されるようないくつかの場合では、疾患または障害は、自己免疫性または炎症性の疾患、状態または障害である。いくつかの態様では、分子または操作された細胞は、疾患、状態または障害の処置を行うのに有効な量で投与される。使用には、免疫調節タンパク質を含む分子の使用、およびそのような治療方法を行うための医薬を調製する際の使用が含まれる。いくつかの態様では、方法は、疾患または状態を有するかまたは有すると疑われる対象に、提供される免疫調節タンパク質またはそれを含有する組成物を投与することによって行われる。いくつかの態様では、方法は、それによって、対象の疾患または状態または障害を処置する。

30

【0561】

例示的な対象には、哺乳動物対象、例えば、家畜、飼育動物およびヒト患者が含まれる。特定の態様では、対象はヒト対象である。

【0562】

本明細書において記載される薬学的組成物は、疾患の処置などの様々な治療的適用に使用され得る。例えば、いくつかの態様では、薬学的組成物は、哺乳動物の炎症性障害もしくは自己免疫障害、臓器移植、ウイルス感染および/または細菌感染を処置するために使用される。薬学的組成物は、疾患を処置するために免疫応答を調節することができる。いくつかの態様では、薬学的組成物は、免疫応答を抑制し、これは、炎症性障害もしくは自己免疫障害、または臓器移植の処置に有用であり得る。

40

【0563】

提供される方法は、限定されることなく、例えば、免疫系および免疫系応答の調節または調整が有益である、哺乳動物の様々な免疫系の疾患または状態を処置するための予防方法または治療方法を含む様々な用途に対して有用性を有すると考えられる。例えば、免疫応答の抑制は、レシピエントによるドナーからの組織、細胞または臓器の移植の拒絶を抑制するための予防方法および/または治療方法に有益であり得る。治療的状況では、哺乳動物対象は、典型的には、免疫系の疾患または状態を有するものであり、投与は、疾患または状態がさらに進行するのを予防するために行われる。

【0564】

BCMA融合タンパク質およびマルチドメイン免疫調節タンパク質を含む提供される免

50

疫調節タンパク質は、自己免疫疾患、B細胞がん、免疫調節、EBDおよび任意の抗体媒介病変（例えば、ITCP、重症筋無力症など）、腎疾患、間接的T細胞免疫応答、移植片拒絶、ならびに移植片対宿主病の処置に使用され得る。免疫調節タンパク質の投与は、免疫応答中にB細胞応答を特異的に調節することができる。さらに、提供される免疫調節タンパク質の投与は、B細胞の発達、他の細胞の発達、抗体産生、およびサイトカイン産生を調節するために使用され得る。提供される免疫調節タンパク質の投与または使用はまた、例えば、BAFFもしくはAPRIL単独の増殖作用を中和することによって、または提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の場合には、T細胞刺激分子によって媒介される増殖作用を中和することによって、例えば、CD28に対するCD80/CD86の増殖作用を中和することによって、T細胞およびB細胞の伝達を調節することができる。

10

【0565】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、免疫応答を抑制し、これは、炎症性障害もしくは自己免疫障害、または臓器移植の処置に有用であり得る。いくつかの態様では、薬学的組成物は、B細胞刺激受容体および/またはT細胞刺激受容体のアンタゴニスト活性を示し、それによって、免疫応答を低下または減少させる免疫調節タンパク質を含有する。

【0566】

いくつかの態様では、組成物は、自己免疫疾患を処置するために使用され得る。いくつかの態様では、免疫系疾患（例えば自己免疫疾患）に罹患している対象に、本明細書において提供される免疫調節タンパク質を含有する治療用組成物を投与すると、そのような免疫系攻撃、またはそれに関連する生物学的応答の抑制または阻害をもたらされ得る。健康な身体組織に対するこの免疫系攻撃を抑制することによって、健康な組織に対するそのような攻撃に起因または関連する、結果として生じる身体症状（例えば、疼痛、関節炎症、関節腫脹または圧痛）を減少させるかまたは緩和することができ、免疫系攻撃に起因または関連する生物学的損傷および物理的損傷を減少させるか、遅延させるか、または停止することができる。予防的状況では、対象は、免疫系の疾患、障害もしくは状態を有するもの、免疫系の疾患、障害もしくは状態にかかりやすいもの、または免疫系の疾患、障害もしくは状態を呈すると考えられるものであり得、投与は、典型的には、疾患、障害もしくは状態の進行を予防し、それに関連する症状、徴候もしくは生物学的応答を阻害もしくは緩和し、それから潜在的に生じる身体損傷を予防し、および/または対象の身体機能を維持もしくは改善するために行われる。

20

30

【0567】

いくつかの態様では、本明細書において記載される薬学的組成物によって処置され得る疾患または状態は、免疫複合体沈着（例えば、ループス腎炎、血管炎）；経路との直接干渉（例えば、破局的な抗リン脂質抗体症候群、重症筋無力症発症；抗Jo-1疾患）；オプソニン化、もしくは細胞への直接損傷（例えば、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血）；同種移植片の抗体媒介拒絶（例えば高感作腎移植患者）；または生物学的置換因子、ベクター（例えば抗Factor 8）に対する抗薬物抗体によって媒介される任意の疾患である。

【0568】

いくつかの態様では、本明細書において記載される薬学的組成物によって処置され得る炎症性障害および自己免疫障害は、糖質コルチコイドを用いないフレア予防を含む全身性エリテマトーデス（SLE）；シェーグレン症候群；原発性胆汁性肝硬変（PBC）；全身性強皮症；多発性筋炎；糖尿病予防；IgA腎症；IgA血管炎；B細胞がん、例えば骨髄腫；多発性硬化症または視神経炎である。

40

【0569】

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質は、プレB細胞白血病またはB細胞白血病、例えば、形質細胞白血病、慢性または急性リンパ性白血病、骨髄腫、例えば、多発性骨髄腫、形質細胞性骨髄腫、内皮性骨髄腫および巨細胞骨髄腫、ならびにリンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫を処置するために使用され得る。

【0570】

50

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質は、疾患の処置に使用するためのBリンパ球の作用を選択的に遮断する免疫抑制剤として使用され得る。例えば、ある特定の自己免疫疾患は、組織破壊と、疾患の増悪とに寄与する自己抗体の産生を特徴とする。自己抗体はまた、免疫複合体沈着合併症の発生をもたらし、腎不全、神経痛症状および死を含む、全身性エリテマトーデスの多くの症状をもたらす得る。細胞応答とは無関係に抗体産生を調節することはまた、多くの疾患状態では有益である。B細胞はまた、関節リウマチでは、関節炎誘発原性免疫グロブリンの分泌に何らかの役割を果たすことが示されている。B細胞の作用を阻害、遮断または中和し、それによって、抗体産生を抑制するための提供される免疫調節タンパク質の方法および使用は、重症筋無力症、関節リウマチ、多関節経過若年性関節リウマチおよび乾癬性関節炎などの自己免疫疾患の処置に有益である。

10

【0571】

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質は、自己免疫疾患に関連してもしなくてもよい末期腎疾患に関連するB細胞の作用を遮断または中和するために使用され得る。そのような方法はまた、免疫学的腎疾患を処置するために有用である。そのような方法は、膜性腎症、IgA腎症またはベルガー病、IgM腎症、IgA血管炎、グッドパスチャー病、感染後糸球体腎炎、メサングウム増殖性疾患、慢性リンパ性白血病、微小変化型ネフローゼ症候群などの疾患に関連する糸球体腎炎の処置に有用である。そのような方法はまた、ループス、多発動脈炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、強皮症、HTV関連疾患、アミロイドーシスまたは溶血性尿毒症症候群などの疾患に関連する二次性糸球体腎炎または血管炎を処置するための治療的適用として役立つ。提供される方法はまた、慢性腎盂腎炎、鎮痛薬乱用、腎石灰化症、他の薬剤によって引き起こされる腎症、腎石症、または慢性もしくは急性間質性腎炎に関連する間質性腎炎または腎盂腎炎を処置するための治療的適用の一部として有用である。本明細書において提供される方法はまた、腎動脈狭窄または閉塞、およびコレステロール塞栓または腎塞栓を含む高血圧疾患または大血管疾患の処置における提供される免疫調節タンパク質の使用を含む。提供される方法および使用はまた、腎新生物または泌尿器新生物、多発性骨髄腫、リンパ腫、軽鎖神経障害またはアミロイドーシスの処置にも使用され得る。

20

【0572】

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質はまた、喘息および他の慢性気道疾患、例えば、気管支炎および気腫の処置にも使用され得る。提供される免疫調節タンパク質はまた、シェーグレン症候群を処置するために使用され得る。

30

【0573】

いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質の方法および使用は、特に移植片対宿主病および移植片拒絶などの治療的使用のための免疫抑制を含む。いくつかの態様では、提供される免疫調節タンパク質の方法および使用は、インスリン依存性糖尿病（IDDM）およびクローン病などの自己免疫疾患の処置を含む。本明細書において提供される方法は、慢性炎症性疾患を処置するため、特に、関節痛、腫脹、貧血および他の関連症状を軽減するため、ならびに敗血症性ショックを処置するための追加の治療的価値を有する。

【0574】

いくつかの態様では、本明細書において記載される免疫調節タンパク質を含有する薬学的組成物によって処置され得る炎症性障害および自己免疫障害には、限定されることなく、アカラシア；アジソン病；成人スチル病；無ガンマグロブリン血症；円形脱毛症；アミロイドーシス；強直性脊椎炎；抗GBM/抗TBM腎炎；抗リン脂質症候群；自己免疫性副腎炎（アジソン病）；自己免疫性血管浮腫；自己免疫性自律神経障害；自己免疫性脳脊髄炎；自己免疫性肝炎；自己免疫性内耳疾患（AIED）；自己免疫性心筋炎；自己免疫性卵巣炎；自己免疫性精巣炎；自己免疫性脾炎；多腺性自己免疫症候群II型（APS II）；自己免疫性網膜症；自己免疫性甲状腺疾患（AITD）；すなわち橋本病；自己免疫性蕁麻疹；軸索型ニューロパチーおよび神経性ニューロパチー（AMAN）；バロー病；ベーチェット病；良性粘膜類天疱瘡；水疱性類天疱瘡；キャッスルマン病（CD）；セリアック病；シャーガス病；慢性炎症性脱髄性多発ニュー

40

50

ーロパチー（CIDP）；慢性再発性多巣性骨髄炎（CRMO）；チャージ・ストラウス症候群（CSS）もしくは好酸球性肉芽腫症（Eosinophilic Granulomatosis）（EGPA）；癩痕性類天疱瘡；コーガン症候群；寒冷凝集素症；先天性心ブロック；コクサッキー心筋炎；CREST症候群；クローン病；疱疹状皮膚炎；皮膚筋炎；デビック病（視神経脊髄炎）；円形状ループス（Discoid lupus）；ドレスラー症候群；子宮内膜症；好酸球性食道炎（EoE）；好酸球性筋膜炎；結節性紅斑；本態性混合型クリオグロブリン血症；エバンス症候群；線維筋痛症；線維化肺炎；巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）；巨細胞性心筋炎；糸球体腎炎；グッドパスチャー症候群；多発血管炎性肉芽腫症；グレーブス病；ギラン・バレー症候群；橋本甲状腺炎；溶血性貧血；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病（HSP）；妊娠ヘルペスもしくは妊娠性類天疱瘡（PG）；化膿性汗腺炎（HS）（反対型ざ瘡）；低ガンマグロブリン血症；IgA腎症；IgA血管炎；IgG4関連硬化性疾患；免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）；封入体筋炎（IBM）；間質性膀胱炎（IC）；若年性関節炎；若年性糖尿病（1型糖尿病）；若年性筋炎（JM）；川崎病；ランバート・イートン症候群；白血球破壊性血管炎；扁平苔癬；硬化性苔癬；木質性結膜炎；線状IgA病（LAD）；ループス；慢性ライム病；メニエール病；顕微鏡的多発血管炎（MPA）；混合性結合組織病（MCTD）；モーレン潰瘍；ムッハ・ハーベルマン病；多巣性運動ニューロパチー（MMN）もしくはMMNCB；多発性硬化症；重症筋無力症；筋炎；ナルコレプシー；新生児ループス；視神経脊髄炎；好中球減少症；眼部癩痕性類天疱瘡；視神経炎；回帰性リウマチ（PR）；PANDAS；傍腫瘍性小脳変性症（PCD）；発作性夜間血色素尿症（PNH）；パリー・ロンベルグ症候群；扁平部炎（周辺性ブドウ膜炎）；パーソネージ・ターナー症候群；天疱瘡、尋常性天疱瘡；末梢神経障害；静脈周囲脳脊髄炎；悪性貧血（PA）；POEMS症候群；結節性多発動脈炎；多腺性症候群I型、II型、III型；リウマチ性多発筋痛症；多発性筋炎；心筋梗塞後症候群；心膜切開後症候群；原発性胆汁性肝硬変；原発性硬化性胆管炎；プロゲステロン皮膚炎；乾癬；乾癬性関節炎；赤芽球癆（PRCA）；壊疽性膿皮症；レイノー現象；反応性関節炎；反射性交感神経性ジストロフィー；再発性多発性軟骨炎；下肢静止不能症候群（RLS）；後腹膜線維症；リウマチ熱；関節リウマチ；サルコイドーシス；シュミット症候群；強膜炎；強皮症；シェーグレン症候群；精子および精巣の自己免疫；全身硬直症候群（SPS）；亜急性細菌性心内膜炎（SBE）；スザック症候群；交感性眼炎（SO）；高安動脈炎；側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎；血小板減少性紫斑病（TTP）；トロサ・ハント症候群（THS）；横断性脊髄炎；1型糖尿病；潰瘍性大腸炎（UC）；未分化結合組織疾患（UCTD）；ブドウ膜炎；血管炎；白斑またはフォークト・小柳・原田症候群が含まれる。

10

20

30

【0575】

いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質および提供されるマルチドメイン免疫調節（例えばTIM-BIM）融合タンパク質を含む提供される免疫調節タンパク質は、強皮症、重症筋無力症、GVHD（急性GVHDまたは慢性GVHDを含む）、移植に関連する免疫応答；抗リン脂質抗体症候群；多発性硬化症；シェーグレン症候群；IgG4関連疾患；I型糖尿病；糖質コルチコイド療法（GC）RAまたは急性ループス腎炎を含む関節リウマチを処置するために使用され得る。

【0576】

いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質および提供されるマルチドメイン免疫調節（例えばTIM-BIM）融合タンパク質を含む提供される免疫調節タンパク質は、筋萎縮性側索硬化症、視神経脊髄炎、横断性脊髄炎、CNS自己免疫、ギラン・バレー症候群、神経嚢虫症、サルコイドーシス（T/seroneg）、チャージ・ストラウス症候群、橋本甲状腺炎、グレーブス病、免疫性血小板減少症（ITP）、アジソン病、多発性筋炎または皮膚筋炎を処置するために使用され得る。

40

【0577】

いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質および提供されるマルチドメイン免疫調節（例えばTIM-BIM）融合タンパク質を含む提供される免疫調節タンパク質は、IgA腎症、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、Jo-1症候群などの抗シンテターゼ疾患、またはANCA血管炎を処置するために使用され得る。

【0578】

50

いくつかの態様では、BCMA-Fc融合タンパク質および提供されるマルチドメイン免疫調節（例えばTIM-BIM）融合タンパク質を含む提供される免疫調節タンパク質は、B細胞がんを処置するために使用され得る。いくつかの態様では、B細胞がんは、BAFFおよびAPRILが、B細胞にオートクリン生存ループを提供することに関与するまたは関わるがんである。いくつかの態様では、がんは、B細胞慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫または骨髄腫である。いくつかの態様では、がんは骨髄腫である。

【0579】

いくつかの態様では、治療量の薬学的組成物が投与される。典型的には、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、感染の程度、および状態の個人差を考慮して医師によって決定され得る。特定の患者に対する最適な投与量および処置計画は、疾患の徴候について患者をモニタリングし、それに応じて処置を調整することによって、医学の当業者によって容易に決定され得る。

【0580】

主題組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸血、埋め込みまたは移植を含む任意の好都合な様式で行われ得る。本明細書において記載される組成物は、患者に、皮下投与され得るか、皮内投与され得るか、腫瘍内投与され得るか、結節内投与され得るか、髄内投与され得るか、筋肉内投与され得るか、静脈内（i.v.）注射によって投与され得るか、または腹腔内投与され得る。一態様では、治療用組成物は、皮内注射または皮下注射によって患者に投与される。別の態様では、治療用組成物は、i.v.注射によって投与される。

【0581】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、単剤療法（すなわち、単一の薬剤として）、または併用療法（すなわち、1つまたは複数の追加の免疫抑制剤と組合わせて）として投与される。いくつかの態様では、追加の作用物質は、糖質コルチコイド（例えば、プレドニゾン、デキサメタゾンおよびヒドロコルチゾン）、細胞分裂阻害剤、例えば、T細胞および/もしくはB細胞の増殖に影響を及ぼす細胞分裂阻害剤（例えば、プリン類似体、アルキル化剤または代謝拮抗剤）、抗体（例えば、抗CD20モノクローナル抗体、抗CD25モノクローナル抗体または抗CD3モノクローナル抗体）、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、エベロリムス、インターフェロン、オピオイド、TNF結合タンパク質、ミコフェノール酸、低分子生物学的作用物質、例えば、フィンゴリモドもしくはミリオシン、サイトカイン、例えば、インターフェロンベータ-1a、インテグリンアゴニスト、またはインテグリンアンタゴニストである。

【0582】

VIII. 製造物品およびキット

本明細書において記載される薬学的組成物を好適な包装で含む製造物品も、本明細書において提供される。本明細書において記載される組成物（眼科用組成物など）に適した包装は当技術分野において公知であり、これらには、例えば、バイアル（密封バイアルなど）、容器、アンプル、ボトル、瓶、可撓性包装（例えば、密封されたマイラーまたはビニール袋）などが含まれる。これらの製造物品は、さらに滅菌および/または密封されてもよい。

【0583】

本明細書において記載される薬学的組成物（または製造物品）を含むキットが、さらに提供され、このキットは、組成物を使用する方法、例えば、本明細書において記載される使用に関する説明書をさらに備え得る。本明細書において記載されるキットはまた、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および本明細書において記載される任意の方法を行うための説明書付きの添付文書を備える、商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料を含み得る。

【0584】

IX. 例示的な態様

提供される態様の中には、以下のものがある：

1. (1) (i) T細胞刺激受容体、もしくは(ii) T細胞刺激受容体のリガンドに結合し、かつ/またはT細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのT細胞阻害分子(TIM)と;

(2) B細胞刺激受容体のリガンドに結合し、かつ/またはB細胞刺激受容体の活性に拮抗する、少なくとも1つのB細胞阻害分子(BIM)とを含む、免疫調節タンパク質。

2. TIMが、T細胞刺激受容体のリガンドに結合する、態様1の免疫調節タンパク質。

3. T細胞刺激受容体がCD28であり、および/またはT細胞刺激受容体のリガンドがCD80もしくはCD86である、態様2の免疫調節タンパク質。

4. TIMが、CD80またはCD86に結合するCTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分である、態様1~3のいずれかの免疫調節タンパク質。

5. CTLA-4細胞外ドメインまたはその結合部分が、(i) SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に記載のアミノ酸配列;(ii) SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に対して少なくとも85%の配列同一性を有するバリエーションCTLA-4のアミノ酸配列;または(iii) IgVドメインを含むその一部からなる、態様4の免疫調節タンパク質。

6. CTLA-4細胞外ドメインが、SEQ ID NO:1に記載のアミノ酸配列からなる、態様4または態様5の免疫調節タンパク質。

7. CTLA-4細胞外ドメインが、SEQ ID NO:1に対して少なくとも85%の配列同一性を有するバリエーションCTLA-4のアミノ酸配列、またはIgVドメインを含むその一部からなり、バリエーション配列が、SEQ ID NO:1、またはIgVドメインを含むその一部に、1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様4または態様5の免疫調節タンパク質。

8. バリエーションCTLA-4が、CD80およびCD86のエクトドメインに結合し、任意で、CD80およびCD86の一方または両方に対する結合親和性が、SEQ ID NO:1に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部と比較して増加している、態様7の免疫調節タンパク質。

9. バリエーションCTLA-4が、SEQ ID NO:92に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる、態様8の免疫調節タンパク質。

10. バリエーションCTLA-4が、SEQ ID NO:113に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる、態様8の免疫調節タンパク質。

11. バリエーションCTLA-4が、SEQ ID NO:165に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる、態様8の免疫調節タンパク質。

12. バリエーションCTLA-4が、SEQ ID NO:186に記載の配列、またはIgVドメインを含むその一部からなる、態様8の免疫調節タンパク質。

13. B細胞刺激受容体のリガンドが、APRILもしくはBAFFであり、および/またはB細胞刺激受容体が、TACI、BCMAもしくはBAFF受容体である、態様1~12のいずれかの免疫調節タンパク質。

14. BIMが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するTACI細胞外ドメインまたはその結合部分からなるTACIポリペプチドである、態様1~13のいずれかの免疫調節タンパク質。

15. TACIポリペプチドが、切断型の野生型TACI細胞外ドメインであるか、またはそのバリエーションであり、切断型の野生型TACI細胞外ドメインが、システインリッチドメイン2(CRD2)を含むが、システインリッチドメイン1(CRD1)の全体を欠き、バリエーションTACIポリペプチドが、切断型の野生型TACI細胞外ドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様14の免疫調節タンパク質。

16. TACIポリペプチドが、切断型の野生型TACI細胞外ドメインであるか、またはそのバリエーションであり、切断型の野生型TACI細胞外ドメインが、SEQ ID NO:709に記載の位置を基準として、アミノ酸残基71~104を含む、アミノ酸残基67~118内に含まれる連続配列からなり、バリエーションTACIポリペプチドが、切断型の野生型TACI細胞外ドメインに1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様14または態様15の免疫調節タンパ

10

20

30

40

50

ク質。

17. BIMが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMA細胞外ドメインまたはその結合部分からなるBCMAポリペプチドである、態様1～13のいずれかの免疫調節タンパク質。

18. 切断型の野生型TACI細胞外ドメインが、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、59、50または51アミノ酸長である、態様14～16のいずれかの免疫調節タンパク質。

19. 切断型の野生型TACI細胞外ドメインが、SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸残基68～110からなる、態様14～16および17のいずれかの免疫調節タンパク質。

20. TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に記載のアミノ酸配列からなる；または、SEQ ID NO:528に記載の配列に1つもしくは複数のアミノ酸置換を含むそのバリエーションである、態様14～16および17～19のいずれかの免疫調節タンパク質。

21. 切断型TACIポリペプチドまたはそのバリエーションが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合する、態様14～16および17～20のいずれかの免疫調節タンパク質。

22. TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:516に記載の配列からなる切断型の野生型TACI細胞外ドメインである、態様14～16のいずれかの免疫調節タンパク質。

23. TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に記載の配列からなる切断型の野生型TACI細胞外ドメインである、態様14～16および17～21のいずれかの免疫調節タンパク質。

24. TACIポリペプチドがバリエーションTACIポリペプチドであり、バリエーションTACIポリペプチドが、切断型TACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する、態様15～16および17～21のいずれかの免疫調節タンパク質。

25. バリエーションTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:709に記載のナンバリングに対応する、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103の中から選択される位置に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様15～16、17～21および24のいずれかの免疫調節タンパク質。

26. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、
E74V, Q75E, Q75R, G76S, K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S,
R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N, I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D,
Y102D, F103S, F103V, F103Y

またはその保存的アミノ酸置換から選択される、態様25の免疫調節タンパク質。

27. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、E74V、K77E、Y79F、L82H、L82P、R84G、R84L、R84Q、D85VまたはC86Yのうちの少なくとも1つを含む、態様25または態様26の免疫調節タンパク質。

28. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、
D85E/K98T, I87L/K98T, L82P/I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y,
Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q,
Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101Dまたは
I87M/A101D

である、態様25～27のいずれかの免疫調節タンパク質。

29. 1つまたは複数のアミノ酸置換がK77E/F78Y/Y102Dである、態様25～28のいずれかの免疫調節タンパク質。

30. 1つまたは複数のアミノ酸置換がQ75E/R84Qである、態様25～28のいずれかの免疫調節タンパク質。

31. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:541に記載されている、態様25～29のいずれかの免疫調節タンパク質。

32. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:542に記載されている、態様25～28および30のいずれかの免疫調節タンパク質。

33. TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:709に記載の位置のナンバリングに対応する、40、59、60、61、74、75、76、77、78、79、82、83、84、85、86、87、88、92、95、97、98、99、101、102および103の中から選択される位置で、参照TACIポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、バリアントTACIポリペプチドである、態様14の免疫調節タンパク質。

34. 参照TACIポリペプチドが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するTACIの細胞外ドメインまたはその特異的結合部分からなる切断型ポリペプチドである、態様33の免疫調節タンパク質。

35. 参照TACIポリペプチドが、(i) SEQ ID NO:709に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:709に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) APRIL、BAFF、もしくはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するCRD1ドメインおよびCRD2ドメインの一方もしくは両方を含む(i)もしくは(ii)の一部を含む、態様33および34のいずれかの免疫調節タンパク質。

36. 参照TACIポリペプチドが、N末端メチオニンを欠く、態様33～35のいずれかの免疫調節タンパク質。

37. 参照TACIポリペプチドが、CRD1ドメインおよびCRD2ドメインを含む、態様33～36のいずれかの免疫調節タンパク質。

38. 参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:516に記載の配列を含む、態様33～37のいずれかの免疫調節タンパク質。

39. 参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:516に記載の配列からなる、態様33～37のいずれかの免疫調節タンパク質。

40. 参照TACIポリペプチドが、CRD2ドメインから本質的になる、態様33～36のいずれかの免疫調節タンパク質。

41. 参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に記載の配列を含む、態様33～36および40のいずれかの免疫調節タンパク質。

42. 参照TACIポリペプチドが、SEQ ID NO:528に記載の配列からなる、態様33～36および40のいずれかの免疫調節タンパク質。

43. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、
W40R, Q59R, R60G, T61P E74V, Q75E, Q75R, G76S,
K77E, F78Y, Y79F, L82H, L82P, L83S, R84G, R84L, R84Q, D85E, D85V, C86Y, I87L, I87M, S88N,
I92V, Q95R, P97S, K98T, Q99E, A101D, Y102D, F103S, F103V, F103Y

またはその保存的アミノ酸置換から選択される、態様33～42のいずれかの免疫調節タンパク質。

44. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、E74V、K77E、Y79F、L82H、L82P、R84G、R84L、R84Q、D85VまたはC86Yのうちの少なくとも1つを含む、態様33～43のいずれかの免疫調節タンパク質。

45. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換K77Eを含む、態様33～44のいずれかの免疫調節タンパク質。

46. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換R84Gを含む、態様33～44のいずれかの免疫調節タンパク質。

47. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換R84Qを含む、態様33～44のいずれかの免疫調節タンパク質。

48. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、

10

20

30

40

50

D85E/K98T, I87L/K98T, R60G/Q75E/L82P, R60G/C86Y,
W40R/L82P/F103Y, W40R/Q59R/T61P/K98T, L82P/I87L, G76S/P97S, K77E/R84L/F103Y,
Y79F/Q99E, L83S/F103S, K77E/R84Q, K77E/A101D, K77E/F78Y/Y102D, Q75E/R84Q,
Q75R/R84G/I92V, K77E/A101D/Y102D, R84Q/S88N/A101D, R84Q/F103V, K77E/Q95R/A101D または
I87M/A101D

である、態様33～47のいずれかの免疫調節タンパク質。

49. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、K77E/F78Y/Y102Dである、態様33～44、
45および48のいずれかの免疫調節タンパク質。

10

50. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、Q75E/R84Qである、態様33～44、47および
48のいずれかの免疫調節タンパク質。

51. バリアントTACIポリペプチドが、参照TACIポリペプチドと比較して、APRILお
よびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する、態様33～50のい
ずれかの免疫調節タンパク質。

52. バリアントTACIポリペプチドが、APRILに対して増加した結合親和性を有する、
態様24または態様51の免疫調節タンパク質。

53. バリアントTACIポリペプチドが、BAFFに対して増加した結合親和性を有する、
態様24または態様51の免疫調節タンパク質。

54. バリアントTACIポリペプチドが、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和
性を有する、態様24または態様51の免疫調節タンパク質。

20

55. BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性が、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍
、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を
超えて独立して増加している、態様24および51～54のいずれかの免疫調節タンパク質。

56. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:517～527、536、537、682
～701のいずれか1つに記載の配列を含む、または

バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～68
1のいずれか1つに記載の配列を含む、

態様15～16、17～21および24～55のいずれかの免疫調節タンパク質。

57. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:517～527、536、537、682
～701のいずれか1つに記載の配列からなるかもしくは本質的になる、または

30

バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:529～535、538～550、673～68
1のいずれか1つに記載の配列からなるかもしくは本質的になる、

態様15～16、17～21および24～55のいずれかの免疫調節タンパク質。

58. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:541に記載の配列からなる、また
は本質的になる、態様15～16、17～21、24～55および57のいずれかの免疫調節タン
パク質。

59. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:542に記載の配列からなる、また
は本質的になる、態様15～16、17～21、24～55および57のいずれかの免疫調節タン
パク質。

40

60. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:688に記載の配列からなる、また
は本質的になる、態様15～16、17～21、24～55および57のいずれかの免疫調節タン
パク質。

61. バリアントTACIポリペプチドが、SEQ ID NO:535に記載の配列からなる、また
は本質的になる、態様15～16、17～21、24～55および57のいずれかの免疫調節タン
パク質。

62. 少なくとも1つのTACIポリペプチドに連結された異種部分を含む、態様15～16
、17～21および24～61のいずれかの免疫調節タンパク質。

63. 異種部分が、半減期延長部分、多量体化ドメイン、細胞の表面上の分子に結合す
る標的指向部分、または検出可能な標識である、態様62の免疫調節タンパク質。

50

64. 半減期延長部分が、多量体化ドメイン、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、Pro/Ala/Ser (PAS)、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータサブユニットのC末端ペプチド (CTP)、ポリエチレングリコール (PEG)、アミノ酸の長い非構造化親水性配列 (XTEN)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、アルブミン結合小分子、またはそれらの組合せを含む、態様63の免疫調節タンパク質。

65. BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に記載の配列からなる、態様17の免疫調節タンパク質。

66. BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:710に記載のナンバリングに対応する、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置で、参照BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン (ECD)、または特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションBCMAポリペプチドである、態様17の免疫調節タンパク質。

10

67. バリエーションBCMAポリペプチドを含む免疫調節タンパク質であって、バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:710に記載の位置のナンバリングに対応する、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置で、参照BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン (ECD) またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、免疫調節タンパク質。

68. 参照BCMAポリペプチドが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMAの細胞外ドメインまたはその特異的結合部分からなるポリペプチドである、態様66または態様67の免疫調節タンパク質。

20

69. 参照BCMAポリペプチドが、(i) SEQ ID NO:710に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:710に対して少なくとも95%の37a配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i) もしくは(ii) の一部を含む、態様66～68のいずれかの免疫調節タンパク質。

70. 参照BCMAが、N末端メチオニンを欠く、態様66～69のいずれかの免疫調節タンパク質。

71. 参照BCMAポリペプチドが、(i) SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i) もしくは(ii) の一部を含む、態様66～70のいずれかの免疫調節タンパク質。

30

72. 参照BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に記載の配列を含む、態様66～71のいずれかの免疫調節タンパク質。

73. 参照BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に記載の配列からなる、態様66～71のいずれかの免疫調節タンパク質。

74. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、

S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y, S16A,

H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R,

H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L,

40

Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L,

N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G,

T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y,

S48G

またはその保存的アミノ酸置換から選択される、態様66～73のいずれかの免疫調節タンパク質。

75. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、19位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、H19A、H19C、H19D、H19E、H19F、H19G、H19I、H

50

19K、H19L、H19M、H19N、H19P、H19Q、H19R、H19S、H19T、H19V、H19W、H19Yから選択される、態様66～74のいずれかの免疫調節タンパク質。

76. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Lを含む、態様66～75のいずれかの免疫調節タンパク質。

77. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Kを含む、態様66～75のいずれかの免疫調節タンパク質。

78. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Rを含む、態様66～75のいずれかの免疫調節タンパク質。

79. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Yを含む、態様66～75のいずれかの免疫調節タンパク質。

80. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、25位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、Q25E、Q25F、Q25G、Q25H、Q25I、Q25K、Q25L、Q25M、Q25S、Q25V、Q25Yから選択される、態様66～79のいずれかの免疫調節タンパク質。

81. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、31位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、N31D、N31G、N31H、N31K、N31L、N31M、N31P、N31S、N31V、N31Yから選択される、態様66～80のいずれかの免疫調節タンパク質。

82. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、35位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、L35A、L35M、L35P、L35S、L35V、L35Yから選択される、態様66～81のいずれかの免疫調節タンパク質。

83. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、36位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、T36A、T36G、T36N、T36M、T36S、T36Vから選択される、態様66～82のいずれかの免疫調節タンパク質。

84. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、
H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D; H19Y/A43E;
H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A; H19Y/N47D;
S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H; Q10P/H19Y/Q25H;
H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P; H19Y/R39Q/N47D;
S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A; N11S/H19Y/T46A;
H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D; S9N/H19Y/Q25K/N31D;
S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D;
H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I;
H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V;
H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S;
H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G;
H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A;
H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S;
H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N;
H19L/Q25H/N31D/L35S; または H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S

である、態様66～83のいずれかの免疫調節タンパク質。

85. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、S16A/H19Y/R39Qを含む、態様66～75、79および84のいずれかの免疫調節タンパク質。

86. バリエーションBCMAポリペプチドが、参照TACIポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する、態様66～85のい

いずれかの免疫調節タンパク質。

87. バリエントBCMAポリペプチドが、APRILに対して増加した結合親和性を有する、態様86の免疫調節タンパク質。

88. バリエントBCMAポリペプチドが、BAFFに対して増加した結合親和性を有する、態様86の免疫調節タンパク質。

89. バリエントBCMAポリペプチドが、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和性を有する、態様86の免疫調節タンパク質。

90. BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性が、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を超えて独立して増加している、態様86～89のいずれかの免疫調節タンパク質。

91. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列を含む、態様66～90のいずれかの免疫調節タンパク質。

92. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列からなる、または本質的になる、態様66～90のいずれかの免疫調節タンパク質。

93. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:381に記載の配列からなる、または本質的になる、態様66～90のいずれかの免疫調節タンパク質。

94. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:411に記載の配列からなる、または本質的になる、態様66～90のいずれかの免疫調節タンパク質。

95. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:405に記載の配列からなる、または本質的になる、態様66～90のいずれかの免疫調節タンパク質。

96. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:406に記載の配列からなる、または本質的になる、態様66～90のいずれかの免疫調節タンパク質。

97. 少なくとも1つのBCMAポリペプチドに連結された異種部分を含む、態様17および66～96のいずれかの免疫調節タンパク質。

98. 異種部分が、半減期延長部分、多量体化ドメイン、細胞の表面上の分子に結合する標的指向部分、または検出可能な標識である、態様97の免疫調節タンパク質。

99. 半減期延長部分が、多量体化ドメイン、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、Pro/Ala/Ser (PAS)、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのベータサブユニットのC末端ペプチド (CTP)、ポリエチレングリコール (PEG)、アミノ酸の長い非構造化親水性配列 (XTEN)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、アルブミン結合小分子、またはそれらの組合せを含む、態様98の免疫調節タンパク質。

100. 少なくとも1つのBCMAポリペプチドに連結された、免疫グロブリンのFc領域を含む、態様17および66～99のいずれかの免疫調節タンパク質。

101. 少なくとも1つのTIMが、1つのみのTIMを含む、態様1～17、18～20、21～23、24～33、39～66および68～100のいずれかの免疫調節タンパク質。

102. 少なくとも1つのTIMが、2、3、4または5つのTIMを含み、任意で、各TIMが同じである、態様1～17、18～20、21～23、24～33、39～66および68～100のいずれかの免疫調節タンパク質。

103. 各TIMが、直接的に、またはリンカーを介して間接的に連結され、任意で、リンカーがペプチドリinkerである、態様102の免疫調節タンパク質。

104. 少なくとも1つのBIMが、1つのみのBIMを含む、態様1～17、18～20、21～23、24～33、39～66および68～103のいずれかの免疫調節タンパク質。

105. 少なくとも1つのBIMが、2、3、4または5つのBIMを含み、任意で、各BIMが同じである、態様1～17、18～20、21～23、24～33、39～66および68～103のいずれかの免疫調節タンパク質。

106. 各BIMが、直接的に、またはリンカーを介して間接的に連結され、任意で、リンカーがペプチドリinkerである、態様105の免疫調節タンパク質。

107. リンカーがペプチドリinkerであり、ペプチドリinkerが、

10

20

30

40

50

GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS

(G4S; SEQ ID NO: 593), GSGGGGS (SEQ ID NO: 590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO: 594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO: 595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO: 600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5xGGGGS, SEQ ID NO: 671), GGGGSSA (SEQ ID NO: 596)

、またはそれらの組合せから選択される、態様103または態様106の免疫調節タンパク質。

108. 少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMが、直接的に、またはリンカーを介して間接的に連結され、任意で、リンカーが、ペプチドリンカーおよび/または多量体化部分を含む、態様1~17、18~20、21~23、24~33、39~66および68~107のいずれかの免疫調節タンパク質。

109. リンカーがペプチドリンカーを含み、ペプチドリンカーが、GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO: 593), GSGGGGS (SEQ ID NO: 590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO: 594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO: 595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO: 600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5xGGGGS, SEQ ID NO: 671), GGGGSSA (SEQ ID NO: 596)

、またはそれらの組合せから選択される、態様108の免疫調節タンパク質。

110. リンカーがペプチドリンカーを含み、ペプチドリンカーが、SEQ ID NO: 711 (1xEAAAK)、SEQ ID NO: 712 (2xEAAAK)、SEQ ID NO: 713 (3xEAAAK)、SEQ ID NO: 714 (4xEAAAK)、SEQ ID NO: 715 (5xEAAAK)、SEQ ID NO: 665 (6xEAAAK) から選択される、態様108の免疫調節タンパク質。

111. 免疫調節タンパク質が、単量体であり、および/または単一ポリペプチド鎖を含む、態様1~17、18~20、21~23、24~33、34~66および68~110のいずれかの免疫調節タンパク質。

112. 少なくとも1つのTIMが、ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してアミノ末端側にある、態様111の免疫調節タンパク質。

113. 少なくとも1つのTIMが、ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してカルボキシ末端側にある、態様111の免疫調節タンパク質。

114. 免疫調節タンパク質が、検出可能な標識をさらに含み、任意で、検出可能な標識が、Flagタグ、Hisタグまたはmycタグである、態様1~17、18~20、21~23、24~33、39~66および68~113のいずれかの免疫調節タンパク質。

115. SEQ ID NO: 618~623のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列、を含む、態様1~17、18~20、21~23、24~33、39~64および101~114のいずれかの免疫調節タンパク質。

116. SEQ ID NO: 703~708のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列、を含む、態様18~20、21~23、24~33、39~64および101~113のいずれかの免疫調節タンパク質。

117. リンカーが、多量体化ドメインを含み、多量体化ドメインが、二量体化、三量体化、四量体化または五量体化を促進する、態様108の免疫調節タンパク質。

118. 多量体化ドメインが免疫グロブリンFc領域である、態様108または態様117の免疫調節タンパク質。

119. 二量体である、態様1～16、18～20、21～23、24～33、39～66および68～110 117および118のいずれかの免疫調節タンパク質。

120. 免疫グロブリンFc領域がホモ二量体Fc領域である、態様100および118の免疫調節タンパク質。

121. 免疫グロブリンFc領域がヘテロ二量体Fc領域である、態様100および118の免疫調節タンパク質。

122. 免疫調節タンパク質がホモ二量体であり、二量体の各ポリペプチドが同じである、態様1～16、18～20、21～23、24～33、39～66および68～110ならびに117～120の免疫調節タンパク質。

123. 各ポリペプチドが、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含み、少なくとも1つのTIMが、各ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してアミノ末端側にある、態様122の免疫調節タンパク質。

124. 各ポリペプチドが、少なくとも1つのTIMおよび少なくとも1つのBIMを含み、少なくとも1つのTIMが、各ポリペプチド内で少なくとも1つのBIMに対してカルボキシ末端側にある、態様122の免疫調節タンパク質。

125. 免疫グロブリンFcが、IgG1 Fcドメインであるか、または任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下および/もしくはエフェクター機能の低下を示すバリエーションFcである、態様100、態様118～120および122～124のいずれかの免疫調節タンパク質。

126. 免疫グロブリンFcがIgG1 Fcドメインであり、Fcが、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列を含む、態様100、態様118～120および122～125のいずれかの免疫調節タンパク質。

127. 免疫グロブリンFcが、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエーションIgG1 Fcドメインである、態様100、態様118～120および122～125のいずれかの免疫調節タンパク質。

128. 免疫グロブリンFc領域が、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、およびG237A、またはEUナンバリングによる、アミノ酸置換R292C、N297GおよびV302Cを含む、態様127の免疫調節タンパク質。

129. Fcが、SEQ ID NO:589に記載のアミノ酸配列を含むバリエーションFcである、態様100、態様118～120および122～125、態様127および態様128のいずれかの免疫調節タンパク質。

130. SEQ ID NO:610～617、624～627、637、638、643、644、648、653および654のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列、を含む、態様1～16、18～20、21～23、24～33、39～65および68～110ならびに117～128のいずれかの免疫調節タンパク質。

131. SEQ ID NO:601～609、631～636、645～647、649～652、655～659のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示しかつ活性を保持する配列、を含む、態様1～13、17、65、66、68～110および117～128のいずれかの免疫調節タンパク質。

132. 免疫調節タンパク質がヘテロ二量体であり、二量体の各ポリペプチドが、野生型Fcドメインに1つまたは複数のアミノ酸改変を個別に含む免疫グロブリンFcドメインに連結されて、ポリペプチド間のヘテロ二量体形成をもたらす、態様1～16、18～20、21～23、24～33、39～66、68～110、117～119および121の免疫調節タンパク質。

133. 野生型免疫グロブリンFcがIgG1 Fcドメインである、態様132の免疫調節タンパク質。

134. 前記もう1つのアミノ酸改変が、電荷反発に起因する自己会合を低減または防止

10

20

30

40

50

するために、ノブ・イントゥ・ホール改変および電荷変異から選択される、態様132または態様133の免疫調節タンパク質。

135. 任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性低下のためのおよび/またはエフェクター機能低下のため、1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、態様132~134のいずれかの免疫調節タンパク質。

136. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される、態様135の免疫調節タンパク質。

137. 免疫グロブリンFc領域が、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、G237A、またはEUナンバリングによる、アミノ酸置換R292C、N297GおよびV302Cを含む、態様135または態様136の免疫調節タンパク質。

138. ヘテロ二量体が、SEQ ID NO:662または663に記載のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、SEQ ID NO:660に記載のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む、態様132~137のいずれかの免疫調節タンパク質。

139. 免疫調節タンパク質が、BCMAもしくはTACIに対するAPRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断し、および/または

免疫調節タンパク質が、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、もしくは循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる、態様1~138のいずれかの免疫調節タンパク質。

140. B細胞の成熟、分化、および/または増殖を、低減または阻害する、態様1~138のいずれかの免疫調節タンパク質。

141. 免疫調節タンパク質が、共刺激受容体へのCD80もしくはCD86の結合を遮断し、任意で、共刺激受容体がCD28であり、および/または

免疫調節タンパク質が、T細胞共刺激を低減もしくは阻害する、態様1~17、18~20、21~34、34~6668~134のいずれかの免疫調節タンパク質。

142. 態様1~141のいずれかの免疫調節タンパク質をコードする、核酸分子。

143. 合成核酸である、態様142の核酸分子。

144. cDNAである、態様142または態様143の核酸分子。

145. 態様142~144のいずれかの核酸分子を含む、ベクター。

146. 発現ベクターである、態様145のベクター。

147. 哺乳動物発現ベクターまたはウイルスベクターである、態様145または態様146のベクター。

148. 態様142~144のいずれかの核酸、または態様145~147のいずれかのいずれかのベクターを含む、細胞。

149. 哺乳動物細胞である、態様148の細胞。

150. ヒト細胞である、態様148または態様149の細胞。

151. 免疫調節タンパク質を産生する方法であって、宿主細胞に、態様142~144のいずれかの核酸分子、または態様145~147のいずれかのベクターを、該細胞内で該タンパク質を発現する条件下で導入する工程を含む、方法。

152. 前記細胞から免疫調節タンパク質を単離または精製する工程をさらに含む、態様151の方法。

153. 態様151または態様152の方法によって産生される、免疫調節タンパク質。

154. 態様1~141および153のいずれかの免疫調節タンパク質を含む、薬学的組成物。

155. バリエントBCMAポリペプチドと、Fc領域と、該BCMAポリペプチドと該Fc領域との間のリンカーとを含むバリエントBCMA-Fc融合タンパク質であって、バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:710に記載の位置を基準として、9、10、11、14、16、19、20、22、25、27、29、30、31、32、35、36、39、43、45、46、47および48の中から選択される位置に対応する、非改変BCMAポリペプチドの細胞外ドメイン（ECD）またはその特異的結合断片に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、バリ

10

20

30

40

50

アントBCMA-Fc融合タンパク質。

156. 参照BCMAポリペプチドが、APRIL、BAFF、またはBAFF/APRILヘテロ三量体に結合するBCMAの細胞外ドメインまたはその特異的結合部分からなるポリペプチドである、態様155のバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

157. 参照BCMAポリペプチドが、(i) SEQ ID NO:710に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:710に対して少なくとも95%の37a配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i)もしくは(ii)の一部を含む、態様155または態様156のバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

158. 参照BCMAが、N末端メチオニンを欠く、態様155～157のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

159. 参照BCMAポリペプチドが、(i) SEQ ID NO:356に記載のアミノ酸配列；(ii) SEQ ID NO:356に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(iii) CRDを含む(i)もしくは(ii)の一部を含む、態様155～158のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

160. 参照BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に記載の配列を含む、態様155～159のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

161. 参照BCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:356に記載の配列からなる、態様155～159のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

162. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、S9G, S9N, S9Y, Q10E, Q10P, N11D, N11S, F14Y,

S16A, H19A, H19C, H19D, H19E, H19F, H19G, H19I, H19K, H19L, H19M, H19N, H19P, H19Q, H19R, H19S, H19T, H19V, H19W, H19Y, A20T, I22L, I22V, Q25E, Q25F, Q25G, Q25H, Q25I, Q25K, Q25L, Q25M, Q25S, Q25V, Q25Y, R27H, R27L, S29P, S30G, S30Y, N31D, N31G, N31H, N31K, N31L, N31M, N31P, N31S, N31V, N31Y, T32I, T32S, L35A, L35M, L35P, L35S, L35V, L35Y, T36A, T36G, T36N, T36M, T36S, T36V, R39L, R39Q, A43E, A43S, V45A, V45D, V45I, T46A, T46I, N47D, N47Y, S48G

またはその保存的アミノ酸置換から選択される、態様155～161のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

163. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、19位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、H19A、H19C、H19D、H19E、H19F、H19G、H19I、H19K、H19L、H19M、H19N、H19P、H19Q、H19R、H19S、H19T、H19V、H19W、H19Yから選択される、態様155～162のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

164. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Lを含む、態様155～163のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

165. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Kを含む、態様155～163のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

166. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Rを含む、態様155～163のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

167. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、少なくともアミノ酸置換H19Yを含む、態様155～163のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

168. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、25位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、Q25E、Q25F、Q25G、Q25H、Q25I、Q25K、Q25L、Q25M、Q25S、Q25V、Q25Yから選択される、態様155～167のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

169. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、31位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、N31D、N31G、N31H、N31K、N31L、N31M、N31P

、N31S、N31V、N31Yから選択される、態様155～168のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

170. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、35位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、L35A、L35M、L35P、L35S、L35V、L35Yから選択される、態様155～169のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

171. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、36位に少なくとも1つの置換を含み、任意で、少なくとも1つの置換が、T36A、T36G、T36N、T36M、T36S、T36Vから選択される、態様155～170のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

172. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、

H19Y/S30G; H19Y/V45A; F14Y/H19Y; H19Y/V45D;

10

H19Y/A43E; H19Y/T36A; H19Y/I22V; N11D/H19Y; H19Y/T36M; N11S/H19Y; H19Y/L35P/T46A;

H19Y/N47D; S9D/H19Y; H19Y/S30G/V45D; H19Y/R39Q; H19Y/L35P; S9D/H19Y/R27H;

Q10P/H19Y/Q25H; H19Y/R39L/N47D; N11D/H19Y/N47D; H19Y/T32S; N11S/H19Y/S29P;

H19Y/R39Q/N47D; S16A/H19Y/R39Q; S9N/H19Y/N31K/T46I; H19Y/R27L/N31Y/T32S/T36A;

N11S/H19Y/T46A; H19Y/T32I; S9G/H19Y/T36S/A43S; H19Y/S48G; S9N/H19Y/I22V/N31D;

S9N/H19Y/Q25K/N31D; S9G/H19Y/T32S; H19Y/T36A/N47Y; H19Y/V45A/T46I; H19Y/Q25K/N31D;

H19Y/Q25H/R39Q/V45D; H19Y/T32S/N47D; Q10E/H19Y/A20T/T36S; H19Y/T32S/V45I;

20

H19F/Q25E/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25F/N31S/T36S; H19I/Q25F/N31S/T36V;

H19F/Q25V/N31M/T36S; H19Y/Q25Y/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25I/N31M/L35A/T36S;

H19I/Q25L/N31L/L35Y/T36S; H19F/Q25L/N31G/L35P/T36A; H19Y/I22L/N31G;

H19F/I22V/Q25M/N31P/T36M; H19Y/N31L/L35Y/T36S; H19L/S30G/N31H/L35A;

H19L/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19L/Q25S/S30Y/N31G/L35M/T36V; H19F/Q25F/N31L/L35Y/T36S;

H19F/Q25F/N31S/T36G; H19F/I22V/Q25S/N31V/L35S/T36V; H19F/Q25G/N31S/L35V/T36N;

H19L/Q25H/N31D/L35S; または H19F/Q25F/N31S/L35Y/T36S

30

である、態様155～171のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

173. 1つまたは複数のアミノ酸置換が、S16A/H19Y/R39Qを含む、態様155～163、167および172のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

174. バリエーションBCMAポリペプチドが、参照BCMAポリペプチドと比較して、APRILおよびBAFFの一方または両方に対して増加した結合親和性を有する、態様155～173のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

175. バリエーションBCMAポリペプチドが、APRILに対して増加した結合親和性を有する、態様155～174のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

176. バリエーションBCMAポリペプチドが、BAFFに対して増加した結合親和性を有する、態様155～174のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

40

177. バリエーションBCMAポリペプチドが、APRILおよびBAFFに対して増加した結合親和性を有する、態様155～174のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

178. BAFFまたはAPRILに対する増加した結合親和性が、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍または60倍を超えて独立して増加している、態様174～177のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

179. バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列を含む、態様155～178のいずれかのバリエーションBCMA-Fc融合タンパク質。

180. バリエーションBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:357～435のいずれか1つに記載の配列からなる、または本質的になる、態様155～178のいずれかのバリエーションBCM

50

A-Fc融合タンパク質。

181. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:381に記載の配列からなる、または本質的になる、態様155～178のいずれかのバリエントBCMA-Fc融合タンパク質。

182. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:411に記載の配列からなる、または本質的になる、態様155～178のいずれかのバリエントBCMA-Fc融合タンパク質。

183. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:405に記載の配列からなる、または本質的になる、態様155～178のいずれかのバリエントBCMA-Fc融合タンパク質。

184. バリエントBCMAポリペプチドが、SEQ ID NO:406に記載の配列からなる、または本質的になる、態様155～178のいずれかのバリエントBCMA-Fc融合タンパク質。

185. リンカーがペプチドリンカーを含み、ペプチドリンカーが、GSGGS (SEQ ID NO: 592), GGGGS (G4S; SEQ ID NO: 593), GSGGGGS (SEQ ID NO: 590), GGGGSGGGGS (2xGGGGS; SEQ ID NO: 594), GGGGSGGGGSGGGGS (3xGGGGS; SEQ ID NO: 595), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (4xGGGGS, SEQ ID NO:600), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (5xGGGGS, SEQ ID NO: 671), GGGGSSA (SEQ ID NO: 596)

、またはそれらの組合せから選択される、態様155～184のいずれかのFc融合タンパク質。

186. 二量体である、態様155～185のいずれかのFc融合タンパク質。

187. 免疫グロブリンFc領域がホモ二量体Fc領域である、態様155～186のいずれかのFc融合タンパク質。

188. 免疫グロブリンFcが、IgG1 Fcドメインであるか、または任意で野生型IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下および/もしくはエフェクター機能の低下を示すバリエントFcである、態様155～187のいずれかのFc融合タンパク質。

189. 免疫グロブリンFcがIgG1 Fcドメインであり、Fcが、SEQ ID NO:597に記載のアミノ酸配列を含む、態様155～188のいずれかのFc融合タンパク質。

190. 免疫グロブリンFcが、EUナンバリングによるL234A、L234V、L235A、L235E、G237A、S267K、R292C、N297GおよびV302Cから選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含むバリエントIgG1 Fcドメインである、態様155～188のいずれかのFc融合タンパク質。

191. 免疫グロブリンFc領域が、EUナンバリングによる、アミノ酸置換L234A、L235E、G237A、またはEUナンバリングによる、アミノ酸置換R292C、N297GおよびV302Cを含む、態様190のFc融合タンパク質。

192. 免疫グロブリンFcが、SEQ ID NO:586に記載されている、態様155～191のいずれかのFc融合タンパク質。

193. Fcが、SEQ ID NO:589に記載のアミノ酸配列を含むバリエントFcである、態様155～192のいずれかのFc融合タンパク質。

194. 二量体である、態様155～193のいずれかのFc融合タンパク質。

195. ホモ二量体である、態様155～194のいずれかのFc融合タンパク質。

196. Fc融合タンパク質が、APRILおよびBAFFを中和する、態様155～195のいずれかのFc融合タンパク質。

197. APRILを中和するためのIC50が、100pM未満、50pM未満、40pM未満、30pM未満、20pM未満、10pM未満、5pM未満もしくは1pM未満であるか、もしくは前述のいずれかの間の任意の値であり、および/または

10

20

30

40

50

BAFFを中和するためのIC50が、400pM未満、300pM未満、200pM未満、100pM未満、75pM未満、50pM未満、25pM未満もしくは10pM未満であるか、もしくは前述のいずれかの間の任意の値である、

態様155～196のいずれかのFc融合タンパク質。

198. Fc融合タンパク質が、BCMAもしくはTACIに対するAPRIL、BAFF、もしくはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の結合を遮断し、および/または

Fc融合タンパク質が、対象に投与した後の血液中の循環APRIL、循環BAFF、もしくは循環APRIL/BAFFのレベルを低下させる、

態様155～196のいずれかのFc融合タンパク質。

199. 免疫調節タンパク質が、B細胞の成熟、分化、および/または増殖を、低減または阻害する、態様155～198のいずれかのFc融合タンパク質。

200. 態様155～199のいずれかのFc融合タンパク質をコードする、核酸分子。

201. 合成核酸である、態様200の核酸分子。

202. cDNAである、態様200または態様201の核酸分子。

203. 態様200～202のいずれかの核酸分子を含む、ベクター。

204. 発現ベクターである、態様203のベクター。

205. 哺乳動物発現ベクターまたはウイルスベクターである、態様203または態様204のベクター。

206. 態様200～202のいずれかの核酸、または態様203～205のいずれかのいずれかのベクターを含む細胞。

207. 哺乳動物細胞である、態様206の細胞。

208. ヒト細胞である、態様206または態様207の細胞。

209. Fc融合タンパク質を産生する方法であって、宿主細胞に、態様200～202のいずれかの核酸分子、または態様203～205のいずれかのベクターを、該細胞内で該タンパク質を発現する条件下で導入する工程を含む、方法。

210. 該細胞からFc融合タンパク質を単離または精製する工程をさらに含む、態様209の方法。

211. 態様209または態様210の方法によって産生される、Fc融合タンパク質。

212. 態様155～199および211のいずれかのFc融合タンパク質を含む、薬学的組成物。

213. 薬学的に許容される賦形剤を含む、態様154または態様212の薬学的組成物。

214. 無菌である、態様154、212および213のいずれかの薬学的組成物。

215. バイアルまたは容器内に、態様154および212～214のいずれかの薬学的組成物を含む、製造物品。

216. バイアルまたは容器が密封される、態様215の製造物品。

217. 態様154および212～214のいずれかの薬学的組成物と、使用説明書とを備える、キット。

218. 態様215または態様216の製造物品と、使用説明書とを備える、キット。

219. 対象の免疫応答を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、態様1～141または153のいずれかの免疫調節タンパク質を投与する工程を含む、方法。

220. 対象の免疫応答を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、態様155～199および211のいずれかのFc融合タンパク質を投与する工程を含む、方法。

221. 対象の免疫応答を低下させる方法であって、それを必要とする対象に、態様154および211～214のいずれかの薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

222. B細胞免疫応答が対象において低下し、それにより、B細胞の成熟、分化、および/または増殖が、低減または阻害される、態様219～221のいずれかの方法。

223. APRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の循環レベルが、対象において低下する、態様219～222のいずれかの方法。

224. 対象におけるAPRIL、BAFF、またはAPRIL/BAFFヘテロ三量体の循環レベルを低下させる方法であって、態様155および211～214のいずれかの薬学的組成物を対

10

20

30

40

50

象に投与する工程を含む、方法。

225. T細胞免疫応答が対象において低下し、それにより、T細胞共刺激が低減または阻害される、態様128または態様221の方法。

226. 免疫応答を低下させることにより、対象における疾患または状態が処置される、態様219～225のいずれかの方法。

227. 対象における疾患または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、態様1～141または153のいずれかの免疫調節タンパク質を投与する工程を含む、方法。

228. 対象における疾患または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、請求項155～199のいずれかのFc融合タンパク質を投与する工程を含む、方法。

229. 対象における疾患または状態を処置する方法であって、それを必要とする対象に、態様154および211～214のいずれかの薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

230. 疾患または状態が、自己免疫疾患、B細胞がん、抗体によって媒介される病態、腎疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病またはウイルス感染である、態様224～227のいずれかの方法。

231. 疾患または状態が、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、強皮症、多発性硬化症、糖尿病、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、IgA腎症、視神経炎、アミロイドーシス、抗リン脂質抗体症候群（APS）、多腺性自己免疫症候群II型（APS II）、自己免疫性甲状腺疾患（AITD）、グレーブス病、自己免疫性副腎炎および尋常性天疱瘡からなる群より選択される自己免疫疾患である、態様230の方法。

232. 疾患または状態がB細胞がんであり、該がんが骨髄腫である、態様230の方法。

【実施例】

【0585】

X. 実施例

以下の実施例は単に例示目的で含まれ、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0586】

実施例1. T細胞阻害性分子(TIM)としてのバリエーションCTLA-4細胞外ドメインポリペプチドの作製および評価

本実施例は、T細胞刺激性受容体のリガンドに結合する、(例えば、野生型と比較して増大した)親和性改変(バリエーション)CTLA-4ポリペプチドを操作および特定するための方法を含む、B細胞阻害性分子(BIM)と共に提供される、マルチドメイン免疫調節タンパク質の一部として用いられる例示的なCTLA-4ポリペプチドT細胞阻害性分子(TIM)について説明する。

【0587】

酵母ディスプレイライブラリーとして酵母表面に翻訳および発現させるために、ヒトCTLA-4 IgSFドメインの変異DNA構築物を作製した。

【0588】

以下:

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMMGNEL
TFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGNGTQIYVIDPEPCPD
SD (SEQ ID NO:1)

のSEQ ID NO:1に示した野生型ヒトCTLA-4配列に基づいて、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)ドメインを含有するCTLA-4の細胞外ドメイン(ECD)のバリエーション(CTLA-4 vIgD)を特定するためにアミノ酸のランダム置換を含有するライブラリーを構築した。

【0589】

野生型CTLA-4 ECDをコードするDNAを、改変酵母ディスプレイベクターpBYDS03(

10

20

30

40

50

Life Technologies, USA)のBamHI部位とKpnI部位の間にクローニングした。変異は、MnCl₂を加えたGenemorph II Kit(Agilent, USA)を利用し、BamHIおよびKpnIクローニング部位を越えて、かつこれらを含む、pBYDS03クローニングベクターと40 bp重複するECD特異的オリゴヌクレオチドを用いたエラープローンPCRによって導入した。変異誘発DNA PCR産物をアガロースゲル電気泳動によって精製し、次いで、OneTaq 2x PCR Master Mix(New England Biolabs, USA)を用いて100ngの変異誘発PCR産物を用いてさらに増幅した。2回目のPCRからの産物を、アガロースゲル電気泳動とPCR-ゲル精製(Qiagen, Germany)によって精製し、滅菌脱イオン水に再懸濁した。後の各酵母エレクトロポレーションのために合計12 µgのPCR産物を作製した。

【0590】

ライブラリー挿入用に調製するために、pBYDS03ベクターをBamHIおよびKpnI制限酵素(New England Biolabs, USA)で消化し、大きなベクター断片をゲル精製し、滅菌脱イオン水に溶解した。12 µgのライブラリーDNAインサートを4 µgの直線化ベクターと総体積50 µLの滅菌脱イオン水中で混合することによって、次の工程のためにエレクトロポレーションの準備のできたDNAを作製した。

【0591】

エレクトロポレーションを用いてCTLA-4 DNAライブラリーを酵母に導入した。簡単に言うと、酵母BJ5464株(ATCC.org; ATCC番号208288)のエレクトロポレーションコンピテント細胞を調製し、本質的に(Colby, D.W. et al. 2004 Methods Enzymology 388, 348-358)に記載のように、上記の工程に由来するエレクトロポレーションの準備のできたDNAと共にGene Pulser II(Biorad, USA)によって電気穿孔した。唯一の例外は、改変プラスミドpBYDS03が保有するLEU2選択マーカーに対応するために非誘導性最小選択SCD-Leu培地中で形質転換細胞を増殖させたことであった。1リットルのSCD-Leu培地を、14.7グラムのクエン酸ナトリウム、4.29グラムのクエン酸一水和物、20グラムのデキストロース、6.7グラムのイーストナイトロジェンベース、およびロイシンを含まない1.6グラムの酵母合成ドロップアウト培地サプリメント(yeast synthetic drop-out media supplement without leucine)を用いて作製した。使用前に、培地を0.22 µm減圧フィルター装置を用いて濾過滅菌した。

【0592】

ライブラリーサイズは、新鮮に回収した細胞の段階希釈液をSCD-Leu寒天プレート上にプレートし、次いで、1プレートあたり少なくとも50個のコロニーを生じたプレティングからのシングルコロニー数からライブラリーサイズを外挿することによって求めた。一般的に、ライブラリーサイズは、この希釈アッセイに基づいて $1.0 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個の形質転換体であった。電気穿孔した培養物の残りを、SCD-Leu中で、飽和するまで増殖させ、非形質転換細胞の画分を最小にするために、この培養物からの細胞をもう1回、新鮮なSCD-Leuに継代培養し(例えば、1/100)、一晚増殖させた。ライブラリー多様性を維持するために、この継代培養工程は、ライブラリーサイズ計算値よりも少なくとも10倍多い細胞を含有する接種材料を用いて行った。2回目の飽和培養物からの細胞を、滅菌した25%(重量/体積)グリセロールを含有する新鮮培地に 1×10^{10} /mLの密度まで再懸濁し、凍結し、-80°Cで保管した(凍結ライブラリーストック)。

【0593】

CTLA-4 IgDの親和性改変バリエーションを発現する酵母をICOSLおよび/またはCD86に対して選択した。推定ライブラリーサイズの少なくとも10倍に等しい数の細胞を個々のライブラリーストックから解凍し、非誘導SCD-Leu培地に 1.0×10^6 細胞/mLまで懸濁し、一晚増殖させた。翌日、ライブラリーサイズの10倍に等しい数の細胞を2000RPMで2分間遠心分離し、誘導SCDG-Leu培地に 5.0×10^6 細胞/mLまで再懸濁した。1リットルのSCDG-Leu誘導培地は、水に溶解した、5.4グラムのNa₂HPO₄、8.56グラムのNaH₂PO₄・H₂O、20グラムのガラクトース、2.0グラムのデキストロース、6.7グラムのイーストナイトロジェンベース、およびロイシンを含まない1.6グラムの酵母合成ドロップアウト培地サプリメントからなり、0.22 µm膜フィルター装置で滅菌された。酵母細胞

10

20

30

40

50

表面でライブラリータンパク質発現を誘導するために、培養物を室温で1日、誘導培地中で増殖させた。

【0594】

非結合剤を低減し、ICOSLまたはCD86に結合する能力があるバリエーションCTLA-4分子を濃縮するために、ICOSLまたはCD86が交互に充填される磁気ビーズを用いて、誘導された酵母ライブラリーを4サイクルのビーズソートにかけた。それぞれの選択サイクルの後に、磁気ビーズに結合することで保持された酵母をSCD培地中で増殖させることで増幅し、その後にSCDG培地中で一晚誘導した。予備選択後に、改善した結合剤を示す酵母細胞画分を濃縮するために1回目にICOSL-Fcを用いて、2回目にCD86-Fcを用いて2回の蛍光標識細胞分取(FACS)を行った。磁気ビーズによる濃縮とフローサイトメトリーによる選択を、本質的にMiller et al., Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008に記載のように行った。

10

【0595】

この選択プロセスでは以下の試薬と機器を利用した。ヒトrICOSL-Fc(すなわち、組換えICOSL-Fc融合タンパク質)とヒトrCD86-Fc標的リガンドタンパク質をR&D Systems, USAから購入した。磁気プロテインAビーズはNew England Biolabs, USAから入手した。二色フローサイトメトリーソーティングのために、Bio-Rad S3eソーターを使用した。CTLA-4ディスプレイレベルを、Alexafluor488標識抗ヘマグルチニン抗体(Life Technologies, USA)を用いてモニタリングした。Fc融合タンパク質、rICOSL-Fc、またはrCD86-Fcのリガンド結合を、PE結合ヒトIg特異的ヤギFab(Jackson ImmunoResearch, USA)を用いて検出した。ダブレット酵母を、前方散乱光(FSC)/側方散乱光(SSC)パラメータを用いてゲートアウトした。ソートゲートは、FL1において、限定されたタグ発現結合をもつ、FL2において検出された高いリガンド結合に基づいた。

20

【0596】

フローサイトメトリーソートからの酵母アウトプットを、さらに高い特異的結合親和性があるかどうかアッセイした。ソートアウト酵母を拡大し、ソートアウト酵母がコードしている特定のIgSF親和性改変ドメインバリエーションを発現するように再誘導した。次いで、この集団を、親野生型酵母株またはフローサイトメトリーによる、ビーズアウトプット酵母集団などの他の選択されたアウトプットと比較した。

【0597】

2回目のFACS後に、アウトプットを段階希釈し、シングルクローンを単離できるようにSCD-寒天上にプレートした。288個のコロニーをつついて、カナマイシン、ペニシリン、およびストレプトマイシンを加えたSCD培地150 μ Lを含有する丸底マイクロタイタープレートの中に入れた。プレートを振盪しながら30°Cでインキュベートした。4時間増殖させた後に80 μ Lを新しいプレートのウェルに移し、細胞を遠心沈殿し、SCDを除去し、抗生物質を加えたSCDG誘導培地200 μ Lを各ウェルに添加した後に、振盪しながら室温で一晩インキュベートした。FACS分析を用いて、各クローンとrICOSL-Fc、rCD86-Fc、および発現の対照である抗HA Mabとの結合を独立して評価した。各プレート上には、野生型CTLA-4を有する酵母の対照ウェルを設けた。下記のようにFc融合構築物に再形式化され、配列決定されるように16個のクローンを選択した。

40

【0598】

16個の酵母クローンの配列分析から、1つの顕性の変異組合わせ(L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L; SEQ ID NO:3)が明らかになった。さらなるクローン多様性を生じさせ、結合の強化に必要とされる最小変異を決定するために、このクローンにある変異を野生型配列と部分的にシャッフルした。簡単に言うと、ECDコード領域を3分の1ずつに分けた3対のPCRプライマーを設計した。後のGibson Assemblyクローニングを容易にするために、これらのPCRプライマーは、隣接しているPCR産物と20bp重複配列を維持した。野生型(A₁、B₁、C₁)と変異テンプレート(A₂、B₂、C₂)の両方から3つのPCR産物を作製した。Gibson Assembly Mastermix(New England Biolabs, USA)を用いてインビトロ組換えを行うために、3つのPCR産物の組合わせ、例えば、A₂、B₁、C₁;A

50

2、B₂、C₁などを改変Fc融合ベクターと混合し、その後に、熱ショック形質転換によって大腸菌株NEB(登録商標)5-αに導入するのに使用した。このように野生型配列とシャッフリングすることによってSEQ ID NO:4-10が得られた。

【0599】

別のランダム変異ライブラリーを、テンプレートとしてGen1選択からのクローンを用いたエラーブローンPCRによって作製した。このライブラリーはGen2と呼ばれ、テンプレートDNAが野生型CTLA-4 ECD DNAではなくGen1クローンプールで構成されていた以外は以前に述べられたのと同じプロセスを用いて構築された。複数のクローンプールを作製するために、rICOSL-FcとrCD86-Fcを交互に入れ替えるFACSソーティングを繰り返し行うことによって酵母ライブラリーをスクリーニングした。前と同じように、FACSによって、結合したかどうか酵母プールを分析した。FACSによるrICOSL-Fc、rCD86-Fc、rCD80-Fcとの結合に基づいて、FcベクターへのPCRクローニングのために、いくつかのプールを選択した。Gen1について述べたように後の配列分析とタンパク質産生を行った。

【0600】

選択アウトプットを、Fc分子と融合したCTLA-4の親和性改変(バリエーション)ECDを含有する免疫調節タンパク質(バリエーションECD-Fc融合分子)として再形式化した。少なくとも1つの親和性改変ドメインがあるCTLA-4のECDを含有するFc融合タンパク質(例えば、バリエーションCTLA-4 ECD-Fc)である組換え免疫調節タンパク質を作製するために、以下:バリエーション(変異)ECD、続いて7アミノ酸リンカー(GSGGGGS; SEQ ID NO:590)、続いてEUナンバリングによる、変異L234A、L235E、およびG237Aを含有するヒトIgG1 Fc、の通りにタンパク質をコードするように、コードDNAを作製した。この構築物は、システインと共有結合を形成することができる抗体軽鎖を全く含まないので、ヒトIgG1 Fcは、EUナンバリングによる位置220にあるシステイン残基からセリン残基への交換(C220S)(SEQ ID NO:586に示した野生型または未改変Fcを基準として位置5(C5S)に対応する)も含んだ。このFc領域はまた、通常、野生型ヒトIgG1定常領域遺伝子にコードされている位置447(SEQ ID NO:586に示した野生型または未改変Fcの位置232に対応する)のC末端リジンも無かった(K447delと名付けられた)。融合構築物中にあるエフェクターレス(不活性)IgG1 FcをSEQ ID NO:589に示した。

SEQ ID NO: 589

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【0601】

最終フローサイトメトリーCTLA-4ソートからのアウトプット細胞をSCD-Leu培地中で最終密度まで増殖させた。それぞれのアウトプットからのプラスミドDNAを、酵母プラスミドDNA単離キット(Zymoresearch, USA)を用いて単離した。Fc融合のために、選抜されたFc融合ベクターにクローニングするのに適した制限部位が付加されたPCRプライマーを用いて、プラスミドDNAプレップから変異標的ECDのコードDNAをバッチ増幅した。制限消化後にPCR産物を適切なFc融合ベクターと連結した後に、供給業者によって指示されたように熱ショック形質転換によってXL1-Blue大腸菌株(Agilent, USA)またはNEB(登録商標)5-α(New England Biolabs)に導入した。または、Gibson Assembly Mastermix(New England Biolabs, USA)を用いてインビトロ組換えを行うために、アウトプットを、両端に40bp重複領域を含有するプライマーと改変Fc融合ベクターを用いてPCR増幅し、その後に、熱ショック形質転換によって大腸菌株NEB(登録商標)5-αに導入するのに使用した。例示的なFc融合ベクターはpFUSE-hIgG1-Fc2(In vivoGen, USA)である。

【0602】

選択用のシングルコロニーを単離するために、形質転換反応の希釈液を、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ カルベニシリン(Teknova, USA)を含有するLB-寒天にプレートした。次いで、各形質転換から、最大96個のコロニーを、LB-ブロス(カタログ番号L8112, Teknova, USA)が入っている96ウェルプレートの中で、飽和するまで 37°C で一晩増殖させ、全てのクローンにある変異を特定するために、ECDインサートDNA配列決定のために各ウェルから小さなアリコートを提供した。DNA配列決定用の試料調製を、サービス提供者(Genewiz; South Plainfield, NJ)によって提供されたプロトコルを用いて行った。DNA配列決定用の試料を取り出した後に、グリセロールを、25%の最終グリセロール含有率になるように、残っている培養物に添加し、マスタープレートとして将来使用するためにプレートを -20°C で保管した(以下を参照されたい)。または、使い捨て96ウェルレプリケーター(VWR, USA)を用いて、増殖させた液体培養物から固体寒天プレートにレプリカプレティングすることによってDNA配列決定用の試料を作製した。これらのプレートを一晩インキュベートしてグロースパッチ(growth patch)を作製し、DNA配列決定のためにプレートをGenewizに仕様に従って供した。

【0603】

Genewizによって作成されたDNA配列決定データを分析した後に、関心対象のクローンをマスタープレートから回収し、個々に、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ カルベニシリン(Teknova, USA)を含有する液体LB-ブロス5mLの中で、飽和するまで増殖させ、次いで、PureYield Plasmid Miniprep System(Promega, USA)などの標準的なキットを用いて各クローンの約 $10\text{ }\mu\text{g}$ のミニプレッププラスミドDNAを調製するために2mLの各培養物を使用した。一般的に、関心対象のクローンの特定は以下の工程を伴った。最初に、DNA配列データファイルをGenewizウェブサイトからダウンロードした。次いで、全ての配列がECDコード領域の始まりで開始するように手作業で精選した。Ugeneソフトウェア(<http://ugene.net>)を用いて、アラインメントを生じるようにGenewiz配列を処理した。

【0604】

次いで、以下の判断基準:(1)アラインメント中に同一のクローンが少なくとも2回生じることと、(2)アラインメント中に、好ましくは別個のクローンに変異が少なくとも2回生じることを用いて、関心対象のクローンを特定した。これらの判断基準の少なくとも1つを満たしたクローンは、十中八九、結合が改善したために、ソーティングプロセスによって濃縮された。

【0605】

CTLA-4のバリエーションECDを含有するFc融合タンパク質をハイスループット発現と精製によって作製した。組換えバリエーションFc融合タンパク質を、Expi293発現系(Invitrogen, USA)を用いて、懸濁液に適合したヒト胎児由来腎臓(HEK)293細胞から産生した。 $4\text{ }\mu\text{g}$ の各プラスミドDNAを $200\text{ }\mu\text{L}$ のOpti-MEM(Invitrogen, USA)に添加し、これと同時に $10.8\text{ }\mu\text{L}$ のExpiFectamineを、別々に、別の $200\text{ }\mu\text{L}$ のOpti-MEMに添加した。5分後に $200\text{ }\mu\text{L}$ のプラスミドDNAを $200\text{ }\mu\text{L}$ のExpiFectamineと混合し、さらに20分間、さらにインキュベートした後に、この混合物を細胞に添加した。 1000 万個のExpi293細胞を、4mLの体積のExpi293培地(Invitrogen, USA)が入っている滅菌 10 mL コニカルボトムディープ24ウェルグロースプレート(Thomson Instrument Company, USA)の別々のウェルに分配した。プレートを、95%湿度と8% CO_2 に設定した哺乳動物細胞培養インキュベーターに入れて 120 RPM で5日間振盪した。5日間インキュベートした後に細胞をペレット化し、培養上清を除去した。

【0606】

ハイスループット96ウェルプロテインA精製キットを用いて製造業者のプロトコル(カタログ番号45202, Life Technologies, USA)を用いて上清からタンパク質を精製した。結果として生じた溶出画分を、Zeba 96-well spin desalting plate(Catalog number 89807, Life Technologies, USA)を用いて、製造業者のプロトコルを用いてPBSに対してバッファー交換した。精製されたタンパク質を、Nanodrop機器(The

rmo Fisher Scientific, USA)によって測定した280nm吸光度を用いて定量した。タンパク質純度を、5 µgのタンパク質を変性条件下および還元条件下でNUPAGEプレキャストポリアクリルアミドゲル(Life Technologies, USA)上にロードし、その後にゲル電気泳動することによって評価した。標準的なクーマシー染色を用いてゲル中にあるタンパク質を可視化した。

【0607】

選択によって特定された、選択されたCTLA-4 vlgDにあるアミノ酸置換を表3に示した。Fc融合タンパク質として整えられた、選択されたCTLA-4 vlgDを、下記のように結合と機能活性について試験した。

【0608】

A. 機能的特徴付け

結合パートナーCD80、CD86、およびICOSLに対するCTLA-4 vlgD-Fc融合タンパク質の特異性と親和性を評価するために結合研究を行った。さらに、ヒト初代T細胞インビトロアッセイにおいて生理活性があるかどうかFc-融合バリエーションタンパク質を特徴付けた。

【0609】

1. 結合

結合パートナーを発現する細胞を生成するために、pcDNA3.1発現ベクター(Life Technologies)の中に、ヒトCD80、CD86、およびICOSLのそれぞれについて完全長哺乳動物表面発現構築物を設計した。これらはGenscript, USAから調達した。結合研究を、上記のExpi293F一過的トランスフェクション系(Life Technologies, USA)を用いて行った。実験に必要な細胞数を求め、適切な30mLスケールのトランスフェクションを製造業者が推奨するプロトコルを用いて行った。それぞれのカウンター構造またはモック30mLトランスフェクションのために、7500万個のExpi293F細胞を、30 µgの発現構築物DNAおよび1.5mLの希釈したExpiFectamine293試薬と、48時間インキュベートし、この時点で染色のために細胞を収集した。

【0610】

フローサイトメトリー分析のために、200,000個の細胞の適切な一過的トランスフェクションまたは陰性対照を96ウェル丸底プレートにプレートした。細胞を遠心沈殿させ、非特異的結合をブロックするために染色用緩衝液(PBS(リン酸緩衝食塩水)、1% BSA(ウシ血清アルブミン)、および0.1% アジ化ナトリウム)に20分間懸濁した。その後に細胞を再度、遠心分離し、50 µL中に100nM~100pMのCTLA-4 IgSFバリエーションFc融合タンパク質を含有する染色用緩衝液に懸濁した。一次染色を45分間行った後に、染色用緩衝液で細胞を2回洗浄した。CD86トランスフェクションについては、50 µLの染色用緩衝液で1:150希釈したPE結合抗ヒトFc(Jackson ImmunoResearch, USA)を用いて、30分間インキュベートし、結合したタンパク質を検出した。CD80トランスフェクションおよびICOSLトランスフェクションのために、結合したタンパク質を、50 µL染色用緩衝液で1:130希釈した抗CTLA-4抗体(Biolegend, USA)によって捕捉した。30分間インキュベートした後に細胞を2回洗浄し、50 µLで1:150希釈したPE結合抗マウスFc(Jackson ImmunoResearch, USA)を用いて、さらに30分間インキュベーションして、検出した。結合しなかった結合抗体を除去するために細胞を2回洗浄し、2%ホルムアルデヒド/PBSで固定し、FACScan(Becton Dickinson, USA)またはHypercytフローサイトメーター(Intellicyte, USA)で分析した。

【0611】

各トランスフェクタントと陰性親株の平均蛍光強度(MFI)を、Cell Quest Proソフトウェア(Becton Dickinson, USA)またはForcyteソフトウェア(Intellicyt, USA)を用いて計算した。

【0612】

2. 抗CD3共刺激アッセイにおけるサイトカイン産生

可溶性CTLA-4-Fc生理活性を、ヒト混合リンパ球反応(MLR)において試験した。PB

10

20

30

40

50

MC(BenTech Bio, USA)から単離した単球を、インビトロで、Ex-Vivo 15培地(Lonza, Switzerland)に溶解した50ng/mL rIL-4(R&D Systems, USA)および80ng/mL rGM-CSF(R&D Systems, USA)と共に7日間培養することによって、ヒト初代樹状細胞(DC)を作製した。3日目および5日目に培地の半分を除去し、50ng/mL rIL-4および80ng/mL rGM-CSFを含有する新鮮培地と交換した。DC成熟を完全に誘導するために、6日目にDC培養物に100ng/mLのリポ多糖(LPS)(InvivoGen Corp., USA)を添加し、細胞をさらに24時間インキュベートした。最終体積200μlのEx-Vivo 15培地が入っている96ウェル丸底プレートの中で、約10,000個の成熟DCと100,000個の精製された同種異系CD3+T細胞(BenTech Bio, USA)を、CTLA-4バリエーションFc融合タンパク質および対照と共培養した。4~5日目に培養上清中のIFN-γ分泌を、Human IFN-γ gamma Duo-set ELISA kit(R&D Systems, USA)を用いて分析した。光学密度をBioTek Cytation Multimode Microplate Reader(BioTek Corp., USA)で測定し、IFN-γ Duo-set kit(R&D Systems, USA)に入っている滴定済みrIFN-γ標準に対して定量した。

10

【0613】

3. 結果

バリエーションおよび未改変CTLA-4ポリペプチドを対象にした上記の結合アッセイおよび共刺激生理活性アッセイの結果を表E1~E3にまとめた。各実験について、未改変CTLA-4ポリペプチドの対応する結合および分泌と比較した時の相対比(ΔWT)に加えて、CD80、CD86、およびICOSLに結合した値(MFI)とインターフェロン-γ分泌の値[pg/mL]を示した。0.1よりかなり小さかった結合の相対比は0と報告した。さらに、バリエーションがインターフェロンγ分泌を検出可能なレベルまで抑制したバリエーションのMLRデータも0と報告した。

20

【0614】

(表E1)バリエーションCTLA-4-Fcポリペプチドの結合および共刺激生理活性

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	IFN-γ [pg/mL] (ΔWT)
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L	3	829 (0.2)	761890 (1.1)	873 (0.5)	216 (0.3)
L12P/A26T	5	1024 (0.2)	276276 (0.4)	928 (0.6)	850 (1.3)
L12P/A26T/L63P	6	2400 (0.5)	500345 (0.7)	891 (0.5)	671 (1.0)
L63P/L98Q/Y105L	7	4718 (1.0)	410571 (0.6)	1802 (1.1)	124 (0.2)
L98Q/Y105L	8	3863 (0.8)	685365 (1.0)	1186 (0.7)	124 (0.2)
L63P	9	3932 (0.8)	595807 (0.8)	966 (0.6)	261 (0.4)
L98R/N110K	10	2110 (0.4)	665012 (0.9)	1046 (0.6)	344 (0.5)
WT CTLA-4	1	4775 (1.0)	708753 (1.0)	1664 (1.0)	662 (1.0)

30

40

【0615】

(表E2)バリエーションCTLA-4-Fcポリペプチドの結合および共刺激生理活性

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN- γ [pg/mL] (Δ WT)
L12P/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	11	2026 (0.4)	33068 (0.9)	1222 (0.7)	569 (1.5)
E33M/Q82H/L98Q/M99L/Y105L	12	1098 (0.2)	35506 (1.0)	1792 (1.1)	253 (0.7)
L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	13	2591 (0.5)	33477 (0.9)	1604 (1.0)	586 (1.6)
S14N/R16C/I18T/M56K/T61A/L63P/A86T/M99L	14	3773 (0.8)	30572 (0.8)	990 (0.6)	441 (1.2)
S27P/M56K/L63P/S72G/S73R/T89A/M99L/Y105L/I117M	15	1982 (0.4)	33467 (0.9)	1354 (0.8)	426 (1.1)
M56K/L63P/N75D/V96I/M99L/Y105L/L106I	16	3775 (0.8)	31296 (0.9)	1719 (1.0)	583 (1.6)
L63P/S72G/Y105L	17	3831 (0.8)	32160 (0.9)	1362 (0.8)	123 (0.3)
L63P/L98Q/M99L/Y105L/I117M	18	2635 (0.6)	32564 (0.9)	1761 (1.1)	539 (1.4)
L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L	19	2463 (0.5)	32830 (0.9)	1930 (1.2)	603 (1.6)
A26T/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	20	3576 (0.7)	31549 (0.9)	939 (0.6)	83 (0.2)
L63P/L98Q/V116A	21	2772 (0.6)	32657 (0.9)	1033 (0.6)	298 (0.8)
G29W/L98Q/M99L/Y105L	22	1772 (0.4)	32977 (0.9)	6183 (3.7)	745 (2.0)
T37S/M56V/L98Q/Y105L	23	2115 (0.4)	27628 (0.8)	881 (0.5)	148 (0.4)
A26T/Y54F/M56K/M99L/Y105L	24	1526 (0.3)	28149 (0.8)	1113 (0.7)	552 (1.5)
L12P/I18T/A26T/M55T/T69S/S72G/M99L/Y105L	25	1577 (0.3)	25936 (0.7)	931 (0.6)	944 (2.5)
V22I/L63P/L98Q/Y105L/I117M	26	2802 (0.6)	27629 (0.8)	1013 (0.6)	103 (0.3)
A26T/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	27	2899 (0.6)	26407 (0.7)	1759 (1.1)	195 (0.5)
I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/P102L/Y105L	190	1140 (0.2)	46974 (1.3)	935 (0.6)	714 (1.9)
E33M/A42T/L98Q/Y105L	28	1623 (0.3)	27354 (0.7)	1675 (1.0)	638 (1.7)
M55T/E97Q/M99L/Y105F	29	906 (0.2)	6249 (0.2)	1037 (0.6)	575 (1.5)
M55T/S72G/L98Q/M99L/Y105L	30	1940 (0.4)	30594 (0.8)	2313 (1.4)	594 (1.6)
R16C/G29W/E33V/M55T/L63P/L98Q/Y105L	31	2678 (0.6)	28858 (0.8)	1480 (0.9)	144 (0.4)
L12P/A26T/L63P/L98Q/Y105L/L106I	32	2318 (0.5)	28463 (0.8)	879 (0.5)	127 (0.3)

10

20

30

40

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN- γ [pg/mL] (Δ WT)
M56L/L63P/L98Q/Y105L/ L106I/I117L	33	3487 (0.7)	32054 (0.9)	963 (0.6)	72 (0.2)
S15P/I18V/M56T/L98Q/M 99L/Y105L	34	1445 (0.3)	33793 (0.9)	1505 (0.9)	622 (1.7)
I18T/G29W/L63P/L98Q/Y 105L	35	10109 (2.1)	29367 (0.8)	1711 (1.0)	50 (0.1)
L63P/Q82H/L98Q/M99L/ Y105L	36	2777 (0.6)	31740 (0.9)	2110 (1.3)	723 (1.9)
L98Q/M99L/Y105L/L106I/ I117T	37	1117 (0.2)	28174 (0.8)	1081 (0.6)	944 (2.5)
L98Q/M99L/Y105L/L106I/ Y115N	38	1074 (0.2)	27514 (0.7)	939 (0.6)	322 (0.9)
M55T/L63P/T71I/M99L/Y 105L	39	2900 (0.6)	24010 (0.7)	1125 (0.7)	384 (1.0)
A26T/T53S/M56K/L63P/L 98Q/Y105L	40	3352 (0.7)	23688 (0.6)	1042 (0.6)	88 (0.2)
I18T/A26T/L63P/Q82R/L9 8Q/Y105L	41	3650 (0.8)	26133 (0.7)	923 (0.6)	105 (0.3)
L12H/M55T/E59D/L63P/ M99L	42	2877 (0.6)	26206 (0.7)	876 (0.5)	619 (1.7)
I18T/L63P/S72G/L98Q/Y1 05L/I108V	43	2706 (0.6)	26196 (0.7)	960 (0.6)	62 (0.2)
I18T/L63P/S72G/L98Q/M9 9L/Y105L	44	2442 (0.5)	29111 (0.8)	2489 (1.5)	817 (2.2)
T61A/L63P/S72G/L98Q/M 99L/Y105L	45	2505 (0.5)	32390 (0.9)	1987 (1.2)	944 (2.5)
V38I/L63P/S72G/L98Q/M 99L/Y105L	46	3433 (0.7)	33373 (0.9)	2410 (1.4)	846 (2.3)
L63P/S72G/I93L/L98Q/M9 9L/Y105L	47	3282 (0.7)	32885 (0.9)	2277 (1.4)	897 (2.4)
L12I/M55T/M56V/I67T/M 99L/L106R/I108F	48	2917 (0.6)	31744 (0.9)	2485 (1.5)	842 (2.3)
I18N/A26T/L63H/T89A/L 98Q/M99L/Y105L	49	1943 (0.4)	31558 (0.9)	2175 (1.3)	689 (1.8)
I18T/E48R/L63P/T69S/L9 8Q/Y105L/N110Y	50	1086 (0.2)	23508 (0.6)	1124 (0.7)	645 (1.7)
I18N/L63P/S72T/M87T/L9 8Q/Y105L/N110S	51	1998 (0.4)	36385 (1.0)	1032 (0.6)	73 (0.2)
G29W/M56T/L63P/L98Q/ Y105L/L106I/I117L	52	3308 (0.7)	32787 (0.9)	1258 (0.8)	78 (0.2)
G29W/N58S/L63P/M87T/ L98Q/M99L/Y105L	53	3381 (0.7)	32622 (0.9)	3622 (2.2)	578 (1.6)
G29W/N58S/L63P/D64N/ L98Q/M99L/Y105L	54	3750 (0.8)	33612 (0.9)	2158 (1.3)	227 (0.6)
I18T/L63P/S72G/M87K/L9 8Q/M99L/Y105L	55	2925 (0.6)	35032 (1.0)	1999 (1.2)	679 (1.8)

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN- γ [pg/mL] (Δ WT)
WT CTLA-4	1	4775 (1.0)	36785 (1.0)	1664 (1.0)	373 (1.0)

【 0 6 1 6 】

(表 E 3) バリエント CTLA-4-Fc ポリペプチドの結合および共刺激生理活性

10

20

30

40

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN-γ [pg/mL] (Δ WT)
M56V	56	2688 (0.6)	36766 (0.1)	822 (0.5)	176 (1.3)
L63P/K95R	57	2914 (0.6)	33412 (0.0)	819 (0.5)	165 (1.2)
L63P/L98Q	58	2830 (0.6)	31416 (0.0)	885 (0.5)	229 (1.6)
L98Q/M99L/Y105L	59	1472 (0.3)	33977 (0.0)	1541 (0.9)	325 (2.3)
L63P/M87K/M99L/L106R	60	3329 (0.7)	61526 (0.1)	2540 (1.5)	531 (3.8)
L63P/M99L/Y105L/I108F	61	2142 (0.4)	32781 (0.0)	3759 (2.3)	1053 (7.5)
V10A/L63P/L98Q/Y105L	62	3148 (0.7)	34595 (0.0)	869 (0.5)	141 (1.0)
M56T/L91R/L98Q/Y105L	63	1713 (0.4)	33645 (0.0)	1128 (0.7)	0 (0.0)
A26T/L63P/M87V/N110K/I117E	64	2909 (0.6)	31487 (0.0)	973 (0.6)	426 (3.0)
G29W/L63P/L98Q/M99L/Y105L	65	5165 (1.1)	37721 (0.1)	3023 (1.8)	438 (3.1)
A26T/V46E/L63P/D65G/L98Q	66	5009 (1.0)	38407 (0.1)	888 (0.5)	273 (1.9)
G29W/N58S/L63P/L98Q/Y105L	67	15619 (3.3)	34897 (0.0)	1374 (0.8)	0 (0.0)
G29W/E59G/L63P/L98Q/Y105L	68	3214 (0.7)	32786 (0.0)	1148 (0.7)	0 (0.0)
L12H/L63P/S72G/L98Q/Y105L	69	2034 (0.4)	31843 (0.0)	857 (0.5)	87 (0.6)
A6T/A26T/M55T/M99L/Y105L	70	1429 (0.3)	33589 (0.0)	938 (0.6)	472 (3.4)
A26T/L63P/D65G/L98Q/M99L/Y105L	71	2324 (0.5)	33672 (0.0)	2200 (1.3)	264 (1.9)
V10A/L63P/D64V/S72G/L98Q/M99L/Y105L	72	2598 (0.5)	33868 (0.0)	2502 (1.5)	904 (6.4)
L12P/G29W/D43N/N58S/L63P/L98Q/M99L/Y105L	73	1486 (0.3)	30004 (0.0)	1276 (0.8)	352 (2.5)

10

20

30

40

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN- γ [pg/mL] (Δ WT)
I18V/A26T/L63P/D64E /L98Q/Y105L/L106R/N 110K	74	4096 (0.9)	30852 (0.0)	17220 (10.3)	0 (0.0)
A19V/G29W/R35K/L6 3P/L98Q/M99L/Y105L	75	2349 (0.5)	33255 (0.0)	3119 (1.9)	445 (3.2)
L12P/A26T/L63P/S72G /T89M/L98Q/M99L/Y1 05L	76	1833 (0.4)	924222 (1.3)	919 (0.6)	536 (3.8)
P28L/E33V/L63P/S72G /L98R/M99L/Y105L	77	1441 (0.3)	782025 (1.1)	966 (0.6)	535 (3.8)
E24Q/L63P/S72G/L98 Q/M99L/Y105L	78	2864 (0.6)	729343 (1.0)	1080 (0.6)	867 (6.2)
I18T/G29R/L63P/S72G/ L98Q/M99L/Y105L	79	3592 (0.8)	857127 (1.2)	1014 (0.6)	366 (2.6)
L63P/L98Q/M99L/Y10 5L	80	2662 (0.6)	618249 (0.9)	868 (0.5)	944 (6.7)
Q41L/Y54F/M56K/M9 9L/I108F	81	2570 (0.5)	703731 (1.0)	940 (0.6)	408 (2.9)
S72G/L98Q/M99L/Y10 5L/I117T	82	1374 (0.3)	863538 (1.2)	968 (0.6)	221 (1.6)
M56R/L63P/L98Q/M99 L/Y105L	83	2546 (0.5)	911035 (1.3)	839 (0.5)	1198 (8.5)
E33M/L63P/S72G/L98 Q/Y105L	84	1532 (0.3)	518203 (0.7)	999 (0.6)	1220 (8.7)
L63P/L98Q/M99L/Y10 5L/L106I	85	2814 (0.6)	1007606 (1.4)	1004 (0.6)	773 (5.5)
A26T/M55R/L98Q/M9 9L/Y105L	86	2324 (0.5)	520232 (0.7)	986 (0.6)	468 (3.3)
L63P/S72G/M87A/L98 Q/Y105L	87	2769 (0.6)	349875 (0.5)	875 (0.5)	202 (1.4)
A26D/S72G/L98Q/M99 L/Y105L	88	5409 (1.1)	578704 (0.8)	1235 (0.7)	1097 (7.8)
V22A/L63P/L98Q/M99 L/Y105L/P119H	89	2820 (0.6)	642849 (0.9)	992 (0.6)	1174 (8.4)
A26T/M55T/L63P/L98 Q/M99L/Y105L	90	3203 (0.7)	850654 (1.2)	875 (0.5)	1096 (7.8)
E33V/A42S/M55T/L98 Q/M99L/Y105L	91	2195 (0.5)	929792 (1.3)	1043 (0.6)	1478 (10.5)
G29W/N58S/L63P/Q82 R/L98Q/Y105L	92	18277 (3.8)	950639 (1.3)	1463 (0.9)	0 (0.0)
E33M/L63P/S72G/L98 Q/Y105L/I117L	93	2293 (0.5)	912480 (1.3)	907 (0.5)	586 (4.2)
A26T/I67N/S72G/L98Q /M99L/Y105L	94	1740 (0.4)	976150 (1.4)	948 (0.6)	1331 (9.5)
L12F/A26T/L63P/L98Q /Y105L/L106R	95	2186 (0.5)	984573 (1.4)	867 (0.5)	1286 (9.2)

10

20

30

40

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN- γ [pg/mL] (Δ WT)
S20N/A26T/L63P/L98Q/M99L/Y105L	96	3707 (0.8)	941466 (1.3)	1020 (0.6)	1879 (13.4)
G29W/T61I/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	97	3446 (0.7)	842791 (1.2)	1024 (0.6)	718 (5.1)
G29W/N58S/L63P/T69I/L98Q/M99L/Y105L	98	4558 (1.0)	841939 (1.2)	1945 (1.2)	1036 (7.4)
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/L106N	99	2991 (0.6)	854863 (1.2)	894 (0.5)	0 (0.0)
L63P/T69A/L98Q/M99L/Y105L/L106R/V116A	100	3984 (0.8)	831276 (1.2)	1765 (1.1)	0 (0.0)
G29W/N58S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	101	4262 (0.9)	860194 (1.2)	1445 (0.9)	0 (0.0)
G29W/L63P/D65G/S72G/L98Q/Y105L	102	3399 (0.7)	854339 (1.2)	954 (0.6)	0 (0.0)
T53S/M56V/L98Q/Y105L	103	3860 (0.8)	875378 (1.2)	1376 (0.8)	0 (0.0)
L63P/S72G/L98Q/Y105L	104	3451 (0.7)	892268 (1.3)	1486 (0.9)	0 (0.0)
I18A/L63P/S72G/L98Q/Y105L	105	3542 (0.7)	637802 (0.9)	1240 (0.7)	0 (0.0)
G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L	106	3347 (0.7)	794165 (1.1)	1914 (1.2)	179 (1.3)
I18V/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	107	4064 (0.9)	797318 (1.1)	1351 (0.8)	0 (0.0)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	108	4303 (0.9)	829524 (1.2)	1474 (0.9)	0 (0.0)
G29W/L63P/I67V/S72G/L98Q/Y105L	109	3993 (0.8)	769557 (1.1)	1053 (0.6)	0 (0.0)
G29W/M55V/E59G/L63P/L98Q/Y105L	110	4174 (0.9)	427427 (0.6)	1248 (0.7)	0 (0.0)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I117L	111	3794 (0.8)	502885 (0.7)	1853 (1.1)	0 (0.0)
L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	112	3811 (0.8)	789352 (1.1)	1885 (1.1)	37 (0.3)
L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105L	113	6575 (1.4)	919746 (1.3)	2615 (1.6)	0 (0.0)
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L	114	4012 (0.8)	783049 (1.1)	1001 (0.6)	155 (1.1)
L12P/G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I	115	4347 (0.9)	662327 (0.9)	1219 (0.7)	195 (1.4)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/L106I/I117L	116	3242 (0.7)	702231 (1.0)	1205 (0.7)	133 (0.9)
A26T/T53S/L63P/L98Q/Y105L/L106I/I117L	118	4853 (1.0)	713974 (1.0)	2111 (1.3)	0 (0.0)

10

20

30

40

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN- γ [pg/mL] (Δ WT)
G29W/N58S/L63P/S72 G/M87V/L98Q/Y105L	119	4044 (0.8)	818528 (1.2)	1572 (0.9)	0 (0.0)
G29W/S72G/Q76R/L98 Q/Y105L/L106I/Q113H	120	2421 (0.5)	842313 (1.2)	2147 (1.3)	1129 (8.1)
G29W/N58S/L63P/S72 G/L98Q/Y105L/L106V	121	1233 (0.3)	931184 (1.3)	1045 (0.6)	844 (6.0)
A26T/L63P/L98Q/M99 L/Y105L	122	3095 (0.6)	762915 (1.1)	1863 (1.1)	1059 (7.6)
G29W/N58D/I67V/L98 Q/M99L/Y105L	123	2460 (0.5)	898877 (1.3)	4222 (2.5)	373 (2.7)
I67V/S72G/Q82H/T89 A/L98Q/M99L/Y105L	124	1729 (0.4)	865295 (1.2)	5692 (3.4)	786 (5.6)
S72G/R85G/L98Q/M99 L/Y105L/L106I	125	1439 (0.3)	905813 (1.3)	4653 (2.8)	915 (6.5)
L63P/L98Q/M99L/Y10 5L	80	2787 (0.6)	824331 (1.2)	1723 (1.0)	692 (4.9)
A26T/T47A/M56K/L63 P/S72G/Q82R/L98Q/M 99L/Y105L	126	2432 (0.5)	835548 (1.2)	2767 (1.7)	404 (2.9)
A26T/M55T/L63P/S72 G/L98Q/M99L/Y105L	127	3226 (0.7)	1085961 (1.5)	2090 (1.3)	1413 (10.1)
L12H/I18V/A42T/M55 T/N58D/L98R/Y105L/L 106I/P121S	128	1764 (0.4)	896733 (1.3)	733 (0.4)	170 (1.2)
I18T/A26T/L63P/S72G/ L98Q/Y105L	129	3265 (0.7)	769820 (1.1)	802 (0.5)	145 (1.0)
L12F/K30R/S72G/Q82 R/L98Q/M99L/Y105L	130	1208 (0.3)	766257 (1.1)	1747 (1.0)	718 (5.1)
L12P/L63P/S72G/L98Q /M99L/Y105L/L106N/I 117L	131	987 (0.2)	782940 (1.1)	998 (0.6)	623 (4.4)
G29W/M87K/I93V/L98 Q/M99L/Y105L	132	2019 (0.4)	767081 (1.1)	7975 (4.8)	786 (5.6)
P28L/E33V/L63P/S72G /L98Q/M99L/Y105L	133	1163 (0.2)	798068 (1.1)	1849 (1.1)	1161 (8.3)
G29W/T53S/M56K/L63 P/Q82H/L98Q/M99I/Y1 05L	134	4087 (0.9)	425068 (0.6)	5654 (3.4)	956 (6.8)
I18F/L63P/L98Q/M99L /Y105L/P121S	135	2392 (0.5)	486401 (0.7)	1765 (1.1)	737 (5.3)
L63P/L98Q/M99L/Y10 5L/I108V	136	3455 (0.7)	730161 (1.0)	2074 (1.2)	592 (4.2)
A26T/A42V/Q45H/I67 N/M87K/E97Q/M99L	137	10573 (2.2)	610530 (0.9)	24030 (14.4)	1282 (9.1)
E33M/L63P/S72G/L98 Q/Y105L	84	1984 (0.4)	933740 (1.3)	2401 (1.4)	1849 (13.2)

10

20

30

40

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	IFN-γ [pg/mL] (Δ WT)
M56V/E59G/L63P/S72G/M87K/I93V/L98Q/M99L/Y105L/I117E	138	1940 (0.4)	758136 (1.1)	1552 (0.9)	332 (2.4)
G29W/M87K/T89S/L98Q/M99L/Y105L/I108V/I117L	139	3525 (0.7)	913043 (1.3)	9533 (5.7)	232 (1.7)
L12P/M56V/L63P/V96I/L98Q/M99L/Y105L/Y115H	140	1647 (0.3)	891092 (1.3)	1059 (0.6)	907 (6.5)
G29W/T53S/M56K/T61N/L63P/L98Q/Y105L	141	3375 (0.7)	919607 (1.3)	1454 (0.9)	0 (0.0)
I18T/A26S/M55T/M56V/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L/I117K	142	2455 (0.5)	782684 (1.1)	1686 (1.0)	530 (3.8)
I18T/T61R/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	143	3315 (0.7)	926617 (1.3)	2390 (1.4)	296 (2.1)
L12P/L63P/S72G/L98Q/M99L/Y105L	144	1784 (0.4)	1045369 (1.5)	1510 (0.9)	968 (6.9)
E33M/L63P/S72G/L98Q/Y105L/I108F	145	1481 (0.3)	820016 (1.2)	2109 (1.3)	766 (5.5)
L12P/R16H/A26T/T61S/L63P/M87V/L98Q/M99L/Y105L/L106I/I117L	146	1926 (0.4)	895016 (1.3)	1046 (0.6)	593 (4.2)
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/P121S	147	7819 (1.6)	778254 (1.1)	2249 (1.4)	0 (0.0)
G29W/L63P/S72G/L98Q/Y105L/P121S	148	3395 (0.7)	763120 (1.1)	1559 (0.9)	0 (0.0)
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L	149	8116 (1.7)	257214 (0.4)	2517 (1.5)	0 (0.0)
G29W/T53S/M56K/N58S/L63P/M87V/L98Q/Y105L/I108V	150	7775 (1.6)	271930 (0.4)	3703 (2.2)	45 (0.3)
G29W/T53S/L63P/S72G/L98Q/Y105L	151	4497 (0.9)	174601 (0.2)	1545 (0.9)	0 (0.0)
V10A/G29W/T53S/M56K/L63P/L98Q/Y105L/P121S	152	6058 (1.3)	766570 (1.1)	1612 (1.0)	0 (0.0)
WT CTLA-4	1	4775 (1.0)	708753 (1.0)	1664 (1.0)	140 (1.0)

10

20

30

40

50

【0617】

実施例2. CTLA-4 コンセンサスバリアントの作製およびアッセイ

改善したCD80、CD86、および/もしくはICOSL結合を示した、ならびに/またはMLRアッセイにおいてインターフェロン-γ分泌の抑制を証明したバリアントに共通して関連付けられた、実施例1に記載のスクリーニングにおいて特定されたコンセンサス残基を特定することによって、さらなるCTLA-4 ECDバリアントを設計した。選択されたコンセンサス変異には、I18T、A26T、E33V、T53S、M55T、M56K、N58S、L63P、M87V、L98Q、M99L、およびY105Lが含まれた。コンセンサスバリアントを用いて、SEQ ID NO:1に示した野生型配列を基準として部位特異的変異誘発を行い、次いで、

実施例1に記載のようにFc融合タンパク質として整えることによってバリエーションCTLA-4 ECDを作製した。下記のように結合と生理活性についてバリエーションCTLA-4 ECD-Fc融合体を試験した。

【0618】

A. 結合および生理活性

1. 細胞発現カウンター構造との結合

コグネイト結合パートナーを発現する細胞を生成するために、ヒトCD80、CD86、およびICOSLのそれぞれについて完全長哺乳動物表面発現構築物をpcDNA3.1発現ベクター(Life Technologies)において設計した。これらをGenscript, USAから調達した。結合研究を、上記のExpi293F一過的トランスフェクション系(Life Technologies, USA)を用いて行った。実験に必要な細胞数を求め、適切な30mLスケールのトランスフェクションを、製造業者が推奨するプロトコルを用いて行った。それぞれのカウンター構造またはモック30mLトランスフェクションのために、7500万個のExpi293F細胞を、30μgの発現構築物DNAおよび1.5mLの希釈したExpiFectamine(商標)293試薬と、48時間インキュベートし、この時点で染色のために細胞を収集した。

10

【0619】

場合によっては、コグネイト結合パートナーが安定して発現する細胞を使用した。完全長ヒトCD80、CD86、またはICOSLの表面発現のためにチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)にレンチウイルスによって安定して形質導入した。

20

【0620】

フローサイトメトリー分析のために、200,000個の細胞のある特定の一過的トランスフェクション、安定細胞株、または適切な陰性対照を96ウェル丸底プレートにプレートした。細胞を遠心沈殿させ、非特異的結合をブロックするために染色用緩衝液(PBS(リン酸緩衝食塩水)、1%BSA(ウシ血清アルブミン)、および0.1%アジ化ナトリウム)に20分間懸濁した。その後、細胞を再度、遠心分離し、50μL中に100nM~100pMのCTLA-4バリエーションFc融合タンパク質または対照を含有する染色用緩衝液に懸濁した。一次染色を45分間行った後に、染色用緩衝液で細胞を2回洗浄した。50μLの染色用緩衝液で1:150希釈したPE結合抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch, USA)を用いて、30分間インキュベートし、結合したCTLA-4を検出した。または、50μLの染色用緩衝液で1:130希釈した抗CTLA-4抗体(Biolegend, USA)を30分間使用した後に、染色用緩衝液で細胞を2回洗浄して、結合したCTLA-4を検出した。次いで、50μLの染色用緩衝液で1:150希釈したPE結合抗マウスIgG(Jackson ImmunoResearch, USA)を用いて、30分間インキュベートし、抗CTLA-4抗体を検出した。

30

【0621】

最終インキュベーション後に、結合しなかった結合抗体を除去するために細胞を2回洗浄し、2%ホルムアルデヒド/PBSで固定し、Hypercyt(Intellicyte, USA)またはLSRII(Becton Dickinson, USA)フローサイトメーターによって分析した。

【0622】

各試料の平均蛍光強度(MFI)を、Cell Quest Proソフトウェア(Becton Dickinson, USA)、FlowJoソフトウェア(FlowJo, USA)、またはForcyteソフトウェア(Intellicyt, USA)を用いて計算した。

40

【0623】

a. CD86遮断バイオアッセイ

CD86遮断バイオアッセイによって確かめられた場合に、選ばれたCTLA-4バリエーションFc融合タンパク質を、CD86-CD28媒介性共刺激を遮断する能力があるかどうかアッセイした。細胞表面抗ヒトCD3単鎖Fv(OKT3)とヒトCD86を発現するようにレンチウイルスを用いてK562細胞に形質導入してK562/OKT3/CD86にすることによって、人工抗原提示細胞(APC)を作製した。ヒトICOSの細胞外ドメインとヒトCD28の細胞内ドメインで構成されるキメラ受容体を発現するように、レンチウイルスを用いてIL-2-ルシフェラーゼレポーター発現Jurkat細胞(Promega)に形質導入してJurkat/IL-2/ICOS-C

50

D28にすることによって、エフェクター細胞を作製した。33 μ L/ウェルのアッセイ用緩衝液(5%FBSを含むRPMI1640)中に 2×10^4 細胞/ウェルのAPCを、33 μ L/ウェル中に300nMのCTLA-4-Fcまたは対照タンパク質と一緒にプレートした。APCとタンパク質を室温で20分間インキュベートした後に、33 μ L/ウェル中に 2×10^5 細胞/ウェルのエフェクター細胞を添加した。プレートを摂氏37度のインキュベーションチャンバーに移し、5%CO₂で5時間加湿し、次いで取り出し、室温で15分間順応させた。各プレートに100 μ L/ウェルの細胞溶解物とルシフェラーゼ基質溶液(BioGlo(商標)ルシフェラーゼ試薬, Promega)を添加し、オービタルシェーカー上で10分間インキュベートした。各試験試料について、1ウェルあたり1秒の積分時間でCytation 3イメージングリーダー(BioTek instruments)を用いてルミネセンスを測定することによって相対的ルミネセンス値(RLU)を求めた。CD86遮断によって媒介されるパーセント阻害は、以下の式:

$$[(\text{平均対照RLU} - \text{実験RLU}) / (\text{平均対照RLU})] \times 100$$

を用いて求めた。

【0624】

B. 結果

結果を以下の表E4にまとめた。各実験について未改変CTLA-4ポリペプチド(Δ WT)の対応する結合およびCD86遮断と比較した時の相対比に加えて、CD80、CD86、およびICOSLに結合した値(MFI)とパーセント阻害CD28共刺激を示した。示されたように、CD80またはCD86との結合が変化したこととは無関係に、ある特定の変異と変異の組合わせが、CTLA-4 ECDとICOSLとの結合が大幅に増加することと関連付けられた。場合によっては、CD80またはCD86の一方または両方との結合の増加も観察された。

【0625】

(表E4)コンセンサスバリエーションCTLA-4-Fcポリペプチドの結合および生理活性

10

20

30

40

50

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			CD86 遮断 バイオ アッセイ (ΔWT)
		CD80 MFI (ΔWT)	CD86 MFI (ΔWT)	ICOSL MFI (ΔWT)	
T53S, M56K, N58S, L63P, M87V, L98Q, Y105L	162	631192 (1.2)	497901 (0.9)	215054 (50.9)	88.2 (1.3)
I18T, A26T, M55T, M56K, L63P, L98Q, M99L, Y105L	163	759480 (1.4)	657099 (1.1)	89672 (21.2)	40.2 (0.6)
I18T, A26T, M56K, L63P, L98Q, Y105L	164	496119 (0.9)	601631 (1.0)	295395 (69.9)	86.1 (1.2)
T53S, L63P, L98Q	165	564111 (1.1)	571155 (1.0)	11541 (2.7)	86.2 (1.2)
T53S, L63P, Y105L	166	526605 (1.0)	568901 (1.0)	20739 (4.9)	86.4 (1.2)
T53S, M56K, N58S, L63P, M87V, Y105L	168	610377 (1.2)	604604 (1.0)	48034 (11.4)	86.7 (1.3)
L98Q, M99L, Y105L	59	875290 (1.7)	686788 (1.2)	116699 (27.6)	33.9 (0.5)
E33V, L98Q, Y105L	174	811261 (1.5)	580048 (1.0)	101877 (24.1)	32.5 (0.5)
E33V, M99L	177	758165 (1.4)	618183 (1.1)	71903 (17.0)	85.2 (1.2)
T53S, M56K, N58S, L63P, M87V, L98Q	167	347188 (0.7)	555921 (1.0)	7241 (1.7)	82.6 (1.2)
T53S, M56K, N58S, L63P, L98Q, Y105L	169	795550 (1.5)	557059 (1.0)	248668 (58.8)	87.4 (1.3)
T53S, M56K, N58S, M87V, L98Q, Y105L	170	1133587 (2.1)	676071 (1.2)	35087 (8.3)	88.7 (1.3)
T53S, M56K, L63P, M87V, L98Q, Y105L	171	736640 (1.4)	546545 (0.9)	234716 (55.5)	90.1 (1.3)
T53S, N58S, L63P, M87V, L98Q, Y105L	172	637509 (1.2)	508878 (0.9)	108784 (25.7)	86.8 (1.3)
M56K, N58S, L63P, M87V, L98Q, Y105L	173	688049 (1.3)	574298 (1.0)	258574 (61.2)	85.9 (1.2)
E33V, L98Q, M99L,	176	975697 (1.8)	628740 (1.1)	137713 (32.6)	14.1 (0.2)
野生型	1	529140 (1.0)	579615 (1.0)	4228 (1.0)	69.1 (1.0)

10

20

30

40

50

【 0 6 2 6 】

実施例3. 選ばれたCTLA-4バリアントの作製およびアッセイ

実施例1に記載のスクリーニングにおいて特定されたバリアントCTLA-4に由来する変異、特に、CD80、CD86、およびICOSLとの結合の強化とインターフェロン-γ抑制に関連付けられた変異L12F/R16H/G29W/M56T/L98Q/Y105Lを含有するSEQ ID NO:113に示したバリアントを用いて、CTLA-4 ECDバリアントのさらなるパネルを設計した。場合によっては、S72Gを含めた。なぜなら、S72Gは、抑制活性を有すると突き止められた他の上位50ヒットの35%超で発生したホットスポットとして特定されていたからである。いくつかの作製されたバリアントについて、この戦略では、例えば、バリアント中の変異数を少なくするために、いくつかの変異(復帰変異変異)を除去することを取り入れた。SEQ ID NO:1に示した野生型配列を基準として部位特異的変異誘発を行い、

次いで、実施例1に記載のようにFc融合タンパク質として整えることによってバリエーションCTLA-4 ECDを作製した。バリエーションCTLA-4 ECD-Fc融合体を、実施例2に記載のように結合と生理活性について試験した。

【0627】

表E5は、各実験について未改変CTLA-4ポリペプチド(Δ WT)の対応する結合およびCD86遮断と比較した時の相対比に加えて、CD80、CD86、およびICOSLに結合した値(MFI)とパーセント阻害CD28共刺激を示す。

【0628】

(表E5)復帰変異バリエーションCTLA-4-Fcポリペプチドの結合および生理活性

変異	SEQ ID NO (ECD)	結合			MLR
		CD80 MFI (Δ WT)	CD86 MFI (Δ WT)	ICOSL MFI (Δ WT)	CD86遮断バイオアッセイ (Δ WT)
L12F, R16H, G29W, M56T, L98Q	178	76155 (1.5)	86548 (1.2)	959 (0.8)	72.3 (0.9)
L12F, R16H, G29W, M56T, Y105L	179	73996 (1.4)	72293 (1.0)	1944 (1.7)	77.8 (1.0)
L12F, R16H, G29W, L98Q, Y105L	180	60527 (1.2)	78181 (1.1)	862 (0.7)	89.0 (1.1)
L12F, R16H, M56T, L98Q, Y105L	181	70120 (1.4)	70437 (1.0)	1265 (1.1)	86.8 (1.1)
G29W, M56T, L98Q, Y105L	182	70579 (1.4)	65251 (0.9)	612 (0.5)	88.6 (1.1)
L12F, G29W, L98Q, Y105L	183	66677 (1.3)	85018 (1.2)	807 (0.7)	90.0 (1.1)
L12F, L98Q, Y105L	184	67142 (1.3)	85125 (1.2)	2584 (2.2)	86.9 (1.1)
R16H, L98Q, Y105L	185	67259 (1.3)	70269 (1.0)	1018 (0.9)	89.8 (1.1)
G29W, L98Q, Y105L	186	90170 (1.8)	64097 (0.9)	570 (0.5)	90.0 (1.1)
M56T, L98Q, Y105L	187	68644 (1.3)	70222 (1.0)	700 (0.6)	88.0 (1.1)
L12F, R16H, G29W, M56T, S72G, L98Q, Y105L	188	46175 (0.9)	58464 (0.8)	613 (0.5)	88.3 (1.1)
G29W, M56T, S72G, L98Q, Y105L	189	55706 (1.1)	67962 (0.9)	534 (0.5)	88.6 (1.1)
野生型	1	51269 (1.0)	73502 (1.0)	1160 (1.0)	80.5 (1.0)

【0629】

実施例4. B細胞阻害性分子(BIM)としての親和性改変TACI細胞外ドメインポリペプチドの特定

本実施例は、B細胞刺激性受容体のリガンドに結合する、(例えば、野生型と比較して増大した)親和性改変(バリエーション)TACIポリペプチドを操作および特定するための方法を含む、T細胞阻害性分子(TIM)と共に、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の一部として用いられる例示的なTACIポリペプチドB細胞阻害性分子(BIM)について説明する。

【0630】

本実施例は、酵母ディスプレイライブラリーとして酵母表面に翻訳および発現させるための、DNAライブラリーを酵母に導入するための、ならびに少なくとも1つのTDを含有

するTACIの細胞外ドメイン(ECD)の親和性改変バリエーション(TACI vTD)を発現する酵母細胞を選択するための、ヒトTACI TNFRドメイン(TD)の変異DNA構築物の作製について説明する。

【0631】

A. TACI TNFRドメインの変異DNA構築物の作製

TACIの細胞外ドメイン(ECD)のバリエーションを特定するために、アミノ酸のランダム置換を含有するライブラリーを構築した。構築物は、(1)SEQ ID NO:516に示したシステムリッチタンパク質ドメイン(CRD、CRD1/CRD2)(UniProtアクセッション番号O14836に示した残基29~110に対応する)または(2)SEQ ID NO:528に示した1個だけのCRD(CRD2)(UniProtアクセッション番号O14836に示した残基68~110に対応する)のいずれかを含む、TACIのECD部分を含有する野生型ヒトTACI配列に基づいて作製した。

TACI ECD (29-110) (SEQ ID NO: 516):

VAMRSCPEEQYWDPLLGTCTMSCKTICNHQSQRCTCAAFCSRSLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAIFYCENKLRS

TACI ECD (68-110) (SEQ ID NO: 528):

SLSCRKEQGKIFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAIFYCENKLRS

【0632】

野生型TACI ECDドメインをコードするDNAを、改変酵母発現ベクターpBYDS03(Life Technologies, USA)のBamHI部位とKpnI部位の間にクローニングした。これにより、TACI ECDは酵母表面アンカリングドメインSag1(酵母 α -アグルチニンのC末端ドメイン)のN末端側に配置され、インフレーションHA融合タグはTACI ECD配列のN末端側に配置され、c-Myc融合タグはTACI ECD配列のC末端側に配置された。このベクターにおける発現は誘導性GAL1プロモーターによって制御される。正しいDNA配列を検証した後、1つの遺伝子コピーにつき2~5個の変異の頻度でTACI ECD配列全体にわたってランダム変異を導入するように、エラープロードPCRのテンプレートとして野生型TACI ECD DNA構築物を使用した。望ましい誤り率を得るために、Genemorph II Kit(Agilent, USA)を0.0~0.6mMの漸増設定量のMnCl₂と併用した。エラープロードPCR後に、変異誘発されたDNAを、NucleoSpin(登録商標)GelとPCR Clean-up kit(Macherey-Nagel, Germany)を用いてゲル精製した。次いで、この単離されたDNA断片を、ラージスケール酵母エレクトロポレーション用に調製するためにOneTaq 2x PCR master mix(New England Biolabs, USA)とpBYDS03に相同な48bp重複領域を含有するプライマーを用いてPCR増幅した。TACI ECD DNAインサートをゲル精製し、500ng/ μ Lの名目濃度で滅菌脱イオン水に再懸濁した。

【0633】

形質転換用のベクターを調製するために、pBYDS03をBamHI-HFおよびKpnI-HF制限酵素(New England Biolabs, USA)で消化し、大きなベクター断片(予想サイズ:7671bp)をゲル精製し、500ng/ μ Lの名目濃度で滅菌脱イオン水に溶解した。酵母形質転換用に調製する目的で、各エレクトロポレーションのために12 μ gのライブラリーDNAインサートを4 μ gの直線化ベクターと混合した。

【0634】

ランダムDNAライブラリーを酵母に導入するために、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) BJ5464株(ATCC.org; ATCC番号208288)を、Benatui, L. et.al., Protein Eng Des Sel. 2010 Apr;23(4):155-159に詳述したようにエレクトロポレーション直前に調製した。簡単に言うと、BJ5464の一晚固定相培養物を、100mLのYPD培地(10g/Lイーストニトロジェンベース、20g/Lペプトン、お

よび20g/L D-(+)-グルコース)の中でOD₆₀₀ 0.3まで継代し、接種された培養物がOD₆₀₀ 1.6になるまで、30℃、300rpmのプラットフォームシェーカーの中に入れた。約5時間後に細胞を遠心分離によって収集し、特に定めない限り残りのプロトコールのために氷上で保持した。収集後に細胞を50mLの氷冷水で2回洗浄し、エレクトロポレーション用緩衝液(1Mソルビトール、1mM CaCl₂)で1回洗浄した。収集した細胞を20mLの0.1M LiAc/10mM DTTに再懸濁し、培養フラスコの中で、225rpmで30℃で30分間振盪することによって順化させた。順化された細胞をすぐに遠心分離し、エレクトロポレーション用緩衝液で2回洗浄し、体積を1mLにするように約100~200μlのエレクトロポレーション用緩衝液を用いて再懸濁した。この順化された細胞の懸濁液は、400μlキユベット中で2回エレクトロポレーション反応するのに十分であった。

10

【0635】

各エレクトロポレーションのために、12μgのライブラリーDNAインサートと4μgの直線化pBYDS03ベクター(上記)を、400μlのエレクトロコンピテントBJ5464と混合し、予め冷却した2mm電極間隙付きBioRad GenePulserキユベットに移した。混合物を氷上で5分間保持した後に、BTX ECM399指数関数的減衰波エレクトロポレーションシステム(exponential decay wave electroporation system)を用いた2500Vでのエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションの直後に細胞を1Mソルビトール:1X YPDの1:1混合物8mLに添加し、10分間振盪せずに室温で放置し、次いで、225rpm、30℃で1時間、プラットフォームシェーカー上に置いた。細胞を遠心分離によって収集し、改変プラスミドpBYDS03が保有するLEU2選択マーカーに対応するために250mLのSCD-Leu培地に再懸濁した。1リットルのSCD-Leu培地を、14.7gmのクエン酸ナトリウム、4.29gmのクエン酸一水和物、20gmのデキストロース、6.7gmのイーストニトロジェンベース、およびロイシンを含まない1.6gmの酵母合成ドロップアウト培地サプリメントを用いて作製した。使用前に0.22μm減圧フィルター装置を用いて培地を濾過滅菌した。ライブラリーサイズは、 10^{-5} ~ 10^{-10} の希釈範囲の新鮮に回収した細胞の段階希釈液をSCD-Leu寒天プレートにスポットし、3日後のコロニーを計数することで外挿することによって推定した。電気穿孔した培養物の残りを、飽和するまで増殖させ、非形質転換細胞の画分を最小にし、2つ以上のライブラリーバリエーションを含有する可能性のある細胞からプラスミドを分離するために、この培養物に由来する細胞をもう1回、同じ培地に1/100で継代培養し、飽和するまで増殖させた。ライブラリー多様性を維持するために、この継代培養工程は、ライブラリーサイズ計算値よりも少なくとも10倍多い細胞を含有する接種材料を用いて行った。2回目の飽和培養物に由来する細胞を、滅菌した25%(重量/体積)グリセロールを含有する新鮮培地に 1×10^{10} /mLの密度まで再懸濁し、凍結し、-80℃で保管した(凍結ライブラリーストック)。

20

30

【0636】

推定ライブラリーサイズの少なくとも10倍に等しい数の細胞を個々のライブラリーストックから解凍し、非誘導SCD-Leu培地に 0.5×10^7 細胞/mLまで懸濁し、一晚増殖させた。翌日、ライブラリーサイズの10倍に等しい数の細胞を2000RPMで2分間遠心分離し、誘導SCDG-Leu培地に 0.5×10^7 細胞/mLまで再懸濁した。1リットルのSCDG-Leu誘導培地を、水に溶解した5.4gmのNa₂HPO₄、8.56gmのNaH₂PO₄・H₂O、20gmのガラクトース、2.0gmのデキストロース、6.7gmのイーストニトロジェンベース、およびロイシンを含まない1.6gmの酵母合成ドロップアウト培地サプリメントを用いて作製し、0.22μm膜フィルター装置で滅菌した。酵母細胞表面にライブラリータンパク質発現を誘導するために、培養物を30℃で一晩、誘導培地中で増殖させた。

40

【0637】

TACI ECDライブラリーを一晩誘導した後に、外因性組換えカウンター構造タンパク質に結合する能力があるTACI ECDバリエーションを濃縮するために、BAFF-9xHisが予め充填されたDynabeads(商標)His-Tag磁気ビーズを用いた磁気分離によって、推定ライブラリー多様性の10倍に等しい数の細胞を選別した。磁気分離からのアウトプットを、BAFF-9xHisとAPRIL-FLAGを交互に入れ替える4回のポジティブセレクションが関与

50

する後のFACS選択スキームに使用し、それぞれの回でカウンター構造の濃度を同時に1/10にした(例えば、FACS1:50nM APRIL-FLAG;FACS4:0.05nM BAFF-9xHis)。ライブラリー識別を低減し得るリガンド枯渇の人為的結果を回避するために、酵母にディスプレイされたTACI ECDバリエーション分子の総数よりも少なくとも10倍化学量論過剰量のカウンター構造を維持するようにインキュベーション体積を調整した(1個の細胞につき100,000コピーのタンパク質と仮定する)。BAFF-9xHisとTACI ECDバリエーションとの結合、およびAPRIL-FLAGとTACI ECDバリエーションとの結合が、それぞれ、PE結合抗6xHisタグ抗体(BioLegend, USA)およびPE結合抗FLAG-タグ抗体を用いて検出された。DNA配列決定と、その後の組換えFc融合発現用のクローニングのために、FACS3およびFACS4アウトプットからのバリエーションを単離した。

10

【0638】

上記のFACS4 BAFF-9xHis選択からの酵母細胞アウトプットに対して第2のランダム変異誘発サイクルを行った。1ソートにつき交互のカウンター構造を用いたポジティブセレクションプロトコルは、カウンター構造の順序を切り替えたことを除けば(例えば、FACS1:50nM BAFF-9xHis;FACS4:0.05nM APRIL-FLAG)、第1のサイクルと同じであった。FACS3とFACS4の酵母細胞アウトプットから、さらなるバリエーションが選択された。

【0639】

個々のクローンを配列分析するために、上記のサイクル1選択とサイクル2選択の両方からのFACS3およびFACS4アウトプットに由来するTACI ECDバリエーションインサートをFc融合ベクターにサブクローニングした。

20

【0640】

選択されたTACI ECD FACSソートに由来するアウトプット細胞プールをSCD-Leu選択培地中で最終密度まで増殖させ、プラスミドDNAを、酵母プラスミドDNA単離キット(Zymoresearch, USA)を用いて単離した。Fc融合体を作製する目的で、Gibson Assembly Master Mix(New England Biolabs)を用いてインビトロ組換えを行うために、親和性成熟TACI ECDバリエーションを、両端に40bp相同領域を含有するプライマーと、Fc領域をコードしかつインフレームのAfeIおよびBamHIで消化したFc融合ベクターを用いてPCR増幅した。Gibson Assembly反応物を、熱ショック形質転換のために製造業者の説明書に従って大腸菌NEB5α株(New England Biolabs, USA)に添加した。

30

【0641】

選択用のシングルコロニーを単離するために、形質転換反応の希釈液を、100μg/mLカルベニシリン(Teknova, USA)を含有するLB-寒天にプレートした。次いで、一般的に、各形質転換から、最大96個のコロニーを、100μg/mLカルベニシリン(Teknovaカタログ番号L8112)を含有するLB-ブロスが入っている96ウェルプレートの中で、飽和するまで37℃で一晩増殖させ、全てのクローンにある変異を特定する目的で、DNA配列決定のために各ウェルから小さなアリコートを提供した。

【0642】

関心対象のクローンを配列分析および特定した後にMidiPlus kit(Qiagen)を用いてプラスミドDNAを調製した。

40

【0643】

組換えバリエーションFc融合タンパク質を、Expi293発現系(Invitrogen, USA)を用いて、懸濁液に適合したヒト胎児由来腎臓(HEK)293細胞から産生した。上清を収集し、Fcタンパク質をMab SelectSure(GE Healthcare カタログ番号17543801)で捕捉した。50mM酢酸塩pH3.6を用いてカラムからタンパク質を溶出させた。MabSelect Sure溶出液をプールし、pHをpH5.0超に調整した。次いで、高度に精製された単量体材料を作製するために、この材料を分取用SECカラムで仕上げをした。この材料を10mM酢酸塩、9%スクロースpH5.0に対してバッファー交換した。タンパク質純度は分析SECによって評価した。材料をバイアルに入れ、-80で保管した。

【0644】

50

選択によって特定および作製された、選択されたTACI vTDの中にあるアミノ酸置換を表2に示した。選択されたvTDを、実施例6に記載のように結合と機能活性について試験した。

【0645】

実施例5. 親和性改変BCMA細胞外ドメインポリペプチドおよび免疫調節タンパク質の特定

本実施例は、B細胞刺激性受容体のリガンドに結合する、(例えば、野生型と比較して増大した)親和性改変(バリエーション)BCMAポリペプチドを操作および特定するための方法を含む、T細胞阻害性分子(TIM)と共に、提供されるマルチドメイン免疫調節タンパク質の一部として用いられる例示的なBCMAポリペプチドB細胞阻害性分子(BIM)について説明する。バリエーションBCMA細胞外ポリペプチドを、T細胞阻害性分子のないBCMA Fc融合タンパク質である免疫調節タンパク質としても整えた。

10

【0646】

本実施例は、酵母ディスプレイライブラリーとして酵母表面に翻訳および発現させるための、酵母にDNAライブラリーを導入するための、ならびに少なくとも1つのTDを含有するBCMAの細胞外ドメイン(ECD)の親和性改変バリエーション(BCMA vTD)を発現する酵母細胞を選択するためのヒトBCMA TNFRドメイン(TD)の変異DNA構築物の作製について説明する。次いで、選択されたBCMA vTDをFc融合タンパク質として整えた。

【0647】

A. BCMAドメインの変異DNA構築物の作製

20

BCMAの細胞外ドメイン(ECD)のバリエーションを特定するために、アミノ酸のランダム置換を含有するライブラリーを構築した。SEQ ID NO:356に示したシステインリッチタンパク質ドメイン(CRD)(以下のように「BCMA ECD(2-54)」と名付けられたUniProtアクセッション番号Q02223に示した残基2~54に対応する)を含むBCMAのECD部分を含有する野生型ヒトBCMA配列に基づいて、構築物を作製した。

BCMA ECD (2-54) (SEQ ID NO: 356):

LQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

【0648】

野生型BCMA ECDドメインをコードするDNAを、改変酵母発現ベクターpBYDS03(Life Technologies, USA)のBamHI部位とKpnI部位の間にクローニングした。これにより、BCMA ECDは酵母表面アンカリングドメインSag1(酵母α-アグルチニンのC末端ドメイン)のN末端側に配置され、インフレームHA融合タグはBCMA ECD配列のN末端側に配置され、c-Myc融合タグはBCMA ECD配列のC末端側に配置された。このベクターにおける発現は誘導性GAL1プロモーターによって制御される。正しいDNA配列を検証した後に、1つの遺伝子コピーにつき2~5個の変異の頻度でBCMA ECD配列全体にわたってランダム変異を導入するように、エラープロードPCRのテンプレートとして野生型BCMA ECD DNA構築物を使用した。望ましい誤り率を得るために、Genemorph II Kit(Agilent, USA)を0.0~0.6mMの漸増設定量のMnCl₂と併用した。エラープロードPCR後に、変異誘発されたDNAを、NucleoSpin(登録商標)GelとPCR Clean-up kit(Macherey-Nagel, Germany)を用いてゲル精製した。次いで、この単離されたDNA断片を、ラージスケール酵母エレクトロポレーション用に調製するためにOneTaq 2x PCR master mix(New England Biolabs, USA)とpBYDS03に相同な48bp重複領域を含有するプライマーを用いてPCR増幅した。BCMA ECD DNAインサートをゲル精製し、500ng/μLの名目濃度で滅菌脱イオン水に再懸濁した。

30

40

【0649】

形質転換用ベクターを調製するために、pBYDS03をBamHI-HFおよびKpnI-HF制限酵素(New England Biolabs, USA)で消化し、大きなベクター断片(予想サイズ:7671bp)をゲル精製し、500ng/μLの名目濃度で滅菌脱イオン水に溶解した。酵母形質転換用に調製する目的で、各エレクトロポレーションのために12μgのライブラリーDNAイ

50

ンサートを4 μ gの直線化ベクターと混合した。

【0650】

ランダムDNAライブラリーを酵母に導入するために、サッカロマイセス・セレビスエBJ5464株(ATCC.org; ATCC番号208288)を、Benatuil, L. et.al., Protein Eng Des Sel. 2010 Apr;23(4):155-159に詳述されたようにエレクトロポレーションの直前に調製した。簡単に言うと、BJ5464の一晚固定相培養物を100mLのYPD培地(10g/Lイーストニトロジェンベース、20g/Lペプトン、および20g/L D-(+)-グルコース)の中でOD600 0.3まで継代し、接種された培養物がOD600 1.6になるまで30℃、300rpmのプラットフォームシェーカーの中に入れた。約5時間後に細胞を遠心分離によって収集し、特に定めない限り残りのプロトコールのために氷上で保持した。収集後に細胞を50mLの氷冷水で2回洗浄し、エレクトロポレーション用緩衝液(1Mソルビトール、1mM CaCl₂)で1回洗浄した。収集した細胞を20mLの0.1M LiAc/10mM DTTに再懸濁し、培養フラスコの中で225rpmで30℃で30分間振盪することによって順化させた。順化された細胞をすぐに遠心分離し、エレクトロポレーション用緩衝液で2回洗浄し、体積を1mLにするように約100~200 μ lのエレクトロポレーション用緩衝液を用いて再懸濁した。この順化された細胞懸濁液は400 μ lキュベット中で2回エレクトロポレーション反応するのに十分であった。

【0651】

各エレクトロポレーションのために、12 μ gのライブラリーDNAインサートと4 μ gの直線化pBYDS03ベクター(上記)を400 μ lのエレクトロコンピテントBJ5464と混合し、予め冷却した2mm電極間隙付きBioRad GenePulserキュベットに移した。混合物を氷上で5分間保持した後に、BTX ECM399指数関数的減衰波エレクトロポレーションシステムを用いた2500Vでのエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションの直後に、細胞を1Mソルビトール:1X YPDの1:1混合物8mLに添加し、10分間振盪せずに室温で放置し、次いで、225rpm、30℃で1時間、プラットフォームシェーカー上に置いた。細胞を遠心分離によって収集し、改変プラスミドpBYDS03が保有するLEU2選択マーカーに対応するために250mLのSCD-Leu培地に再懸濁した。1リットルのSCD-Leu培地を、14.7gのクエン酸ナトリウム、4.29gのクエン酸一水和物、20gのデキストロース、6.7gのイーストニトロジェンベース、およびロイシンを含まない1.6gの酵母合成ドロップアウト培地サプリメントを用いて作製した。使用前に0.22 μ m減圧フィルター装置を用いて培地を濾過滅菌した。ライブラリーサイズは、10⁻⁵~10⁻¹⁰の希釈範囲の新鮮に回収した細胞の段階希釈液をSCD-Leu寒天プレートにスポットし、3日後のコロニーを計数することで外挿することによって推定した。電気穿孔した培養物の残りを飽和するまで増殖させ、非形質転換細胞の画分を最小にし、2つ以上のライブラリーバリエーションを含有する可能性のある細胞からプラスミドを分離するために、この培養物に由来する細胞をもう1回、同じ培地に1/100で継代培養し、飽和するまで増殖させた。ライブラリー多様性を維持するために、この継代培養工程は、ライブラリーサイズ計算値よりも少なくとも10倍多い細胞を含有する接種材料を用いて行った。2回目の飽和培養物からの細胞を、滅菌した25%(重量/体積)グリセロールを含有する新鮮培地に1x10¹⁰/mLの密度まで再懸濁し、凍結し、-80℃で保管した(凍結ライブラリーストック)。

【0652】

推定ライブラリーサイズの少なくとも10倍に等しい数の細胞を個々のライブラリーストックから解凍し、非誘導SCD-Leu培地に0.5x10⁷細胞/mLまで懸濁し、一晚増殖させた。翌日、ライブラリーサイズの10倍に等しい数の細胞を2000RPMで2分間遠心分離し、誘導SCDG-Leu培地に0.5x10⁷細胞/mLまで再懸濁した。1リットルのSCDG-Leu誘導を、水に溶解した5.4gのNa₂HPO₄、8.56gのNaH₂PO₄・H₂O、20gのガラクトース、2.0gのデキストロース、6.7gのイーストニトロジェンベース、およびロイシンを含まない1.6gの酵母合成ドロップアウト培地サプリメントを用いて作製し、0.22 μ m膜フィルター装置で滅菌した。酵母細胞表面にライブラリータンパク質発現

を誘導するために、培養物を30℃で一晩、誘導培地中で増殖させた。

【0653】

ナイーブBCMA ECDライブラリーを一晩誘導した後に、外因性組換えカウンター構造タンパク質に結合する能力があるBCMA ECDバリエーションを濃縮するために、BAFF-9xHisが予め充填されたDynabeads(商標)His-Tag磁気ビーズを用いた磁気分離によって、推定ライブラリー多様性の10倍に等しい数の細胞を選別した。磁気分離からのアウトプットを、BAFF-9xHisとAPRIL-FLAGを交互に入れ替える4回のポジティブセレクションが関与する後のFACS選択スキームに使用し、それぞれの回でカウンター構造の濃度を同時に1/10にした(例えば、FACS1:50nM APRIL-FLAG;FACS4:0.05nM BAFF-9xHis)。ライブラリー識別を低減し得るリガンド枯渇の人為的結果を回避するために、酵母にディスプレイされたBCMA ECDバリエーション分子の総数よりも少なくとも10倍化学量論過剰量のカウンター構造を維持するようにインキュベーション体積を調整した(1個の細胞につき100,000コピーのタンパク質と仮定する)。BAFF-9xHisとBCMA ECDバリエーションとの結合とAPRIL-FLAGとBCMA ECDバリエーションとの結合が、それぞれ、PE結合抗6xHisタグ抗体(BioLegend, USA)とPE結合抗FLAG-タグ抗体を用いて検出された。DNA配列決定と、その後の組換えFc融合発現用のクローニングのためにFACS3およびFACS4アウトプットからのバリエーションを単離した。

10

【0654】

上記のFACS4 BAFF-9xHis選択からの酵母細胞アウトプットに対して第2のランダム変異誘発サイクルを行った。1ソートにつき交互のカウンター構造を用いたポジティブセレクションプロトコルは、カウンター構造の順序を切り替えたことを除けば(例えば、FACS1:50nM BAFF-9xHis;FACS4:0.05nM APRIL-FLAG)、第1のサイクルと同じであった。FACS3とFACS4の酵母細胞アウトプットから、さらなるバリエーションが選択された。

20

【0655】

A. BCMA TNFRドメインの縮重コドン変異DNA構築物の作製

本実施例は、酵母ディスプレイライブラリーとして酵母表面に翻訳および発現させるための、酵母にDNAライブラリーを導入するための、ならびにBCMA TNFRの親和性改変バリエーションを発現する酵母細胞を選択するための、ヒトBCMA TNFRドメインの標的縮重コドンDNAライブラリーの設計について説明する。

30

【0656】

利用可能な結晶構造と、サイクル1とサイクル2のランダムライブラリー親和性成熟選択から単離した組換えBCMA ECDバリエーションFc融合タンパク質のインビトロ特徴付後の機能データに基づいて標的DNAオリゴヌクレオチドライブラリーを構築した。第1に、4.5オングストロームの、残基毎の加重平均距離カットオフ(PyMOL, Schrodinger)を用いて、標的変異誘発のためのBCMA位置を、BCMA:BAFF界面接触(PDB ID: 1XU2)に制限した。第2に、変異することで、BAFFおよびAPRILとの結合がおおむね改善した位置を特定するために、利用可能なIC₅₀データを用いて配列機能ヒートマップを作製した。目視検査を助けるために、全集団変異頻度と比べて上位10%以内のIC₅₀を有する、組換えBCMA ECDバリエーションFc融合体にある全変異の頻度を比較することによって位置特異的傾向スコア(PSPS)を計算した。突然変異荷重が高い位置のバイアスを補正するのを助けるために、上位10%以内にある変異の頻度(すなわち、PSPSの分子の項)によってPSPSをさらにスケール変更した。サイクル2アウトプットの平均IC₅₀は、APRILよりもBAFFの方が1桁小さく、従って、置換することでBAFF結合がおおむね改善した位置に優先権が与えられた。

40

【0657】

最後に、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーから評価した組換えBCMA ECDバリエーションFcタンパク質の発現収率と、サイズ排除クロマトグラフィーから評価した組換えBCMA ECDバリエーションFcタンパク質の均一性の考察。まとめると、3つの独立した縮重コドンBCMA ECDライブラリーを設計するために7つの位置:H19、I22、Q25、

50

S30、N31、L35、およびT36を選択した。表E6に示した、それぞれの望ましい位置での部位飽和変異誘発を、20種類全てのタンパク質アミノ酸をコードする混合塩基セット「NNK」を用いて行った。それぞれの縮重コドンライブラリーをSnapGene(GSL Biot ech LLC, USA)を用いて設計し、Integrated DNA Technologiesから一本鎖完全長DNAオリゴヌクレオチドUltramers(登録商標)として合成した。

【0658】

(表E6)飽和変異誘発「NNK」のために選択された標的ライブラリー位置

位置	19	22	25	30	31	35	36
Wt 残基	H	I	Q	S	N	L	T
設計1	X	X		X	X	X	
設計2	X		X		X	X	X
設計3	X	X	X	X	X	X	X

10

【0659】

Targeted NNK ssDNA Ultramers(登録商標)を調製し、本質的に実施例4に記載のように酵母に導入した。このライブラリーを使用して、実質的に実施例4に記載のようにBCMA ECDの親和性改変バリエーションを発現する酵母を選択した。選択は、本質的に実施例4に記載のようにサイクル1ランダムライブラリー選択プロトコールに従って行った。説明したようにスクリーニングにおいて特定されたさらなるバリエーションを表E14に示した。

20

【0660】

B. Fc融合体としての選択アウトプットの再形式化

個々のクローンを配列分析するために、上記の選択に由来するBCMA ECDバリエーションアウトプットをFc融合ベクターにサブクローニングした。少なくとも1つの親和性改変ドメインがあるBCMAのECDを含有するFc融合タンパク質(例えば、バリエーションBCMA ECD-Fc)として組換え免疫調節タンパク質を作製するために、以下:バリエーションBCMAドメイン、続いて7アミノ酸リンカー(GSGGGGS; SEQ ID NO:590)、続いて免疫グロブリンタンパク質のEu Indexナンバリングシステムにより、変異L234A、L235E、およびG237Aを含有するヒトIgG1エフェクターレスFc配列、のようにタンパク質をコードするように、コードDNAを作製した。この構築物は、システインと共有結合を形成することができる抗体軽鎖を全く含まないので、ヒトIgG1 Fcは、免疫グロブリンタンパク質のEu Indexナンバリングシステムにより位置220にあるシステイン残基からセリン残基への交換(C220S)も含んだ(SEQ ID NO:586に示した野生型または未改変Fcを基準として位置5(C5S)に対応する)。このFc領域はまた、通常、野生型ヒトIgG1定常領域遺伝子にコードされている、位置447(SEQ ID NO:586に示した野生型または未改変Fcの位置232に対応する)のC末端リジンも無かった(K447delと名付けられた)。融合構築物中

30

40

【0661】

選択されたBCMA ECD FACSソートに由来するアウトプット細胞プールをSCD-Leu選択培地中で最終密度まで増殖させ、プラスミドDNAを、酵母プラスミドDNA単離キット(Zymoresearch, USA)を用いて単離した。Fc融合体を作製する目的で、Gibson Assembly Master Mix(New England Biolabs)を用いてインビトロ組換えを行うために、親和性成熟BCMA ECDバリエーションを、両端に40bp相同領域を含有するプライマーと、Fc領域をコードしかつインフレームのAfeIおよびBamHIで消化したFc融合ベクターを用いてPCR増幅した。Gibson Assembly反応物を、熱ショック形質転換のために製造業者の説明書に従って大腸菌NEB5α株(New England Biolabs, USA)に添加した。

50

【0662】

選択用のシングルコロニーを単離するために、形質転換反応の希釈液を、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ カルベニシリン(Teknova, USA)を含有するLB-寒天にプレートした。次いで、一般的に、各形質転換から、最大96個のコロニーを、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ カルベニシリン(Teknovaカタログ番号L8112)を含有するLB-ブロスが入っている96ウェルプレートの中で、 37°C で一晩増殖させ、全てのクローンにある変異を特定するために、DNA配列決定のために各ウェルから小さなアリコートを提供した。

【0663】

関心対象のクローンを配列分析および特定した後にMidiPlus Kit(Qiagen)を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0664】

組換えバリエーションFc融合タンパク質を、Expi293発現系(Invitrogen, USA)を用いて、懸濁液に適合したヒト胎児由来腎臓(HEK)293細胞から産生した。上清を収集し、Fcタンパク質をMab SelectSure(GE Healthcare カタログ番号17543801)で捕捉した。 50mM 酢酸塩 $\text{pH}3.6$ を用いてカラムからタンパク質を溶出させた。MabSelect Sure溶出液をプールし、 pH を $\text{pH}5.0$ 超に調整した。次いで、高度に精製された単量体材料を作製するために、この材料を分取SECカラムで仕上げをした。この材料を 10mM 酢酸塩、 9% スクロース $\text{pH}5.0$ に対してバッファー交換した。タンパク質純度を分析SECによって評価した。材料をバイアルに入れ、 -80°C で保管した。

【0665】

選択によって特定された、選択されたBCMA vTDの中にあるアミノ酸置換を表1に示した。Fc融合タンパク質として整えられた、選択されたBCMA vTDを、実施例6に記載のように結合と機能活性について試験した。

【0666】

実施例6. Fc融合タンパク質の活性の評価

本実施例は、細胞株に基づくインビトロバイオアッセイを用いた、Fc融合体として整えられた、BCMAドメイン含有分子、例えば、可溶性野生型(WT)またはバリエーションBCMA vTDの活性の特徴付けについて説明する。

【0667】

活性化B細胞核内因子 κ -軽鎖-エンハンサー(NF- κ B)ルシフェラーゼベースのレポーターがあるJurkat細胞を購入した(BPS Bioscience)。マウス TACIを安定して細胞表面発現するようにJurkat/NF- κ B細胞にレンチウイルスで形質導入した(Jurkat/NF- κ B/TACI)。マウスTACIを発現する細胞は、ヒトとマウス両方のAPRILまたはBAFFに応答する。組換えヒトまたはマウスAPRILまたはBAFFがTACIに結合した後に、Jurkat細胞内にある内因性NF- κ B転写因子は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写を制御するDNA応答エレメントに結合する。ルシフェラーゼ産生を、ルシフェリン含有基質を添加することによって定量した。ルシフェリン含有基質は酸化すると、マイクロプレートリーダーを用いて測定することができる光を発する。Jurkat/NF- κ B/TACIアッセイの模式図を図1に示した。

【0668】

ヒトおよびマウスの組換えAPRILリガンドおよびBAFFリガンドを購入した:ヒトAPRIL(Tonbo Biosciences);ヒトBAFF(BioLegend);マウスAPRIL(ProSci Incorporated);およびマウスBAFF(R & D Systems)。

【0669】

BCMA WTまたはvTDドメインを含有する分子の生理活性を求めるために、 $30\text{ }\mu\text{L}$ 中で様々な濃度($1\sim 10\text{ nM}$)の組換えヒトまたはマウスAPRILまたはBAFFを、 $30\text{ }\mu\text{L}$ 中で一定の、または漸増設定された($40\text{ nM}\sim 66\text{ pM}$)BCMAドメイン含有分子とインキュベートした。リガンドと可溶性受容体を振盪しながら室温(RT)で20分間インキュベートした。 $50\text{ }\mu\text{L}$ を、 $50\text{ }\mu\text{L}$ の培地(RPMI1640+5%胎仔ウシ血清[FBS])中に 1.5×10^5 個のJurkat/NF- κ B/TACI細胞/ウェルを含有する96ウェル白色平底プレートに移した。ウェル

10

20

30

40

50

を混合し、プレートを加湿5%CO₂インキュベーションチャンバーの中で、摂氏37度で5時間インキュベートした。プレートをインキュベーターから取り出し、100 μLの細胞溶解物とルシフェラーゼ基質溶液(Bio-Glo(商標)Luciferase Assay System, Promega)を各ウェルに添加し、プレートをオービタルシェーカー上で10分間インキュベートした。各試験試料について、1ウェルあたり1秒の積分時間でCytation 3(BioTek Instruments)イメージングリーダーを用いてルミネセンスを測定することによって相対的ルミネセンス値(RLU)を求めた。BCMA WTまたはvTDの存在下で対照タンパク質と比べてRLUが減少したことは、Jurkat/NF-κB/TACI細胞において形質導入されたTACI受容体を介したリガンドシグナル伝達が遮断および阻害されたことを表している。

【0670】

図2に示したように、例示的なBCMA-Fc vTDは、リガンドシグナル伝達を、WT BCMAドメインを含有するFc融合タンパク質に等しいレベルで、またはこれより大きなレベルで阻害する。

【0671】

実施例7. マルチドメインT細胞阻害性およびB細胞阻害性免疫調節タンパク質の作製

(1)CD28などのT細胞刺激性受容体またはそのリガンドに結合する少なくとも1種類のT細胞阻害性分子(TIM)と、(2)BCMAもしくはAPRILなどのB細胞刺激性受容体またはそのリガンドに結合する少なくとも1種類のB細胞阻害性分子(BIM)と、を含有する、マルチドメイン免疫調節タンパク質を作製した。例示的なTIMは、例えば、実施例1に記載のような、CD28に結合する、IgSFドメインを含有する野生型(WT)またはバリエーションCTLA-4 ECD(それぞれ、CTLA-4 IgDまたはvIgD)を含んだ。例示的なBIMは、(i)実施例5に記載のような、リガンドAPRILもしくはBAFFに結合する、TDドメインを含有する野生型(WT)もしくはバリエーションTACI ECD(それぞれ、TACI TDもしくはvTD)、または(ii)実施例6に記載のような、リガンドAPRILもしくはBAFFに結合する、TDドメインを含有するWTもしくはバリエーションBCMA ECD(それぞれ、BCMA TDもしくはvTD)を含んだ。

【0672】

免疫調節タンパク質を、Fcタンパク質との融合によって多量体分子として、または単量体分子として作製した。

【0673】

A. 多量体配置

様々なマルチドメイン免疫調節タンパク質を、以下にまとめたように、Fcタンパク質との融合を介して様々な配置をとる多量体分子として作製した。GSGGGGS(SEQ ID NO:590)、GGGGSGGGGS(2xGGGGGS; SEQ ID NO:594)、(GGGGGS)₄(SEQ ID NO:600)、または(GGGGS)₅(SEQ ID NO:671)などのペプチドリンカーを介して、マルチドメイン免疫調節タンパク質のTIMまたはBIMをFc領域のN末端またはC末端に多様に連結した。

【0674】

ホモ二量体Fc融合体を作製するために、作製された構築物に使用した例示的なIgG1 Fc領域はSEQ ID NO:589に示した配列を有し、EUナンバリングによる、変異C220S、エフェクター機能を低減することを目的に、EUナンバリングによる、変異L234A、L235E、およびG237A(これらの変異は、SEQ ID NO:586に示した野生型ヒトIgG1 Fcを基準としてC5S、L19A、L20E、G22Aに対応する)、ならびにC末端リジンの除去であるEUナンバリングによるK447del(SEQ ID NO:586に示した野生型または未改変Fcを基準として位置232の欠失に対応する)を含有した。

【0675】

以下の表E7-Aは、例示的な作製されたマルチドメインホモ二量体免疫調節Fc融合タンパク質を示す。

【0676】

(表E7-A) マルチドメイン免疫調節タンパク質(ホモ二量体)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His	+ His					
		タグ	タグ					
CTLA-4 ECD および BCMA								
CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406		601		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		H19L (2- 54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406		602		CTLA-4 ECD (1)		H19L (2- 54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 381		603		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		S16A, H19Y, R39Q (2- 54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 411		604		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		H19R (2- 54) (411)	GSG4S (590)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
							(G4S)4 (600)	
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 405		605		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		H19K (2- 54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 381		606		CTLA-4 ECD (1)		S16A, H19Y, R39Q (2- 54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 411		607		CTLA-4 ECD (1)		H19R (2- 54) (411)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 405		608		CTLA-4 ECD (1)		H19K (2- 54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
<u>BCMA 381</u> <u>GSG4S – Fc-</u> <u>(G4S)4 –CTLA-</u> <u>4 186</u>		609		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		S16A, H19Y, R39Q (2- 54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356		631		CTLA-4 ECD (1)		2-54 WT (356)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356		632		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD (92)		2-54 WT (356)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356		633		T53S/L63 P/L98Q ECD (165)		2-54 WT (356)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357		634		CTLA-4 ECD (1)		H19Y (2- 54) (357)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357		635		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD		H19Y (2- 54) (357)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
				(92)				
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357		636		T53S/L63 P/L98Q ECD (165)		H19Y (2- 54) (357)	GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
BCMA 411 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		645		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		H19R (2- 54) (411)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 405 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		646		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		H19K (2- 54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 406 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		647		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)		H19L (2- 54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 381 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		649		CTLA-4 ECD (1)		S16A, H19Y, R39Q (2- 54) (381)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
BCMA 411 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		650		CTLA-4 ECD (1)		H19R (2- 54) (411)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 405 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		651		CTLA-4 ECD (1)		H19K (2- 54) (405)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 406 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		652		CTLA-4 ECD (1)		H19L (2- 54) (406)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
BCMA 357 (G4S)3 CTLA-4 92 GSG4S Fc		655		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2- 54) (357)	(G4S)3 (595) GSG4S (590)	Fc (589)
BCMA 357 GSG4S Fc (G4S)3 CTLA-4 92		656		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD		H19Y (2- 54) (357)	(G4S)3 (595) GSG4S (590)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
				(92)				
CTLA-4 92 (G4S)4 BCMA 357 GSG4S Fc		657		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2- 54) (357)	(G4S)4 (600) GSG4S (590)	Fc (589)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)3 BCMA 357		658		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2- 54) (357)	GSG4S (590) (G4S)3 (595)	Fc (589)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)5 BCMA 357		659		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD (92)		H19Y (2- 54) (357)	GSG4S (590) (G4S)5 (671)	Fc (589)
CTLA-4 ECDおよび TACI								
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541		610		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)	K77E, F78Y, Y102D (68-110)		GSG4S (590) (G4S)4	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
					(541)		(600)	
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541		611		CTLA-4 ECD (1)	K77E, F78Y, Y102D(6 8-110) (541)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542)		612		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)	Q75E, R84Q(68 -110) (542)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542)		613		CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q(68 -110) (542)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
TACI 542 GSG4S Fc (G4S)4 (CTLA- 4 186)		614		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)	Q75E, R84Q(68 -110) (542)		GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
TACI 516 (G4S)2 Fc (G4S)2 CTLA 4 668		615		C122S ECD (668)	29-110 WT (516)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
TACI 528 (G4S)2 Fc		616		CTLA-4 ECD	68-110 WT		(G4S)2 (594)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
(G4S)2 CTLA 4 WT ECD 1				(1)	(528)			
TACI 528 (G4S)2 Fc (G4S)2 CTLA 4 668		617		C122S ECD (668)	68-110 WT (528)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516		624		CTLA-4 ECD (1)	29-110 WT (516)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516		625		C122S ECD (668)	29-110 WT (516)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528		626		CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)		(G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528		627		C122S ECD (668)	68-110 WT (528)		(G4S)2 (594)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
CTLA 4 92 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516		637		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD (92)	29-110 WT (516)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA 4 165 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516		638		T53S/L63 P/L98Q ECD (165)	29-110 WT (516)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 535 (68-110)		643		L12F/R16 H/G29W/ M56T/L9 8Q/Y105 L ECD (113)	R84G (68-110) (535)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 688 (29-110)		644		L12F/R16 H/G29W/ M56T/L9 8Q/Y105 L ECD (113)	R84G (29-110) (688)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
TACI 541 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 186		648		G29W/L9 8Q/Y105 L ECD (186)	K77E, F78Y, Y102D(6 8-110) (541)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ His タグ					
TACI 541 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		653		CTLA-4 ECD (1)	K77E, F78Y, Y102D(6 8-110) (541)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)
TACI 542 GSG4S Fc (G4S)4 CTLA-4 WT ECD 1		654		CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q(68 -110) (542)		GSG4S (590) (G4S)2 (594)	Fc (589)

10

20

30

40

50

【 0 6 7 7 】

ヘテロ二量体マルチドメインFc融合タンパク質を作製するために、多量体マルチドメイン免疫調節タンパク質を「ノブ・イントゥ・ホール(knobs-into-hole)」工学によってヘテロ二量体分子として作製した。このような例では、ヘテロ二量体分子を発現させるために、それぞれが、(1)第1の「ノブ」Fcサブユニット(SEQ ID NO:669に示した。SEQ ID NO:586に示した野生型ヒトIgG1 Fcを基準としてS139CおよびT151Wに対応する、EUナンバリングによって変異S354CおよびT366Wを含有する);ならびに(2)第2の「ホール」Fcサブユニット(SEQ ID NO:670に示した。SEQ ID NO:586に示した野生型ヒトIgG1 Fcを基準としてY134C、T151S、L153A、およびY192Vに対応する、EUナンバリングによる、変異Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含有する)と融合されたTIMとBIMとを共発現させることによって、ヘテロ二量体を作製した。さらに、ノブFcとホールFcは両方とも、それぞれが、SEQ ID NO:586に示した野生型または未改変Fcと比較して(それぞれ、EUナンバリングによるC220S、L234A、L235E、およびG237Aに対応する)、エフェクター機能を低減するために変異L19A、L20E、G22Aも含有し、位置5(C5S)のシステイン残基からセリン残基への交換も含有した。

ノブ Fc (SEQ ID NO:669):

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ホール Fc (SEQ ID NO:670):

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

【 0 6 7 8 】

表 E 7 - B は、例示的な作製されたマルチドメインヘテロ二量体免疫調節融合タンパク質を示す。

【 0 6 7 9 】

(表 E 7 - B) ヘテロ二量体マルチドメイン免疫調節タンパク質 CTLA / BCMA / TAC I

20

30

40

50

				TIM	BIM			
説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO タンパク質 SEQ ID NO +His タグ		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
CTLA-4 92 Fc + BCMA 357 Fc	CTLA-4 92 GSG4S Fc K	662		G29W/N5 8S/L63P/ Q82R/L98 Q/Y105L ECD (92)			GSG4S (590)	Fc K (669)
	BCMA 357 GSG4S Fc H	660				H19Y (2- 54) (357)	GSG4S (590)	Fc H (670)
CTLA-4 113 Fc - BCMA 357 Fc	CTLA-4 113 GSG4S Fc K	663		L12F/R16 H/G29W/ M56T/L9 8Q/Y105L ECD (113)			GSG4S (590)	Fc K (669)
	BCMA 357 GSG4S Fc H	660				H19Y (2- 54) (357)	GSG4S (590)	Fc H (670)

10

20

30

40

50

【0680】

CTLA-4-Fc(アバタセプト)またはBCMA-Fc(表E8-A)をマルチドメイン免疫調節Fc融合タンパク質の対照として使用した。

【0681】

関心対象のFc融合タンパク質をコードする発現構築物をExpi293 HEK293細胞(例えば、Invitrogen)においてExpifectamine(商標)試薬と培地を用いて製造業者の説明書に従って一過的に発現させた。上清を収集し、タンパク質を捕捉し、AKTAタンパク質精製システムを用いてプロテインAカラムから溶出させた。次いで、凝集しなかった(単量体)、高度に精製された材料を作製するために、溶出された材料を、さらなる分取SEC工程によって分離した。この材料を10mM酢酸塩、9%スクロース、pH5.0.(A5Su)に対してバッファー交換した。タンパク質を滅菌バイオセーフティキャビネットの中にあるバ

イアルに入れ、-80℃で凍結した。材料が安定しており、解凍後に大部分が凝集していない(単量体)ことを証明するために、バイアルを解凍し、分析SECによって評価した。

【0682】

(表E8-A)BCMA Fc

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク 質 SEQ ID NO	タンパク 質 SEQ ID NO	CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
			+His タグ					
Fc (G4S)2 BCMA (356)		628				2-54 WT (356)	(G4S)2 (594)	Fc (589)
Fc (G4S)2 BCMA (357)		629				H19Y (2- 54) (357)	(G4S)2 (594)	Fc (589)

10

20

【0683】

B. 単量体配置

いくつかの配置では、作製されたマルチドメイン免疫調節タンパク質を、ペプチドリンカーと一緒に連結された、TIMとBIMとを含有する単量体分子として作製した。本実施例では、前記構築物を、リンカー(EAAAK)6(SEQ ID NO:665)を用いて作製した。場合によっては、単量体免疫調節タンパク質は検出用および/または精製用のN末端部分またはC末端部分、例えば、ポリ-ヒスチジンタグ(HHHHHH; SEQ ID NO:702)および/またはflagタグ(DYKDDDDK; SEQ ID NO:588)も含有した。

【0684】

表E9は、例示的な作製されたマルチドメイン免疫調節単量体タンパク質について説明する。

【0685】

(表E9)単量体マルチドメイン免疫調節タンパク質

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO		CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO) BCMA (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)
		- His タグ	+ Flag His タグ			
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1		703	618	CTLA-4 ECD (1)	29-110 WT (516)	(EAAAK) 6 (665)
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 668		704	619	C122S ECD (668)	29-110 WT (516)	(EAAAK) 6 (665)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1		705	620	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	(EAAAK) 6 (665)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 668		706	621	C122S ECD (668)	68-110 WT (528)	(EAAAK) 6 (665)
TACI 516 (G4S)3 CTLA 4 668		707	622	C122S ECD (668)	29-110 WT (516)	(G4S)3 (595)
TACI 528 (G4S)3 CTLA 4 668		708	623	C122S ECD (668)	68-110 WT (528)	(G4S)3 (595)

10

20

30

40

50

【 0 6 8 6 】

実施例 8. CTLA-4ドメインがスタックされたBCMA含有分子またはTACI含有分子によるTACI媒介性刺激のBCMA/TACI遮断の生理活性評価

実施例 6 に記載の細胞株に基づくバイオアッセイを用いて、Jurkat/NF- κ B/TACI細胞における、TACI受容体を介したAPRIL媒介性またはBAFF媒介性リガンドシグナル伝達を遮断するための、CTLA-4 WTまたはvIgSFドメインが「スタックされた」TACI含有またはBCMA含有WT、vTD、またはマルチドメインタンパク質の機能的特徴付けを評価した。実施例 7 に記載の例示的なスタック分子を評価した。細胞内でのルシフェラーゼ生成をモニタリングすることによってAPRIL媒介性またはBAFF媒介性リガンドシグナル伝達を定量した。

【 0 6 8 7 】

A. 例示的なマルチドメイン分子の生理活性

ある実験では、表E8に示した例示的な分子を、APRIL媒介性またはBAFF媒介性シグナル伝達を遮断するかどうかJurkat/NF- κ B/TACIレポーター細胞を用いて評価した。表E10-Aは、APRIL媒介性またはBAFF媒介性TACIシグナル伝達の阻害の最大半量阻害濃度(IC50)値を示す。各実験について、対応するWT BCMA-FcまたはWT TACI-Fc対照(Δ 親vTD)との比較も示した。場合によっては、試験されたタンパク質はWT対照の親と比較されず、以下の表において(-)で表された。

【0688】

(表E10-A) マルチドメイン免疫調節タンパク質の生理活性

説明	SEQ ID NO	IC50 (nM) APRIL	IC50 (nM) APRIL (Δ 親 vTD)	IC50 (nM) BAFF	IC50 (nM) BAFF (Δ 親 vTD)
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1	703/618	46.15	46.2 (5.0)	7.781	7.8 (3.0)
TACI 516 (EAAAK)6 CTLA 4 668	704/619	138	138.0 (15.0)	3.422	3.4 (1.3)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 WT ECD 1	705/620	ND	ND	5.305	5.3 (2.1)
TACI 528 (EAAAK)6 CTLA 4 668	706/621	ND	ND	5.176	5.2 (2.0)
TACI 516 (G4S)3 CTLA 4 668	707/622	ND	ND	8.747	8.7 (3.4)
TACI 528 (G4S)3 CTLA 4 668	708/623	ND	ND	8.412	8.4 (3.3)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516	624	19.15	19.2 (2.1)	9.459	9.5 (3.7)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 516	625	19.97	20.0 (2.2)	10.05	10.1 (3.9)
CTLA-4 WT ECD 1 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528	626	37.53	37.5 (4.1)	2.06	2.1 (0.8)
CTLA 4 668 (G4S)2 Fc (G4S)2 TACI 528	627	8.655	8.7 (0.9)	2.237	2.2 (0.9)
TACI WT Fc	516	9.173	9.2 (1.0)	2.579	2.6 (1.0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	631	0.8383	0.8 (0.0)	33.63	33.6 (0.8)
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	633	0.8939	0.9 (0.0)	36.83	36.8 (0.9)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	632	0.8094	0.8 (0.0)	33.46	33.5 (0.8)
Fc (G4S)2 BCMA (356)	628	42.71	42.7 (1.0)	42.71	42.7 (1.0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	634	0.6879	0.7 (1.0)	3.642	3.6 (0.7)

10

20

30

40

50

説明	SEQ ID NO	IC50 (nM) APRIL	IC50 (nM) APRIL (Δ 親 vTD)	IC50 (nM) BAFF	IC50 (nM) BAFF (Δ 親 vTD)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	635	0.6831	0.7 (1.0)	6.274	6.3 (1.2)
CTLA-4 165 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	636	0.6057	0.6 (0.9)	11.84	11.8 (2.2)
Fc (G4S)2 BCMA (357)	629	0.6957	0.7 (1.0)	5.439	5.4 (1.0)
CTLA 4 165 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516	638	4.644	4.6 (0.9)	0.9277	0.9 (0.5)
CTLA 4 92 GSG4S Fc (G4S)2 TACI 516	637	6.752	6.8 (1.3)	1.732	1.7 (1.0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	631	5.106	5.1 (1.0)	1.698	1.7 (1.0)
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 535 (68-110)	643	8.632	8.6 (NA)	0.5059	0.51 (0.4)
CTLA-4 113 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 535 (29-110)	644	8.253	8.5 (1.4)	0.566	0.57 (0.4)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 356	631	6.087	6.1 (1.0)	1.389	1.39 (1.0)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 381	603	1.27	1.3 (-)	0.2818	0.28 (-)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 411	604	2.371	2.4 (-)	0.1329	0.13 (-)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 405	605	18.39	18.4 (-)	0.1604	0.16 (-)
CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406	601	0.9969	1.0 (-)	0.4901	0.49 (-)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	610	1.558	1.6 (-)	0.1027	0.10 (-)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	612	2.49	2.5 (-)	0.1532	0.15 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 381	606	0.8491	0.8 (-)	0.234	0.23 (-)

10

20

30

40

50

説明	SEQ ID NO	IC50 (nM) APRIL	IC50 (nM) APRIL (Δ 親 vTD)	IC50 (nM) BAFF	IC50 (nM) BAFF (Δ 親 vTD)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 411	607	2.005	2.0 (-)	0.1746	0.17 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 405	608	23.13	23.1 (-)	0.1956	0.20 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	602	1.185	1.2 (-)	0.678	0.68 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	611	1.646	1.6 (-)	0.1285	0.13 (-)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	613	2.732	2.7 (-)	0.1599	0.16 (-)
BCMA 381 GSG4S – Fc- (G4S)4 – CTLA-4 186	609	0.8762	0.9 (-)	0.06175	0.06 (-)
TACI 542 GSG4S Fc (G4S)4 (CTLA-4 186	614	1.2	1.2 (-)	0.1786	0.18 (-)
BCMA 357 (G4S)3 CTLA-4 92 GSG4S Fc	655	0.6888	0.69 (0.7)	0.3963	0.4 (0.4)
BCMA 357 GSG4S Fc (G4S)3 CTLA-4 92	656	0.5824	0.58 (0.6)	0.4155	0.4 (0.4)
CTLA-4 92 (G4S)4 BCMA 357 GSG4S Fc	657	0.63	0.63 (0.6)	3.754	3.8 (3.8)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)3 BCMA 357	658	0.5499	0.55 (0.5)	0.5481	0.6 (0.6)
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)5 BCMA 357	659	0.6873	0.69 (0.7)	0.7649	0.8 (0.8)
BCMA WT-Fc	356	1.026	1.03 (1.0)	0.9946	1.0 (1.0)
CTLA-4 92 Fc K + BCMA 357 Fc H	662 660	4.19	4.2 (4.2)	5.385	5.4 (5.4)
CTLA-4 113 Fc K/ BCMA 357 Fc H	663	5.203	5.2 (5.2)	5.153	5.2 (5.2)

説明	SEQ ID NO	IC50 (nM) APRIL	IC50 (nM) APRIL (Δ 親 vTD)	IC50 (nM) BAFF	IC50 (nM) BAFF (Δ 親 vTD)
	660				
BCMA WT-Fc	356	1.026	1.0 (1.0)	0.9946	1.0 (1.0)

【0689】

B. BAFFとAPRILを阻害するためのバリエーションBCMA、またはバリエーションCTLA-4 vIgDとのマルチドメイン免疫調節タンパク質として組合わせたBCMAもしくはTACI vTDの活性

図3Aに示したように、BCMA vTDは、シングルドメインとして用いられても、マルチドメインスタック分子の一部として含められても同等の活性を示した。図3Bに示したように、スタック分子に含められたBCMA vTDは交換可能であり、リガンド阻害を調整するのに使用することができる。

【0690】

図3Cに示したように、マトリドメイン(multidomain)スタック分子として含められたTACI vTDは、APRILとBAFFを両方とも遮断する能力を示す。図3Dに示したように、スタック分子に含められたTACI vTDは交換可能であり、リガンド阻害を調整するのに使用することができる。

【0691】

図4に示したように、例示的なBCMA vTD-Fc、およびBCMAまたはTACI vTDとCTLA-4 vIgDを含有するスタックはマウスAPRILおよびBAFFリガンドシグナル伝達を阻害する。合わせると、結果から、マルチドメインスタック分子は、シングルドメイン対照と同様に、APRILおよびBAFFリガンドシグナル伝達(本実施例では、TACI媒介性シグナル伝達によって例示される)を遮断できることが分かる。

【0692】

C. アタシセプトまたはテリタシセプトに存在するECD部分を含有するFc融合体と比べた、APRIL媒介性またはBAFF媒介性シグナル伝達の遮断についてのバリエーションBCMA vTDならびにBCMAおよびTACI vTDマルチドメイン免疫調節タンパク質の比較

別の類似試験では、実施例7に記載の例示的な作製された分子を、Jurkat/NF-κB/TACI細胞においてAPRIL媒介性またはBAFF媒介性リガンドシグナル伝達を遮断する能力があるかどうか評価した。比較のために、SEQ ID NO:589に示したFc配列と融合した野生型 TACI ECDを含有する対照分子を作製した。ある対照では、融合タンパク質は、WT TACI (TACI 30-110、SEQ ID NO:718; アタシセプトにあるTACI ECD部分に対応する、SEQ ID NO:720)を含有した。別の対照では、融合タンパク質は、WT TACI (TACI 13-118、SEQ ID NO:719、テリタシセプトにあるTACI ECD部分に対応する)を含有した。活性を対照分子と比較した。活性を抗BAFFモノクローナル抗体ベリムマブとも比較した。

【0693】

単独で、またはバリエーションCTLA-4 IgSFとさらに組合わせたマルチドメイン分子である、WTまたはバリエーションBCMA vTDのいずれかの例示的なBCMA分子を漸増設定し(100,000pM~32pM)、2nM組換えヒトAPRILまたはBAFFに添加し、Jurkat/NF-κBアッセイについて上記したようにアッセイした。図5Aに示したように、単独で、またはマルチドメイン(multidomain)タンパク質としてBCMA TDを含有する例示的な分子は、TACI 30-110-Fc、TACI 13-118-Fc、およびベリムマブと比較して強いAPRIL遮断を示したが、BAFF遮断を示さなかった。

【0694】

WT vTDまたはWTおよびバリエーションCTLA-4 IgSFとさらに組合わせたvTDマルチドメイン分子である例示的なTACI分子を漸増設定し(100,000pM~32pM)、2nM組換えヒトAPRILまたはBAFFに添加し、Jurkat/NF-κBアッセイについて上記したようにアッセイした。図5Bに示したように、マルチドメインタンパク質としてTACI vTDを含有する例示的な分子はTACI 30-100-Fc、TACI 13-118-Fc、およびベリムマブよりも大きな強いAPRIL遮断およびBAFF遮断を示した。TACIのCRD2ドメインしか含有しないWT TACI-FcもTACI 30-100-FcおよびTACI 13-118-Fcよりも大きな強いAPRIL遮断を示した。これらの結果は、最小CRD2ドメイン(アミノ酸残基68~110を含有する)が、アタシセプトおよびテリタシセプトに存在するようなCRD1ドメイン部分も含有す

10

20

30

40

50

るTACI ECD分子を比較して改善したAPRIL遮断を示すという知見と一致している。

【0695】

表E10-Bは、図5Aおよび図5Bに記載の例示的な分子を対象にした、APRIL媒介性またはBAFF媒介性TACIシグナル伝達の阻害の最大半量阻害濃度(IC50)値を示す。それぞれの試験分子について、アタシセプト(Δアタシセプト)と比較した相対的遮断も括弧内に示した。

【0696】

(表E10-B) マルチドメイン免疫調節タンパク質対アタシセプトの生理活性

説明	SEQ ID NO	IC50 (nM) APRIL	IC50 (nM) APRIL (Δ TACI 30-110-Fc)	IC50 (nM) BAFF (Δ TACI 30-110-Fc)
381 BCMA-Fc	381	180	180(0.05)	1778(0.31)
406 BCMA-Fc	406	190	190(0.05)	1532(0.27)
411 BCMA-Fc	411	209	209(0.05)	781(0.14)
CTLA-4 186-GSG4S - Fc- (G4S)4 - BCMA 406	601	269	269(0.07)	2628(0.46)
356 BCMA-Fc	356	183	183(0.05)	823(0.14)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	610	272	272(0.07)	1259(0.22)
528 TACI CRD2-Fc	528	369	369(0.10)	1328(0.23)
TACI 13-118-Fc	719	9103	9103(2.37)	7699(1.33)
ベリムマブ		214911	214911(55.84)	2496(0.43)
TACI 30-110-Fc	718	3849	3849(1.00)	5771(1.00)

10

20

30

【0697】

実施例9. 野生型または親和性成熟BCMAまたはTACIドメインがスタックされた時の、CTLA-4によるCD28媒介性共刺激のCD80/CD86遮断の生理活性評価

本実施例は、細胞株に基づくインビトロバイオアッセイを用いた、CD80/CD86の遮断およびCD28媒介性共刺激の阻害による、CTLA-4を含有するWT、vIgD、またはスタックタンパク質の機能的特徴付けについて説明する。

【0698】

インターロイキン-2(IL-2)プロモーターによって駆動されるルシフェラーゼ発現Jurkat細胞を購入した(Promega)。ヒトT細胞白血病細胞株であるJurkat細胞は、T細胞受容体(TCR)-CD3複合体とCD28を内因的に発現する。CD80またはCD86と相互作用すると、CD28シグナル伝達はIL-2プロモーターの転写アップレギュレーションを媒介する。抗CD3によってJurkat細胞が活性化され、CD80またはCD86を介して共刺激されると、ルシフェラーゼが生成される。実施例6に記載のようにルシフェラーゼを定量した。人工抗原提示細胞(aAPC)を作製するために、細胞表面抗ヒトCD3(OKT3)単鎖断片可変(scFv)およびヒトCD80またはCD86を安定して発現するように、ヒト骨髓性白血病細胞株であるK562細胞に形質導入した(K562/OKT3/CD80またはCD86)。Jurkat/IL-2アッセイの模式図を図6に示した。

40

【0699】

CTLA-4 WTまたはvIgDドメインの生理活性を求めるために、これらのドメインを含

50

有するスタックタンパク質を漸増設定し(100nM~256pM)、33μLの培地(RPMI1640+5%FBS)が入っている96ウェル白色平底プレートにプレートした。タンパク質に、aAPCを33μLの培地中に 2×10^4 細胞/ウェルで添加し、振盪しながらRTで20分間インキュベートした。最終体積/ウェルが100uLになるように、Jurkat/IL-2細胞を 2×10^5 細胞/ウェルで添加した。APCとJurkat細胞を加湿5%CO₂インキュベーションチャンバーの中で、37℃で5時間インキュベートした。上記のようにプレートを処理し、ルミネセンスを定量した。CTLA-4 WTまたはvlgDまたはCTLA-4スタックの存在下で対照タンパク質と比べてRLUが減少したことは、Jurkat/IL-2細胞においてCD80またはCD86が遮断され、CD28媒介性共刺激が阻害されたことを表している。

【0700】

表E11は、CD80媒介性およびCD86媒介性のCD28シグナル伝達を阻害するための最大半量阻害濃度(IC50)の値を示す。各実験について、WT-CTLA-4-Fc参照対照アバタセプト(Δ親CTLA-4-Fc)との比較も示した。場合によっては、試験されたタンパク質はWT対照の親と比較せず、(-)で表されたか、IC50値は未決定(ND)であった。

【0701】

(表E11)マルチドメイン免疫調節タンパク質の生理活性

10

20

30

40

50

説明	SEQ ID NO	CD80 IC50 (nM)	CD80 IC50 (nM) (Δ 親 CTLA-4)	CD86 IC50 (nM) (Δ WT)	CD86 IC50 (nM) (Δ 親 CTLA-4)
CTLA-4 186 GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 381	603	26.1	26.1 (0.8)	11.9	11.9 (1.5)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 411	604	32.7	32.7 (1.0)	9	9.0 (1.1)
CTLA-4 186GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 405	605	70.1	70.1 (2.1)	10.8	10.8 (1.3)
CTLA-4 186– GSG4S – Fc- (G4S)4 – BCMA 406	601	25.2	25.2 (0.8)	8.1	8.1 (1.3)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	610	56.9	56.9 (1.7)	10.2	10.2 (1.2)
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	612	82.6	82.6 (2.5)	9	9.0 (1.1)
186 CTLA-4-Fc	186	33.6	33.6 (1.0)	8.2	8.2 (1.0)
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 381	606	9.4	9.4 (1.1)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 411	607	10.9	10.9 (1.3)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 405	608	5.7	5.7 (0.7)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	602	11.9	11.9 (1.4)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	611	10.3	10.3 (1.2)	ND	ND
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 (TACI 542	613	9.5	9.5 (1.1)	ND	ND
アバタセプト		8.6	8.6 (1.0)	ND	ND
CTLA-4 92 GSG4S Fc (G4S)2 BCMA 357	635	22.7	22.7 (-)	16.1	16.1 (-)

10

20

30

40

50

【 0 7 0 2 】

図7Aおよび7Bは、例示的な分子のさらなる結果を示す。WT CTLA-4 IgD(図7A)またはCTLA-4 vIgD(図7B)を含有する例示的な分子を対象にした、CD80およびCD86の遮断ならびにCD28媒介性共刺激の阻害。

【 0 7 0 3 】

合わせると、結果から、マルチドメインスタック分子は、CD28媒介性共刺激を、シングルドメインCTLA-4 ECD-Fc参照対照アバタセプトと同じように、または場合によってはシングルドメインCTLA-4 ECD-Fc参照対照アバタセプトより優れて遮断できることが分かる。詳細に述べると、CTLA-4 vIgDを含有するスタック分子は、野生型CTLA-

4と比較してCD86に対する親和性増加と一致する、CD86媒介性CD28共刺激を遮断する能力の大幅な改善を示した。

【0704】

実施例10. 初代濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)とB細胞の同時培養アッセイにおけるBCMAまたはTACIドメイン含有分子の生理活性評価

初代T細胞およびB細胞アッセイにおいて、WT BCMA-Fc、WT TACI-Fc、BCMA vTD-Fc、またはBCMAもしくはTACI vTDとCTLA-4 IgSFドメインとを含有する例示的なマルチドメインスタック分子の生理活性を試験した。実施例7および表E7に記載の例示的なマルチドメイン分子を試験した。

【0705】

初代細胞を、白血球低減システム(leukocyte reduction system)(LRS)コーン(Bloodworks Northwest)から得た。コーンを処理し、末梢血単核球(PBMC)を密度勾配遠心分離法によって単離した。全B細胞を、ネガティブセレクションキット(StemCell Technologies, カタログ番号17954)を用いて、製造業者供給のプロトコールに従ってPBMCから単離した。全CD4+T細胞を、ネガティブセレクションキット(StemCell Technologies, カタログ番号17952)を用いて全PBMCから単離した。CD4+T細胞をさらに精製して、CXCR5ポジティブセレクションを介してTfhを得た。「Do-It-Yourself」キット(StemCell Technologies, カタログ番号17699)を用いて、精製抗ヒトCXCR5抗体(Biolegend)を磁気粒子に結合させることでCXCR5ビーズを調製した。Tfh(CXCR5+CD4+T)細胞を製造業者供給のプロトコールに従って単離した。人工抗原提示細胞(aAPC)(K562/CD80)を、マイトマイシンC(100 µg/mL最終)で、37°Cで30分間固定することによって調製した。aAPCを、FBSを含有するRPMIで3回洗浄し、最終洗浄後に、無血清X-Vivo 15(商標)添加培地(1X GlutaMAX、1X ペニシリン-ストレプトマイシンを含有するX-Vivo 15(商標))に懸濁した。

【0706】

B細胞を、組換えIL-21(BioLegend, 80ng/ml最終)と共に50 µL培地中で、96ウェル組織培養処理プレートに5.5~7.0x10⁴細胞/ウェルでプレートした。Tfh細胞を50 µL中2.0~7.0x10³細胞/ウェルで添加した。WT BCMAまたはTACI、BCMA vTD、またはCTLA-4-Fc-BCMA/TACIマルチドメインスタックを含有するFc融合タンパク質を3つ組で、50 µL(100nM~32pM)に溶解して漸増設定し添加した。APCを、50 µL中で、可溶性抗CD3抗体(OKT3)(BioLegend, 10nM最終)と共に2.0~5.0x10³細胞/ウェルで添加した。プレートを5%CO₂、37°Cで7日間インキュベートした。

【0707】

Tfh-B細胞同時培養プレートを遠心分離し、上清を96ウェルポリプロピレンプレートに移し、分泌された免疫グロブリンを多重分析(MAGPIX(登録商標)System, Millipore EMD)によって測定できるまで-20°Cで凍結した。細胞回復と活性化を、2つの染色パネルを用いたフローサイトメトリー分析によって求めた。パネル1は、抗CD19-BUV395、抗CD38-BV421(またはBV785)、抗ヒトIgG-PE(またはAPC)、抗CD138-APC(またはPE)、抗IgD-BV605、抗IgM-PerCP-C5.5、抗CD3-BUV737、抗CD27-BV510、抗CD10-BV711、およびLIVE/DEAD(商標)Near-IR fixable stainを含有した。パネル2は、抗CD19-BUV395、抗ICOS-PE、抗CD40L-BV605、抗CD4-PerCP-Cy5.5、抗CD86-BV711(または抗CD19-BUV395の代わりに抗CD19-BV711)、および抗CD28-APC、ならびにLIVE/DEAD(商標)Near-IR fixable stainを含有した。以下の例外:抗ヒトIgG-PEおよび抗ヒトIgG-AF647を0.25 µg/mlで使用したことを除いて全ての抗体を1 µg/mlで使用した。抗CD19-BUV395を1:50に希釈し、抗CD3-BUV737を1:40に希釈して、それぞれの染色カクテルにした。細胞をLSRIIフローサイトメーター(BD Biosciences)で分析した。

【0708】

例示的なWT、vIgD、またはTACIもしくはBCMAとのCTLA-4スタックタンパク質について、CD40LおよびICOSアップレギュレーションの欠如により証明されるようなCD

10

20

30

40

50

4+T細胞回復および活性化の阻害を、図8A(CD4+T細胞回復)、図8B(CD4+CD40L+細胞回復)、および図8C(CD4+ICOS+細胞回復)に示した。本実施例では、全ての分子が同じCTLA-4 vIgDを含有した。T細胞活性の阻害は、TACIまたはBCMA TDを含有するCTLA-4含有マルチドメインスタック分子を含む、CTLA-4 IgSFドメインを含有する分子でしか観察されなかった。特定のCTLA-4 IgSFがシングルドメインとして用いられても、マルチドメインスタック分子の一部として含められても同様のT細胞阻害レベルが観察された。

【0709】

例示的なタンパク質について、CD86アップレギュレーションの欠如から証明されるような全B細胞回復およびB細胞活性化の阻害を、それぞれ、図8D(CD19+B細胞回復)および図8E(B細胞活性化/CD86アップレギュレーション)に示した。例示的なタンパク質について、B細胞からのIgM分泌の阻害を図8Fに示した。B細胞活性の阻害は、TACI vTDまたはBCMA vTDを含有するマルチドメインスタック分子でしか観察されなかった。

10

【0710】

実施例11. インビボKLH免疫化モデルにおける多特異性構築物の活性の評価

本実施例は、インビボでマウスにおけるキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に対する免疫応答に影響を及ぼすことを目的とした、例示的な試験されたマルチドメインスタックタンパク質(実施例7および表E7に記載)の評価について説明する。マウスKLH免疫化モデルを用いて、KLHを1回または2回注射した後に、T細胞依存性抗原KLHに対する抗原特異的応答に対する免疫調節分子の効果を評価することができる。それぞれ少なくとも7日間空けてKLHを2回注射すると、2回目の注射後の期間中に二次免疫応答を評価できるモデルが得られる。本実施例は、2回のKLH注射(1日目および13日目)に应答した、モル濃度一致レベルのFcアイソタイプ対照タンパク質およびアバタセプトと比較して前記マルチドメインスタック分子を評価した試験について説明する。マウスKLHモデルにおいて観察された試験物品の活性はヒトでの免疫調節効果を予測できることが多い。

20

【0711】

KLH試験を開始するために、10週齢雌C57/BL6NJマウス(The Jackson Laboratories, Sacramento, CA)を、それぞれ5匹のマウスからなる6つの群に無作為化し、表E12に概説したように、腹腔内(IP)注射を介して試験物品を投薬した(0日目、6日目、および12日目に投薬した)。1日目および13日目にマウスに0.25mgのKLH (EMD Millipore, Cat. 374825-25MG)を、IP注射を介して投与した。元の市販のKLH原液は、ダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)で4倍希釈した。3匹のマウスはナイーブ対照として未処置/未注射のままであった(群7)。

30

【0712】

(表E12)試験物品の説明および用法

40

50

群の 番号	マウス の数	試験物品	用量 レベル	用量体積 (mL/kg)	投与計画 (D = 試験日)	送達経路
1	5	Fc 対照	0.1mg	12.5	D0,6,12	IP
2	5	アバタセプト	0.17mg	12.5	D0,6,12	IP
3	5	CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 - BCMA 406 (SEQ ID NO: 601)	0.20mg	12.5	D0,6,12	IP
4	5	CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO: 610)	0.20mg	12.5	D0,6,12	IP
5	5	CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406 (SEQ ID NO: 602)	0.20mg	12.5	D0,6,12	IP
6	5	CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO: 611)	0.20mg	17.5	D0,6,12	IP
7	3	なし(ナイーブ対照)	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A=該当なし

【0713】

19日目に、全てのマウスにイソフルランで麻酔をかけ、血液を血清セパレーターチューブに収集した。マウスを 殺し、その脾臓を取り出し、秤量し、氷上でDPBSに入れた。全血を遠心分離し、血清を取り出し、酵素結合免疫測定法(ELISA)による抗KLHレベル分析まで-80℃で保管した。脾臓を処理してシングル細胞懸濁液にし、赤血球(RBC)を RBC Lysis Buffer(Biolegend, Cat. 420301)を用いて製造業者の説明書に従って溶解し、アクリジンオレンジ/ヨウ化プロピジウム(AO/PI)染色(Nexcelom, Cat. CS2-0106-5mL)を用いた二重蛍光生存率を用いて各試料中の細胞を計数した。

【0714】

次いで、免疫細胞サブセットをフローサイトメトリー分析するために、以下の方法を用いて、それぞれの脾臓試料を染色した。1x10⁶個の生細胞を2つの96ウェルプレート(Corning, Cat. 3797;1つのプレートはB細胞特異的パネル用であり、1つのプレートはT細胞特異的パネル用である)のウェルに入れ、1500xgで10秒間遠心分離し、上清を除去し、細胞ペレットをDPBSで2回洗浄した。ペレットを100μLのlive-dead stain(LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, Life Technologies Corp.,DPBSで1:1000希釈)に再懸濁し、暗所、室温で10分間インキュベートした。フローサイトメトリー用緩衝液で2回洗浄した後に(それぞれ175μL)、腫瘍ペレットをMouse BD Fc Block(フロー緩衝液で1:50希釈した)に再懸濁し、暗所、RTでさらに5分間インキュベートした。これ以上洗浄することなく、以下のフローサイトメトリー用抗体のカクテル(フローサイトメトリー用緩衝液で希釈した)50μLを、B細胞またはT細胞パネルの細胞の各ウェルに添加した。B細胞パネルについては、カクテルのために以下の抗体:抗マウスCD19 BUV395(クローン1D3, Becton-Dickinson; 1:100)、抗マウスCD138 BV421(クローン281-2, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD3ε BV510(クローン17A2, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスIgD BV605(クローン11-26c.2a, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスB220 BV785(クロ

ー ンRA3-6B2, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD95 FITC(クロー
 ンSA367H8, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD23 PerCP Cy5.5(
 クローンB3B4, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスGL7 PE(クローンGL
 7, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスGr1 PE Cy7(クローンRB6-8C5,
 BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD21 APC(クローン7E9, BioLege
 nd Inc.; 1:100、最終濃度)、および抗マウスIgM APC Cy7(クローンRMM-1, BioL
 egend Inc.; 1:100、最終濃度)を組合わせた。T細胞パネルについては、カクテルのた
 めに以下の抗体:抗マウスPD-1 BV421(クローン29F.1A12, BioLegend Inc.; 1:10
 0、最終濃度)、抗マウスCD11b BV510(クローンM1/70, BioLegend Inc.; 1:100
 、最終濃度)、抗マウスCD3 ϵ BV605(クローン145-2C11, BioLegend Inc.; 1:10
 0、最終濃度)、抗マウスCD8 BV785(クローン53-6.7, BioLegend Inc.; 1:100、
 最終濃度)、抗マウスCD44 FITC(クローンIM7, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度
)、抗マウスCD4 PerCP Cy5.5(クローンGK1.5, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃
 度)、抗マウスCD62L PE(クローンMEL-14, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、
 抗マウスCXCR5 PE Dazzle(クローンL138D7, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度
)、抗マウスCD25 PE Cy7(クローンPC61.5, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)
 、および抗マウスCD45 AF700(クローン30-F11, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃
 度)を組合わせた。細胞を暗所、氷上で抗体カクテルのうちの1つと45分間穏やかに混合
 しながらいんキュベートし、その後フローサイトメトリー用緩衝液で2回洗浄した(1回
 の洗浄につき175 μ L)。細胞ペレットを200 μ Lのフローサイトメトリー用緩衝液に再懸
 濁し、LSRIIフローサイトメーターで収集した。データを、FlowJoソフトウェアバー
 ジョン10.2(FlowJo LLC, USA)を用いて解析し、GraphPad Prismソフトウェア(バー
 ジョン8.1.2)を用いてグラフ化した。重要な細胞サブセット特定分析は、全B細胞(B22
 0⁺細胞)、辺縁帯(MZ)B細胞(B220⁺、CD19⁺、CD23⁻、CD21^{high}、IgM^{high}細胞)、
 胚中心(GC)B細胞(B220⁺、CD19⁺、GL7⁺、CD95⁺細胞)、T濾胞性ヘルパー(Tfh)細
 胞(CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、PD1⁺、CD185⁺細胞)、CD4⁺Tエフェクターメモリー(Te
 m)細胞(CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、CD44⁺、CD62L⁻細胞)、およびCD8⁺Tem細胞(CD4
 5⁺、CD3⁺、CD8⁺、CD44⁺、CD62L⁻細胞)を含んだ。

10

20

30

40

50

【0715】

全分析について群間の統計的有意差($p < 0.05$)を、GraphPad Prismソフトウェア(
 バージョン8.1.2)を用いて、一元配置分散分析(ANOVA)または独立スチューデントt検
 定によって求めた。

【0716】

Fcアイソタイプ対照(SEQ ID NO:589)と比較してマルチドメインスタック分子がKL
 H媒介性抗体免疫応答を阻害した程度を確かめるために、2回のELISAアッセイのうちの
 1回で血清試料の抗KLH抗体濃度を評価した。このELISAアッセイでは、血清中のIgM特
 異的またはIgG1特異的抗KLHレベルのいずれかを測定し、何度か希釈したマウス血清試
 料を、KLHでコーティングしたプレート中でインキュベートした後に洗浄し、1:2000
 ヤギ抗マウスIgG1:HRPまたは1:5000ヤギ抗マウスIgM:HRPを用いて検出するアッセ
 イを利用した。TMB Substrate Kit (SeraCare)を用いて発色させ、ELISAプレート
 をプレートリーダーによって分析した(EMax(登録商標)Plus Microplate Reader, M
 olecular Devices LLC)。このアッセイには検量線はなく、従って、光学密度(OD)を
 使用して抗KLH抗体レベルを比較した。ODが大きければ大きいほど、血清試料中にある
 抗KLH抗体レベルが高くなる。抗KLH IgM ODレベルについては、データを図9に示し
 、一元配置ANOVAおよびチューキー多重比較検定による統計解析を表E13に示した。抗
 KLH IgG1 ODレベルを図10に示し、一元配置ANOVAおよびチューキー多重比較検定
 による統計解析を表E14Aに示した。結果から、試験された各マルチドメインスタック分
 子のそれぞれが、Fc対照処置と比較して血清中の抗KLH IgMレベルを有意に低減できた
 ことが証明される。CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)
 は全ての試験物品の中で最大の低減を示した。アバタセプト処置はFc対照処置と比較し

て血清中抗KLH IgMレベルのレベルに影響を及ぼさなかった。試験されたマルチドメインスタック分子のそれぞれが、Fc対照と比較して抗KLH IgG1レベルも有意に低減することができ、CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 (SEQ ID NO:610)はまたしても最大の低減を示した。アバタセプトも血清中の抗KLH IgG1レベルを有意に低減することができたが、例示的なマルチドメインスタック分子はアバタセプトよりも有効であったか、またはアバタセプトより劇的な低減を誘導した(図10)。これらの結果から、これらのマルチドメインスタック分子はT細胞依存性抗体免疫応答を低減する効果があり、多くの自己免疫疾患および炎症疾患に対する市販の承認された治療剤であるアバタセプトと同じように、ならびにアバタセプトよりも良好にT細胞依存性抗体免疫応答を低減することが分かる。

10

【0717】

(表E13) 抗KLH IgM ODレベルの統計解析

比較	p値
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0.05
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0.0001
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.01
Fc対照 対 ナイーブ	<0.001
CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	<0.0001
CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	=0.0115
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0.0035
CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406 対 ナイーブ	<0.001

20

30

【0718】

(表E14A) 抗KLH IgG1 ODレベルの統計解析

比較	p値
Fc対照 対 アバタセプト	=0.0024
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	=0.0044
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0.0006
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	=0.0017
Fc対照 対 ナイーブ	=0.0032

40

50

【0719】

図11に示したように、CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)で処置したマウスの、本試験終了時(19日目)の脾臓は、Fc対照処置マウスと比較して有意に小さく(t検定により $p < 0.001$)、同様に、CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:611)で処置したマウスの脾臓も、Fc1.1処置マウスと比較して有意に小さかった(t検定により $p = 0.01$)。マルチドメインスタック分子CTLA-4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-BCMA 406(SEQ ID NO:601)で処置したマウスの脾臓は、Fc1.1処置マウスと比較して小さくなる傾向があったが、この差は完全に統計的な差ではなかった(t検定により $p = 0.087$)。Fcアイソタイプ対照処置マウスと、ナイーブマウスまたはアバタセプトもしくはCTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc(G4S)4 BCMA 406(SEQ ID NO:602。SEQ ID NO:601のマルチドメインスタック分子と同じBCMA vTDを含むが、vIgDの代わりにWT CTLA-4 IgDを含有する)で処置したマウスとの間に差はなかった。小さな脾臓はリンパ球の低減を示しており、このことは、増大した免疫応答、特に、B細胞および/またはT細胞によって引き起こされる増大した免疫応答に関連する自己免疫疾患および炎症疾患の発病に対する免疫調節効果を有する可能性がある。脾臓重量の統計解析を表E14Bに示した。

【0720】

(表 E 1 4 B) 脾臓重量の統計解析

脾臓重量	p値
Fc対照 対 CTLA4 186 GSG4S Fc1.1 (G4S)4 TACI 541	0.0040
アバタセプト 対 CTLA4 186- GSG4S - Fc1.1- (G4S)4 - BCMA 406	0.0025
アバタセプト 対 CTLA4 186 GSG4S Fc1.1 (G4S)4 TACI 541	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA4 WT ECD 1 GSG4S Fc1.1 (G4S)4 TACI 541	0.0021

【0721】

これらの方針に従って、自己免疫疾患および炎症疾患の発病にとって特に重要なものは、B細胞の生存および分化、抗体産生、ならびにT細胞エフェクターメモリーを促進する細胞タイプである。これらの細胞タイプには、以下:B細胞、辺縁帯(MZ)B細胞、胚中心(GC)B細胞、T濾胞性ヘルパー(Tfh)細胞、ならびにCD4⁺およびCD8⁺Tエフェクターメモリー(T_{em})細胞が含まれるが、これに限定されない。作用機序が、これらの細胞タイプの低減を含む治療剤は非常に多くの自己免疫疾患および炎症疾患の処置において効果があると期待されるだろう。図12A~12Hに示したように、ある特定の試験されたマルチドメインスタック分子は、Fcアイソタイプ対照(SEQ ID NO:589)と比較した場合に、B細胞、MZ B細胞、GC B細胞、およびTfhのパーセントと脾臓あたりの数を低減することができ、CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)がバリエーションの中で最も強力なバリエーションであり、これにCTLA-4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-BCMA 406(SEQ ID NO:601)、次に、WT CTLA-4 IgDとTACI vTDを含むCTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:611)が続いた。これらのマルチドメインスタック分子は、B細胞の生存および分化ならびに抗体産生において重要な、これらの集団のパーセントまたは数を低減する能力の点でアバタセプトと同じくらい有効であったか、またはアバタセプトよりも優れていた。Fc対照またはアバタセプトと比較した例示的なマルチドメインスタック分子の統計解析を表E15に示した。

【0722】

(表 E 1 5) 統計解析

10

20

30

40

50

比較	<i>p</i> 値
生細胞に対する%としてのB220+細胞	
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0.0001
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0.0344
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0002
B細胞に対する%としての辺縁帯(MZ)B細胞	
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0082
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0007
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
生B細胞に対する%としての胚中心B細胞	
Fc対照 対 アバタセプト	0.0065
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0085
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0016
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0663

10

20

30

40

50

比較	p値
アバタセプト 対 CTLA-4 WT ECD1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0.0006
CD4+細胞に対する%としてのCD4+T濾胞性ヘルパー(Tfh)細胞	
Fc対照 対 アバタセプト	0.0341
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0005
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0018
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0065
B220+細胞数/脾臓 (x10 ⁶)	
Fc対照 対 アバタセプト	0.0092
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.022
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0028
Fc対照 対 ナイーブ	0.0162
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0001
辺縁帯(MZ)細胞数/脾臓 (x10 ⁶)	
Fc対照 対 アバタセプト	0.0009
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0312
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0028

10

20

30

40

50

比較	p値
Fc対照 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0385
Fc対照 対 ナイーブ	0.0044
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0.0057
アバタセプト 対 CTLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
胚中心(GC)B細胞数/脾臓 (x10 ⁶)	
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0246
アバタセプト 対 TLA-4 WT ECD 1 GSG4S Fc (G4S)4 BCMA 406	0.0161
CD4+T濾胞性ヘルパー(Tfh)細胞数/脾臓 (x10 ⁶)	
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0376
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0083
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0268
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0057

【 0 7 2 3 】

図13A～13Dに示したように、CTLA-4 vIgDおよびTACIまたはBCMA vTDを含有するマルチドメインスタック分子は、Fcアイソタイプ対照およびアバタセプトと比較した場合に、CD4⁺およびCD8⁺T_{em}細胞のパーセントおよび脾臓あたりの数を低減することができた。従って、これらの結果から、例示的な試験されたマルチドメインスタック分子は、脾臓内にある、これらの重要なエフェクターメモリー集団のパーセントまたは数を低減する能力の点でアバタセプトと少なくとも同じくらい有効であり、多くの場合、アバタセプトよりも有効なことが分かる。Fc対照またはアバタセプトと比較した例示的なマルチドメインスタック分子の統計解析を表E16に示した。

【 0 7 2 4 】

(表 E 1 6) 統計解析

10

20

30

40

50

比較	p 値
CD4+T細胞に対する%としてのCD4+Tem細胞	
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0035
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	<0.0001
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0392
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0004
CD8+T細胞に対する%としてのCD8+Tem細胞	
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0393
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0042
Fc対照 対 ナイーブ	0.0072
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0348
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0037
アバタセプト 対 ナイーブ	0.0064
CD4+ Tem 細胞数/脾臓 (x10 ⁶)	
Fc対照 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0771
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0172
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0038
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0006
CD8+ Tem 細胞数/脾臓 (x10 ⁶)	
Fc対照 対 Abatacept	0.0135
Fc対照 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0866
アバタセプト 対 CTLA-4 186- GSG4S - Fc- (G4S)4 BCMA 406	0.0002
アバタセプト 対 CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541	0.0002
アバタセプト 対 ナイーブ	0.0028

10

20

30

40

【 0 7 2 5 】

合わせると、これらの結果から、T細胞活性とB細胞活性を両方とも阻害するマルチドメインスタック分子は、インビボでT細胞依存性抗原KLHによって媒介される免疫応答と細胞サブセット変化(すなわち、血清中の抗KLHレベルと免疫細胞サブセットの変化)を低減できることが分かる。これらの結果は、活動亢進性リンパ球が役割を果たす自己免疫疾患および炎症疾患の処置における有効な治療剤としてのCTLA-4およびBCMA/TACIマルチドメインスタックタンパク質の使用と一致している。

【 0 7 2 6 】

実施例12. インビボマウス狼瘡モデルにおける多特異性構築物の活性の評価

50

本実施例は、インビボマウス(NZB/NZW)F1自然発症狼瘡モデルにおいて免疫応答に影響を及ぼすことを目的とした、例示的なCTLA-4 vIgD-Fc分子、およびCTLA-4 vIgDドメインと共にTACI vTDを含有する例示的なマルチドメインスタック分子(実施例7および表E7に記載)の評価について説明する。(NZBxNZW)F1マウスはヒトSLEとよく似た自己免疫疾患を自然発症し、この疾患の最良のマウスモデルの1つだとみなされている。20週齢ごろから(NZB/NZW)F1マウスの抗dsDNA抗体の循環濃度は高くなり、疾患の最初の臨床徴候は23週齢ごろに検出可能になる。このマウスは、溶血性貧血、タンパク尿、および糸球体基底膜中の免疫複合体沈着によって媒介される進行性糸球体腎炎を発症する。

【0727】

(NZB/NZW)F1マウスに、14mg/kgのFc対照、またはモル濃度一致量のCTLA-4 vIgD-Fc(186 CTLA-4-Fc)(21mg/kg)もしくはTACI vTDとCTLA-4 vIgDを含有する例示的なマルチドメインスタックFc融合分子(「CTLA-4 vIgD-Fc-TACI vTD」)(CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541)(25mg/kg)を、腹腔内(IP)注射によって週2回投薬した。処置は群の割り当てから開始し(22週齢)、本試験の終了まで継続した。本試験はマウスが43週齢になった時に終了したが、一部の動物は、本試験ではそれより早く瀕死状態になった時に安楽死させた。

【0728】

20~40週齢の様々な時点で尿と血清試料を収集した。マウスが20週齢になった時から、試験時の全マウスからの尿中タンパク質の濃度を、尿検査用細片(Roche Chemstri p 2 GP, cat. 11895397160)を用いて毎週求めた。各処置群における経時的な平均タンパク尿スコアを図14Aに示し、各群における平均パーセント体重変化(重量減少は進行性疾患と関連する)を図14Bにプロットした。各処置群におけるマウスのパーセント生存率を図14Cにプロットした。抗二本鎖(ds)DNA IgG 血清力価は、Hooke Laboratories, Inc. (Lawrence, MA)によって社内キットを用いて測定された。結果を図14Dに示した。進行性疾患があるこれらのマウスでは、血中尿素窒素(BUN)レベルは増加する。各処置群の本試験終了時(または早期に屈したマウスの 殺時)のBUNレベルを図14Eに示した。統計解析は、未修正のダン検定を用いて行った。**は $p=0.0047$ および $p=0.0065$ を示す。***は $p=0.0004$ を示す。

【0729】

終了時に腎臓を各マウスから収集し、Alperovich G et al, 2007. Lupus 16:18-24に記載の判断基準を用いて、複製した過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色切片において組織学的に分析した。処置と臨床スコアを知らない病理学者が全ての腎臓切片を盲検法で分析した。糸球体病変部(糸球体間質拡大、管内性増殖、糸球体沈着物、および管外性増殖)ならびに尿細管/間質病変部(間質性浸潤物、尿細管萎縮、および間質性線維症)を分析し、0~3のスコアリングシステムを用いて半定量的に段階分けした。0=変化なし、1=軽度の変化、2=中程度の変化、および3=重度の変化。各マウスの全組織学的スコアを個々のスコアの合計として計算した(全スコアの最大は21である)。全糸球体病変部、全尿細管・間質病変部、ならびに全腎臓病変部の腎臓スコアを図14Fに示した。Fc対照処置マウスと比較した場合、有意に改善した腎臓組織病理学が、CTLA-4 vIgD-Fcで処置した動物(全腎臓病変部については $p=0.0068$ 対Fc群)、またはCTLA-4 vIgD-Fc-TACI vTDで処置した動物($p<0.0001$ 対Fc群)において観察された。

【0730】

図14G~14Hについては、試験終了時に各マウスから右腎臓を収集し、秤量し、横断的に解剖し、1個のオプティマルカッティングテンプレートコンパウンド(optimal cutting temperature compound)(OCT)ブロックの形で凍結した後に切片化し、糸球体IgGおよびC3沈着を評価する目的で、それぞれ、マウスIgGおよびマウス補体C3を免疫組織化学的(IHC)染色した。腎臓切片をアセトンで透過処理し、Primary Antibody Diluent(Leica Biosystems)で1:25希釈したFITC結合ラットモノクローナル抗マウス補体成分C3(Cedarlane)またはPrimary Antibody Diluentで1:200希釈したAF5

10

20

30

40

50

94結合ヤギ抗マウスIgG(Thermo Fisher Scientific)で染色した。病理学者がIgGおよびC3の糸球体沈着を0~4の半定量的スコアリングシステムを用いて分析した。Kelkka et al.(2014) Antioxid Redox Signal. 21:2231-45に記載の方法に基づいて、0=沈着物なし、1=軽度の糸球体間質性沈着、2=著しい糸球体間質性沈着、3=糸球体間質性沈着およびわずかな毛細血管性沈着、および4=強い糸球体間質性沈着とメサングウム毛細管性沈着。Fc対照処置マウスと比較した場合、有意に低減した糸球体IgGおよびC3が、186 CTLA-4 vIgD-Fcで処置した動物(IgG沈着物については $p=0.0084$ 対Fc対照群、C3沈着物については $p=0.0007$)、またはCTLA-4 186-GSG4S-Fc(G4S)4-TACI 541(IgGについては $p<0.0001$ 対Fc対照群、C3については $p=0.0053$)で処置した動物において観察された。クラスカル・ウォリス(ノンパラメトリック)検定の後に、未修正のダン多重比較検定を用いて、統計的有意差があるかどうかデータを解析した。

10

【0731】

結果から、CTLA-4 vIgD単独、またはCTLA-4 vIgDとTACI vTDとを含有するマルチドメイン免疫調節Fcタンパク質はそれぞれが、SLEの(NZB/NZW)F1マウスモデルにおいて有意にタンパク尿を抑制し、体重を維持し、全生存期間を延ばし、抗dsDNA自己抗体およびBUNを低減し、IgGおよびC3腎臓沈着物を低減し、腎臓疾患を予防または改善することができたと証明される。例示的な分子はまた、これらのマウスの脾臓およびリンパ節にある形質細胞、濾胞性Tヘルパー細胞、胚中心細胞、およびメモリーT細胞を含むB細胞およびT細胞サブセットを強力に低減することもできた(データは示さない)。

20

【0732】

実施例13: インビボKLH免疫化モデルにおける多特异性構築物の比較評価

本実施例は、インビボでマウスでのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に対する免疫応答に影響を及ぼすことを目的とした、例示的な試験されたシングルドメインFc融合タンパク質ならびに1つのマルチドメインスタックタンパク質(実施例6、実施例7、および表E7に記載)の評価について説明する。マウスKLH免疫化モデルを用いて、KLHを1回または2回注射した後に、T細胞依存性抗原KLHに対する抗原特異的応答に対する免疫調節分子の効果を評価することができる。それぞれ少なくとも7日間空けてKLHを2回注射すると、1回目のKLH注射後に一次免疫応答、2回目の注射後の期間中に二次免疫応答を評価できるモデルが得られる。本実施例は、アジュバントなしの2回のKLH注射(試験0日目および12日目)に应答した、複数のBCMAシングルドメイン含有分子、例えば、Fc融合体として整えられた可溶性野生型(WT)またはバリエーションBCMA vTDならびにマルチドメインスタック分子CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541の活性を評価した試験について説明する。これらの試験物品をモル濃度一致レベルのFcアイソタイプ対照タンパク質またはアバタセプト(WT CTLA-4-Fc)の投与と比較した。マウスKLHモデルにおいて観察された試験物品の活性はヒトでの免疫調節効果を予測できることが多い。

30

【0733】

KLH試験を開始するために、10週齢雌C57/BL6NJマウス(The Jackson Laboratories, Sacramento, CA)を、それぞれ5匹のマウスからなる12の群に無作為化した。0日目および12日目にマウスに0.25mgのKLH(EMD Millipore, Cat. 374825-25MG)を腹腔内(IP)注射によって投与した。注射前に、最初の市販のKLH原液をダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)で適切な濃度まで希釈した。表E17に概説したようにIP注射によって試験物品をマウスに投与した(4日目および11日目に投与した)。6匹のマウスはナীব対照として未処置/未注射のままであった(群13)。5日目(1回目の投与の24時間後)、12日目(2回目の投与の24時間後/KLH追加免疫前)、および20日目に、薬物曝露、ADA、および/または抗KLH抗体レベルを評価するために血清を収集した。群10の一匹の動物には不完全用量の試験物品を与えられ、従って、試験から除外された。

40

【0734】

(表E17)試験物品の説明および用法

50

群の 番号	マウス の数	試験物品	用量レベル (mg/用量)	(mg/kg)	投与計画 (D = 試験日)	送達 経路
1	5	Fc対照	0.225	11.3	D4 および D11	IP
2	5	アパタセプト (WT hCTLA-4-Fc)	0.342	17.1	D4 および D11	IP
3	5	186 CTLA-4 vIgD-Fc	0.346	17.3	D4 および D11	IP
4	5	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.400	20	D4 および D11	IP
5	5	TACI 30-110 - Fc	0.306	15.3	D4 および D11	IP
6	5	TACI 13-118 - Fc	0.327	16.4	D4 および D11	IP
10	4	406 BCMA -Fc	0.278	13.9	D4 および D11	IP
11	5	381 BCMA -Fc	0.278	13.9	D4 および D11	IP
12	5	411 BCMA -Fc	0.279	13.9	D4 および D11	IP
13	6	なし (ナイーブ)	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A=該当なし

【0735】

20日目に、全てのマウスにイソフルランで麻酔をかけ、血液を血清セパレーターチューブに収集した。マウスを 殺し、その脾臓を取り出し、秤量し、氷上でDPBSに入れた。全血を遠心分離し、血清を取り出し、酵素結合免疫測定法(ELISA)による抗KLHレベル分析まで-80℃で保管した。脾臓を処理してシングル細胞懸濁液にし、赤血球(RBC)をRBC Lysis Buffer(Biolegend, Cat. 420301)を用いて製造業者の説明書に従って溶解し、アクリジンオレンジ/ヨウ化プロピジウム(AO/PI)染色(Nexcelom, Cat. CS2-0106-5mL)を用いた二重蛍光生存率を用いて各試料中の細胞を計数した。

【0736】

次いで、免疫細胞サブセットをフローサイトメトリー分析するために、以下の方法を用いて各脾臓試料を染色した。1x10⁶個の生細胞を2つの96ウェルプレート(Corning, Cat. 3797;1つはB細胞特異的パネル用プレートであり、1つはT細胞特異的パネルプレートである)のウェルに入れ、1500xgで10秒間遠心分離し、上清を除去し、細胞ペレットをDPBSで2回洗浄した。ペレットを100μLのlive-dead stain(LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, Life Technologies Corp.,DPBSで1:1000希釈)に再懸濁し、暗所、室温で10分間インキュベートした。フローサイトメトリー用緩衝液で2回洗浄した後に(それぞれ175μL)、腫瘍ペレットをMouse BD Fc Block(フロー緩衝液で1:50希釈した)に再懸濁し、暗所、RTでさらに5分間インキュベートした。これ以上洗浄することなく、以下のフローサイトメトリー用抗体のカクテル(フローサイトメトリー用緩衝液で希釈した)50μLをB細胞またはT細胞パネルの細胞の各ウェルに添加した。B細胞パネルについては、カクテルのために以下の抗体:抗マウスCD19 BUV395(クローン1D3, Becton-Dickinson; 1:100)、抗マウスCD138 BV421(クローン281-2, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD3ε BV510(クローン17A2, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスIgD BV605(クローン11-26c.2a, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスB220 BV785(クローンRA3-6B2, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD95 FITC(クローンSA367H8, BioLeg

end Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD23 PerCP Cy5.5(クローンB3B4, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスGL7 PE(クローンGL7, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスGr1 PE Cy7(クローンRB6-8C5, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD21 APC(クローン7E9, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、および抗マウスIgM APC Cy7(クローンRMM-1, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)を組合わせた。T細胞パネルについては、カクテルのために以下の抗体:抗マウスPD-1 BV421(クローン29F.1A12, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD11b BV510(クローンM1/70, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD3ε BV605(クローン145-2C11, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD8 BV785(クローン53-6.7, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD44 FITC(クローンIM7, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD4 PerCP Cy5.5(クローンGK1.5, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD62L PE(クローンMEL-14, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCXCR5 PE Dazzle(クローンL138D7, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、抗マウスCD25 PE Cy7(クローンPC61.5, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)、および抗マウスCD45 AF700(クローン 30-F11, BioLegend Inc.; 1:100、最終濃度)を組合わせた。細胞を暗所、氷上で抗体カクテルのうちの1つと45分間穏やかに混合しながらインキュベートし、その後にフローサイトメトリー用緩衝液で2回洗浄した(1回の洗浄につき175 μL)。細胞ペレットを200 μLのフローサイトメトリー用緩衝液に再懸濁し、LSRIIフローサイトメーターで収集した。データを、FlowJoソフトウェアバージョン10.2(FlowJo LLC, USA)を用いて解析し、GraphPad Prismソフトウェア(バージョン8.1.2)を用いてグラフ化した。重要な細胞サブセット特定分析は、全B細胞(B220⁺細胞)、辺縁帯(MZ)B細胞(B220⁺、CD19⁺、CD23⁻、CD21^{high}、IgM^{high}細胞)、胚中心(GC)B細胞(B220⁺、CD19⁺、GL7⁺、CD95⁺細胞)、T濾胞性ヘルパー(Tfh)細胞(CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、PD-1⁺、CD185⁺細胞)、CD4⁺Tエフェクターメモリー(T_{em})細胞(CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、CD44⁺、CD62L⁻細胞)、およびCD8⁺T_{em}細胞(CD45⁺、CD3⁺、CD8⁺、CD44⁺、CD62L⁻細胞)を含んだ。

【0737】

群間の統計的有意差($p < 0.05$)を、GraphPad Prismソフトウェア(バージョン8.1.2)を用いて、一元配置分散分析(ANOVA)と、未修正のフィッシャー最小有意差(LSD)多重比較検定によって求めた。

【0738】

Fcアイソタイプ対照(SEQ ID NO:589)と比較して試験物品がKLH媒介性抗体免疫応答を阻害した程度を確かめるために、2回のELISAアッセイで血清試料の抗KLH抗体濃度を評価した。このELISAアッセイでは、血清中のIgM特異的またはIgG1特異的抗KLHレベルのいずれかを測定した。何度か希釈したマウス血清試料を、KLHでコーティングしたプレート中でインキュベートした後に洗浄し、1:2000ヤギ抗マウスIgG1:HRPまたは1:5000ヤギ抗マウスIgM:HRPを用いて検出した。TMB Substrate Kit(SeraCare)を用いて発色させ、ELISAプレートをプレートリーダーによって分析した(SpectraMax(登録商標)iD3マイクロプレートリーダー, Molecular Devices LLC)。このアッセイには検量線はなく、従って、光学密度(OD)を使用して抗KLH抗体レベルを比較した。ODが大きければ大きいほど、血清試料中にある抗KLH抗体レベルが高くなる。抗KLH IgM ODレベルについて、データを図18A(一次応答)、図18B(二次応答)に示し、一元配置ANOVAおよび未修正のフィッシャーLSD多重比較検定による統計解析を、それぞれ、表E18および表E19に示した。抗KLH IgG1 ODレベルを図18C(一次応答)、図18D(二次応答)に示し、一元配置ANOVAおよび未修正のフィッシャーLSD多重比較検定による統計解析を表E18~E21に示した。結果から、各試験物品は一次免疫応答中にFc対照処置と比較して血清中の抗KLH IgMレベルを有意に低減できたことが証明される。CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)は全ての試験物品の中で最大の低減を示し、アバタセプト処置の効果は最も控えめであった(図18A)。2回目の最後の試

10

20

30

40

50

験物品投薬の9日後に測定した20日目の二次応答については、TACI 13-118-Fcおよび406 BCMA-Fcを除く全ての試験物品が抗KLH IgMレベルの有意な低減を誘導し、CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)は最大の低減を示した(図18B)。各試験物品はまた、一次免疫応答中にFc対照と比較して抗KLH IgG1レベルも有意に低減することができ、CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)はまたしても最大の低減を示した(図18C)。KLHに対する二次応答について、TACI 30-110-Fc、TACI 13-118-Fc、および411 BCMA-Fcを除く全ての試験物品が抗KLH IgG1のレベルを有意に低減した(図18D)。これらの結果から、BCMA vTDを含有する分子のほとんどが、KLHに対するT細胞依存性抗体免疫応答を低減する効果があったことが分かる。CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)および381 BCMA-Fcは、このマウス免疫化モデルにおいて最も有意な効果を示した。

10

【0739】

(表E18) 抗KLH IgM ODレベルの統計解析(一次応答; 図18A)

比較	p値	有意か?
Fc対照 対 アバタセプト	0.0167	有意
Fc対照 対 186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0001	有意
Fc対照 対 TACI 30-110 - Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 TACI 13-118 - Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 406 BCMA -Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 381 BCMA -Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 411 BCMA -Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 ナイープ	<0.0001	有意

20

30

【0740】

(表E19) 抗KLH IgM ODレベルの統計解析(二次応答; 図18B)

比較	p値	有意か?
Fc対照 対 アバタセプト	<0.0001	有意
Fc対照 対 186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0001	有意
Fc対照 対 TACI 30-110 - Fc	0.0283	有意
Fc対照 対 TACI 13-118 - Fc	0.4653	有意でない
Fc対照 対 406 BCMA -Fc	0.0971	有意でない
Fc対照 対 381 BCMA -Fc	0.0032	有意
Fc対照 対 411 BCMA -Fc	0.0218	有意
Fc対照 対 ナイープ	<0.0001	有意

40

【0741】

50

(表 E 2 0) 抗KLH IgG1 ODレベルの統計解析(一次応答;図18C)

比較	p値	有意か?
Fc対照 対 アバタセプト	0.0457	有意
Fc対照 対 186 CTLA-4 vIgD-Fc	0.0057	有意
Fc対照 対 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0001	有意
Fc対照 対 TACI 30-110 - Fc	0.0218	有意
Fc対照 対 TACI 13-118 - Fc	0.0093	有意
Fc対照 対 406 BCMA -Fc	0.0039	有意
Fc対照 対 381 BCMA -Fc	0.0006	有意
Fc対照 対 411 BCMA -Fc	0.0002	有意
Fc対照 対 ナイープ	<0.0001	有意

10

【0742】

(表 E 2 1) 抗KLH IgG1 ODレベルの統計解析(二次応答;図18D)

比較	p値	有意か?
Fc対照 対 アバタセプト	<0.0001	有意
Fc対照 対 186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0.0001	有意
Fc対照 対 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0001	有意
Fc対照 対 TACI 30-110 - Fc	0.5367	有意でない
Fc対照 対 TACI 13-118 - Fc	0.1477	有意でない
Fc対照 対 406 BCMA -Fc	0.0397	有意
Fc対照 対 381 BCMA -Fc	0.0286	有意
Fc対照 対 411 BCMA -Fc	0.8374	有意でない
Fc対照 対 ナイープ	<0.0001	有意

20

30

【0743】

図19Aおよび19Bに示したように、TACI 30-110-FcまたはTACI 13-118-Fcを除く全ての試験物品で処置したマウスの脾臓は、本試験の終了時(20日目)に重量および細胞数で評価した場合、それぞれ、Fc対照処置マウスと比較して有意に小さく(表E22)、全処置群の中でCTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)で処置したマウスの脾臓が最も小さかった。186 CTLA-4 vIgD-Fcを除く試験物品のそれぞれで処置したマウスの脾臓細胞数もFc対照群より有意に少なく、全処置群の中で、CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)で処置したマウスの脾細胞数が最も少なかった。脾臓が小さいほどリンパ球が少ないことを示しており、免疫応答の増大に関連した自己免疫疾患および炎症疾患、特に、B細胞および/またはT細胞によって引き起こされる免疫応答の増大に関連した自己免疫疾患および炎症疾患の発病に対して免疫調節効果がある可能性がある。脾臓重量および総細胞数の統計解析を、それぞれ、表E22および表E23に示した。

40

50

【 0 7 4 4 】

(表 E 2 2) 全処置群にわたる脾臓重量の統計学的比較 (図 19 A)

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA -4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 130- 110 - Fc	TACI 13- 118 - Fc	406 BCMA A -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
アバタセプト	0.00 84								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0.00 56	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0 001	0.003 3	0.0124						
TACI 30-110 - Fc	ns	0.022 8	0.0148	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	ns	0.041 5	0.0267	<0.0001	ns				
406 BCMA -Fc	0.02 53	ns	ns	0.0009	ns	ns			
381 BCMA -Fc	0.01 01	ns	ns	0.0027	0.026 9	0.048 3	ns		
411 BCMA -Fc	0.00 22	ns	ns	0.0122	0.006 7	0.013	ns	ns	
ナイーブ	0.04 1	ns	ns	0.0002	ns	ns	ns	ns	ns

10

20

30

【 0 7 4 5 】

(表 E 2 3) 全処置群にわたる脾臓細胞数の統計学的比較 (図 19 B)

40

50

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA -4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30- 110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA - Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
アバタセプト	0.01 68								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0. 000 1	<0.0 001	<0.00 01						
TACI 30-110 - Fc	0.00 22	ns	ns	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	0.00 79	ns	ns	<0.0001	ns				
406 BCMA -Fc	<0. 000 1	ns	0.017 4	0.0006	ns	ns			
381 BCMA -Fc	<0. 000 1	0.00 11	0.000 3	0.017	0.009 4	0.0027	ns		
411 BCMA -Fc	<0. 000 1	0.00 24	0.000 5	0.009	0.017 6	0.0054	ns	ns	
ナীব	<0. 000 1	0.01 12	0.002 5	0.0009	ns	0.0241	ns	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 4 6 】

自己免疫疾患および炎症疾患の発病にとって特に重要なものは、B細胞の生存および分化、抗体産生、ならびにT細胞エフェクターメモリーを促進する細胞タイプである。これらの細胞タイプには、以下:全B細胞、辺縁帯(MZ)B細胞、胚中心(GC)B細胞、T濾胞性ヘルパー(Tfh)細胞、ならびにCD4⁺およびCD8⁺Tエフェクターメモリー(T_{em})細胞が含まれるが、これに限定されない。作用機序が、これらの細胞タイプを低減することを含む治療剤は、非常に多くの自己抗体媒介性疾患の処置において効果があると期待されるだろう。CTLA-4 186 GSG4S Fc (G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)またはBCMA-Fc試験物品のいずれかで処置すると、移行性-2(B220⁺CD19⁺CD23⁺CD21^{high}IgM^{high})、濾胞性(B220⁺CD19⁺CD23⁺CD21⁺IgM⁺)、辺縁帯(B220⁺CD19⁺CD23^{neg}CD21^{high}IgM^{high})、胚中心(B220⁺CD19⁺GL7⁺CD95⁺)、および形質細胞(B220^{low}CD19⁺CD138^{high})に及ぼす影響を含めて、残りの処置群と比較して複数の脾臓B細胞サブセットの数が大幅に低減した(図20および図21)。これらのBCMA vTD含有シングルまたはTACI vTDもしくはBCMA vTD含有マルチドメイン分子は、B細胞の生存および分化ならびに抗体産生において重要な、これらの集団のパーセント(示さず)または数を低減する能力の点でアバタセプトもしくは2種類のWT TACI-Fc分子(TACI 13-188-FcおよびTACI 30-110-Fc)と同じくらい有効であったか、またはこれらよりも優れていた。2

0日目脾細胞のフローサイトメトリーデータからの統計解析を表E24～E42に示した。

【0747】

脾臓CD3⁺、CD4⁺、またはCD8⁺T細胞集団はBCMA vTD含有試験物品の影響を大きく受けなかったが(群7～12)、マウスをCTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)で処置すると(群4)、これらのT細胞集団の数はFc対照群と比較して低減した(図22A～22C)。CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610)はTcmおよびTemメモリーT細胞もFc対照群と比較して減らしたが、TACIまたはBCMAシングルドメイン試験物品は減らさなかった(図23)。Fc対照と比較した場合、試験物品の全てが濾胞性ヘルパーT細胞(CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、PD-1⁺、CD185⁺)の数を減らした(図22D)。濾胞性ヘルパーT細胞(CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、PD-1⁺、CD185⁺)は、胚中心においてB細胞と相互作用し、T細胞依存性抗体応答の重要な一因である。

【0748】

(表E24)脾臓B細胞サブセットの統計解析-細胞数対Fc対照群(図20)

比較	T1 B 細胞	T2 B 細胞	濾胞性 B 細胞	辺縁帯 B 細胞	GC B 細胞	形質 細胞
Fc 対照 対 アバタセプト	0.477 3	0.0760	0.0009	0.0022	<0.0001	0.0014
Fc 対照 対 186 CTLA-4 vIgD- Fc	0.597 0	0.1130	0.0189	0.0003	<0.0001	0.0580
Fc 対照 対 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.034 5	<0.000 1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Fc 対照 対 TACI 30-110 - Fc	0.273 8	0.4820	<0.0001	<0.0001	0.0152	<0.0001
Fc 対照 対 TACI 13-118 - Fc	0.594 2	0.0045	<0.0001	<0.0001	0.0115	0.0012
Fc 対照 対 406 BCMA -Fc	0.968 6	<0.000 1	<0.0001	<0.0001	0.0030	<0.0001
Fc 対照 対 381 BCMA -Fc	0.574 3	<0.000 1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Fc 対照 対 411 BCMA -Fc	0.403 9	<0.000 1	<0.0001	<0.0001	0.0004	<0.0001
Fc 対照 対 ナイーブ	0.233 3	0.0241		<0.0001	<0.0001	<0.0001

【0749】

(表E25)脾臓T細胞サブセットの統計解析-細胞数対Fc対照群(図22A～22D)

10

20

30

40

50

比較	CD3+ T 細胞	CD8+ T 細胞	CD4+ T 細胞	CD4+ Tfh 細胞
Fc 対照 対 アバタセプト	0.1393	0.2757	0.0800	<0.0001
Fc 対照 対 186 CTLA-4 vIgD-Fc	0.4956	0.7235	0.2681	<0.0001
Fc 対照 対 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.0001	0.0034	<0.0001	<0.0001
Fc 対照 対 TACI 30-110 - Fc	0.7623	0.5177	0.2474	<0.0001
Fc 対照 対 TACI 13-118 - Fc	0.7210	0.6151	0.2739	0.0001
Fc 対照 対 406 BCMA -Fc	0.8262	0.2192	0.4770	<0.0001
Fc 対照 対 381 BCMA -Fc	0.2153	0.7029	0.0565	<0.0001
Fc 対照 対 411 BCMA -Fc	0.2095	0.8683	0.0126	<0.0001
Fc 対照 対 ナイーブ	0.0038	0.0086	0.0029	<0.0001

10

【 0 7 5 0 】

(表 E 2 6) 脾臓T細胞サブセットの統計解析-細胞数対Fc対照群(図 2 7)

20

比較	ナイーブ CD4+ T 細胞	CD4+ Tcm 細胞	CD4+ Tem 細胞	ナイーブ CD8+ T 細胞	CD8+ Tcm 細胞	CD8+ Tem 細胞
Fc 対照 対 アバタセプト	0.508 1	0.0047	<0.0001	0.6246	0.1115	0.3078
Fc 対照 対 186 CTLA-4 vIgD- Fc	0.971 5	0.0017	<0.0001	0.9728	0.3248	0.9740
Fc 対照 対 CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.001 7	<0.000 1	<0.0001	0.0109	0.0013	0.0391
Fc 対照 対 TACI 30-110 - Fc	0.448 4	0.0695	0.0088	0.9952	0.2531	0.1411
Fc 対照 対 TACI 13-118 - Fc	0.433 6	0.1831	0.0355	0.8153	0.3456	0.0729
Fc 対照 対 406 BCMA -Fc	0.783 4	0.0995	0.0236	0.4410	0.0847	0.3897
Fc 対照 対 381 BCMA -Fc	0.202 9	0.0003	0.0002	0.8184	0.6104	0.6897
Fc 対照 対 411 BCMA -Fc	0.069 1	0.0002	<0.0001	0.8360	0.6895	0.5270
Fc 対照 対 ナイーブ	0.043 3	0.0516	<0.0001	0.0782	0.0016	0.0166

30

40

【 0 7 5 1 】

(表 E 2 7) 全処置群にわたるT1 B細胞数の統計学的比較

50

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA -4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.041 7	ns	0.0164						
TACI 30-110 - Fc	ns	ns	ns	ns					
TACI 13-118 - Fc	ns	ns	ns	ns	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
ナイーブ	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 5 2 】

(表 E 2 8) 全処置群にわたる T2 B細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCM A - Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.00 01	<0.0 001	<0.000 1						
TACI 30-110 - Fc	ns	0.01 42	0.0257	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	0.004 2	<0.0 001	<0.000 1	<0.0001	0.0268				
406 BCMA -Fc	<0.00 01	<0.0 001	<0.000 1	ns	<0.0001	<0.0001			
381 BCMA -Fc	<0.00 01	<0.0 001	<0.000 1	ns	<0.0001	<0.0001	ns		
411 BCMA -Fc	<0.00 01	0.00 02	0.0002	ns	<0.0001	<0.0001	ns	ns	
ナীব	0.023 1	ns	ns	<0.0001	0.0033	<0.0001	0.000 1	<0.0001	0.0003

10

20

30

40

50

【 0 7 5 3 】

(表 E 2 9) 全処置群にわたる濾胞性B細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA -4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCM A - Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	0.000 8								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0.018 5	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1						
TACI 30-110 - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	<0.0 001	0.001 4	0.0001	<0.0001	ns				
406 BCMA - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns	0.0002	<0.0001			
381 BCMA - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns	<0.0001	<0.0001	ns		
411 BCMA - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns	0.0002	<0.0001	ns	ns	
ナイーブ	<0.0 001	0.000 2	<0.000 1	<0.0001	ns	ns	<0.0 001	<0.0001	<0.0001

10

20

【 0 7 5 4 】

(表 E 3 0) 全処置群にわたる辺縁帯B細胞数の統計学的比較

30

40

50

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA -4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCM A -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	0.00 21								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0.00 03	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1						
TACI 30-110 - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns					
TACI 13-118 - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns	ns				
406 BCMA - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns	ns	ns			
381 BCMA - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	<0.0 001	<0.0 001	<0.000 1	ns	ns	ns	ns	ns	
ナイーブ	<0.0 001	ns	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.00 01	<0.0001	<0.0001

10

20

【 0 7 5 5 】

(表 E 3 1) 全処置群にわたる胚中心B細胞数の統計学的比較

30

40

50

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCM A - Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	<0.00 01								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0.00 01	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.00 01	ns	ns						
TACI 30-110 - Fc	0.018 2	<0.00 01	0.0002	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	0.013 9	<0.00 01	0.0002	<0.0001	ns				
406 BCMA - Fc	0.000 3	0.005 8	0.0105	0.004	ns	ns			
381 BCMA - Fc	0.000 1	0.011 3	0.0192	0.0079	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	0.000 6	0.003	0.0058	0.002	ns	ns	ns	ns	
ナীব	<0.00 01	ns	ns	ns	<0.0001	<0.0001	0.006 3	0.0127	0.0032

10

20

30

40

50

【 0 7 5 6 】

(表 E 3 2) 全処置群にわたる形質細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCM A -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	0.00 19								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0 001	<0.00 01	<0.000 1						
TACI 30-110 - Fc	<0.0 001	ns	0.0392	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	0.00 16	ns	ns	<0.0001	ns				
406 BCMA - Fc	<0.0 001	0.023 7	0.0013	0.0052	ns	0.0268			
381 BCMA - Fc	<0.0 001	0.000 2	<0.000 1	ns	0.004	0.0003	ns		
411 BCMA - Fc	<0.0 001	0.001 1	<0.000 1	ns	0.0151	0.0012	ns	ns	
ナイーブ	<0.0 001	0.018 4	0.0009	0.0036	ns	0.0211	ns	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 5 7 】

(表 E 3 3) 全処置群にわたる CD3+T細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA-4 vIgD-Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.00 01	0.011 3	0.0023						
TACI 30-110 - Fc	ns	ns	ns	0.0004					
TACI 13-118 - Fc	ns	ns	ns	0.0004	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0001	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0059	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0062	ns	ns	ns	ns	
ナイーブ	0.00 38	ns	0.0374	ns	0.0089	0.0104	0.0034	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 5 8 】

(表 E 3 4) 全処置群にわたる CD4+T細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.00 01	0.004 9	0.0016						
TACI 30-110 - Fc	ns	ns	ns	0.0008					
TACI 13-118 - Fc	ns	ns	ns	0.0007	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0005	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0076	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	0.012 6	ns	ns	0.0367	ns	ns	ns	ns	
ナীব	0.002 9	ns	ns	ns	0.062	ns	0.033	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 5 9 】

(表 E 3 5) 全処置群にわたる CD8+T細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.01 1	ns	0.0337						
TACI 30-110 - Fc	ns	ns	ns	0.0024					
TACI 13-118 - Fc	ns	ns	ns	0.0034	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0184	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.025	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0076	ns	ns	ns	ns	
ナイーブ	0.02 3	ns	ns	ns	0.0051	0.0072	0.0377	0.0507	0.0159

10

20

30

40

50

【 0 7 6 0 】

(表 E 3 6) 全処置群にわたる濾胞性ヘルパーT細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13- 118 - Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA - Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	<0.0 001								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0.0 001	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0 001	ns	ns						
TACI 30-110 - Fc	<0.0 001	ns	0.0242	0.0047					
TACI 13-118 - Fc	0.00 01	0.019 3	0.0026	0.0003	ns				
406 BCMA - Fc	<0.0 001	ns	ns	0.0314	ns	ns			
381 BCMA - Fc	<0.0 001	ns	ns	ns	ns	0.036 5	ns		
411 BCMA - Fc	<0.0 001	ns	ns	ns	ns	0.048 5	ns	ns	
ナイーブ	<0.0 001	ns	0.0159	0.0026	ns	ns	ns	ns	ns

10

20

【 0 7 6 1 】

(表 E 3 7) 全処置群にわたるナイーブCD4+T細胞数の統計学的比較

30

40

50

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA - Fc	381 BCMA - Fc	411 BCMA -Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.00 17	0.010 8	0.0033						
TACI 30-110 - Fc	ns	ns	ns	0.0139					
TACI 13-118 - Fc	ns	ns	ns	0.0148	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0064	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0484	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
ナイーブ	0.04 33	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 6 2 】

(表 E 3 8) 全処置群にわたる CD4+Tcm 細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30- 110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA - Fc	381 BCMA - Fc	411 BCMA -Fc
アバタセプト	0.00 47								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	0.00 17	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0 001	0.001 9	0.0131						
TACI 30-110 - Fc	ns	ns	ns	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	ns	ns	0.0462	<0.0001	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0001	ns	ns			
381 BCMA - Fc	0.00 03	ns	ns	0.0212	0.0495	0.0151	ns		
411 BCMA - Fc	0.00 02	ns	ns	0.0291	0.0368	0.0107	0.0414	ns	
ナীব	ns	ns	ns	<0.0001	ns	ns	ns	0.0461	0.0337

10

20

30

40

50

【 0 7 6 3 】

(表 E 3 9) 全処置群にわたる CD4+Tem 細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA - Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	<0.0 001								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	<0.0 001	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	<0.0 001	0.000 3	0.0009						
TACI 30-110 - Fc	0.00 88	ns	ns	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	0.03 55	0.027	0.0288	<0.0001	ns				
406 BCMA - Fc	0.02 36	ns	ns	<0.0001	ns	ns			
381 BCMA - Fc	0.00 02	ns	ns	<0.0001	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	<0.0 001	ns	ns	0.0012	0.0365	0.0091	0.0282	ns	
ナイーブ	<0.0 001	ns	ns	0.0021	0.0128	0.0026	0.0103	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 6 4 】

(表 E 4 0) 全処置群にわたるナイーブCD8+T細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA -Fc	381 BCMA - Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.01 09	0.036 2	0.0147						
TACI 30-110 - Fc	ns	ns	ns	0.0107					
TACI 13-118 - Fc	ns	ns	ns	0.0197	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0019	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0195	ns	ns	ns		
411 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0184	ns	ns	ns	ns	
ナイーブ	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.016	ns	ns

10

20

30

40

50

【 0 7 6 5 】

(表 E 4 1) 全処置群にわたる CD8+Tcm 細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA - Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA - Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.001 3	ns	0.0303						
TACI 30-110 - Fc	ns	0.007 7	0.0422	<0.0001					
TACI 13-118 - Fc	ns	0.013 1	ns	<0.0001	ns				
406 BCMA - Fc	ns	0.001 9	0.0118	<0.0001	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0054	ns	ns	0.0294		
411 BCMA - Fc	ns	0.048 5	ns	0.0004	ns	ns	ns	ns	
ナイーブ	0.001 6	ns	0.0408	ns	<0.000 1	<0.0001	<0.0001	0.0072	0.0004

10

20

30

40

50

【 0 7 6 6 】

(表 E 4 2) 全処置群にわたる CD8+Tem 細胞数の統計学的比較

処置群	Fc 対照	アバタ セプト	186 CTLA- 4 vIgD- Fc	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	TACI 30-110 - Fc	TACI 13-118 - Fc	406 BCMA - Fc	381 BCMA -Fc	411 BCMA -Fc
アバタセプト	ns								
186 CTLA-4 vIgD-Fc	ns	ns							
CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.039 1	ns	0.0476						
TACI 30-110 - Fc	ns	0.014 8	ns	0.0007					
TACI 13-118 - Fc	ns	0.006 1	ns	0.0002	ns				
406 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0061	ns	ns			
381 BCMA - Fc	ns	ns	ns	ns	ns	0.03	ns		
411 BCMA - Fc	ns	ns	ns	0.0081	ns	ns	ns	ns	
ナীব	0.016 6	ns	0.0223	ns	0.0002	<0.0001	0.0022	0.0447	0.0028

10

20

30

40

50

【0767】

合わせると、これらの結果から、B細胞活性および/またはT細胞活性を阻害する、BCMA vTD含有シングルドメインFc融合分子またはマルチスタックドメイン分子(CTLA-4 186 GSG4S Fc(G4S)4 TACI 541(SEQ ID NO:610))は、インビボでのT細胞依存性抗原KLHによって媒介される免疫応答および細胞サブセット変化(すなわち、血清中の抗KLHレベルおよび免疫細胞サブセットの変化)を低減できることが分かる。これらの結果は、活動亢進性リンパ球が役割を果たす自己免疫疾患および炎症疾患の処置における臨床治療剤としての、CTLA-4およびBCMA/TACIマルチドメインスタックタンパク質またはシングルトACIもしくはBCMAドメインB細胞阻害性分子の評価と一致している。

【0768】

実施例14. 非肥満糖尿病マウスのシェーグレン症候群モデルにおける評価

本実施例は、唾液腺炎、試験分子の血清レベル、および膵島炎の評価を含む、NODマウスのインビボ短期シェーグレン症候群モデルにおける例示的なシングルドメイン186-CTLA4-Fc融合タンパク質(SEQ ID NO:589に示したFcと融合したバリエーションCTLA-4 SEQ ID NO:186)およびマルチドメインスタック分子CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541(SEQ ID NO:610に示したマルチドメインスタックFc融合)の評価について説明する。

【0769】

雌糖尿病易発性NOD/ShiLtJマウス(約6週齢)において抗mPD-L1抗体を反復投薬することによってシェーグレン症候群モデル誘導した。詳細に述べると、0日目、2日目、4日目、および6日目に0.1mgの抗mPD-L1抗体を腹腔内注射によって投与した。以下の表E43に従って0日目、2日目、および4日目に試験分子融合タンパク質を投薬した。

【0770】

(表 E 4 3) 処置群および投与計画

群	N	抗 mPD-L1 処置 (IP)	試験物品 (TA)	TA用量 レベル(IP)	mAb 処置および TA 投薬日
1	15	0.1 mg	Fc 対照	0.28 mg	0, 2, 4, 6 および 0, 2 4
2	15	0.1 mg	186-CTLA4 - Fc	0.42 mg	0, 2, 4, 6 および 0, 2 4
4	15	0.1 mg	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	0.5 mg	0, 2, 4, 6 および 0, 2 4
6 (ナীব)	5	0	n/a	0	n/a

10

20

略語: IP=腹腔内 (ly); mg=ミリグラム; n/a=該当なし

【0771】

7日目、8日目、9日目、および10日目にマウスの尾静脈から血液(2~5 μL)を入手し、ReliOn Prime グルコース検査細片上に落とし、血糖(mg/dL)を、ReliOn Prime Glucose Test Systemを用いて測定した。実験の10日目にマウスを殺し、血清、顎下腺(SMG)、および脾臓を収集し、分析した。

【0772】

左のSMGと脾臓を取り出し、隣接しているリンパ節から切り離し、中性緩衝ホルマリオン(NBF)に約72時間入れた後に70%エタノールに移した。固定された組織をパラフィンに包埋し、切片化し、ガラススライド上でヘマトキシリン・エオシン(H&E)によって染色した。

30

【0773】

唾液腺炎の程度を評価するのに使用したスコアリングシステムを、Nandula et al. 2011(その中にある表6;表E44として転載した)に従ってスコア化し、脾臓炎の程度を評価するのに使用したスコアリングシステムを、Gutierrez et al 2014(その中にある表7;表E45として転載した)に従ってスコア化した。

【0774】

(表 E 4 4) 唾液腺炎を評価するのに使用した組織学的スコアリング

スコア	判断基準
0	炎症巣なし
1	>50の炎症細胞の1~5個の巣
2	実質破壊を伴わない>5の巣
3	中程度の実質破壊
4	広範な実質破壊

40

【0775】

50

(表 E 4 5) 膵島炎を評価するのに使用した組織学的スコアリング

スコア	判断基準
0	膵島炎なし
1	島周囲 膵島炎
2	中間型 膵島炎
3	膵島内膵島炎
4	完全型 膵島膵島炎

10

【0776】

一元配置分散分析(ANOVA)の後にフィッシャー最小有意差(LSD)検定を用いて組織学スコアの群間の統計的有意差を求めた。クラスカル・ウォリス(ノンパラメトリック)検定の後にダン多重比較検定を用いて、有意差があるかどうか血糖値を分析した。統計解析にはGraphPad PRISM(登録商標)ソフトウェア(バージョン8.1.2)を使用した。全ての統計検定についてp値<0.05が統計的に有意だとみなされた。

【0777】

両方の例示的なCTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541で処置すると唾液腺炎の発生率が低下し(図24A)、組織学スコアがFc対照の平均スコアよりも有意に小さくなった(p<0.01)(図24B)。これらの結果は、このシェーグレン症候群モデルにおいて抗PD-L1注射NODマウスを試験分子で処置すると唾液腺炎の発生率と重篤度が両方とも低下したという知見と一致している。

20

【0778】

試験分子で処置した後の、これらの糖尿病易発性マウスにおける膵島炎の全発生率と膵島炎の程度を図25Aおよび図25Bに示した。組織学的分析によって評価した場合、CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541は膵島炎の程度を有意に下げた(図25B)。

【0779】

図26は、各試験群について7日目、8日目、9日目、および10日目に血中で測定した時の平均血糖濃度(mg/dL)を図示する。示したように、7日目の186-CTLA-4 FcおよびCTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541処置群の血糖値はFc対照と比較して有意に低かった(それぞれ、p<0.05、p<0.01、およびp<0.001)。他の時点のマルチドメインスタック分子CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541で処置した時の血糖値はFc対照と比較して低くなる傾向があった。

30

【0780】

合わせると、これらの結果から、試験された例示的なマルチドメインTACI-CTLA-4分子を用いた処置は、このシェーグレン症候群マウスモデルにおいて唾液腺炎の発生率と重篤度を下げ、試験の経過中に低血糖値を維持するのにおおむね有効だったことが分かる。これらの結果は、シェーグレン症候群を処置するための治療的使用におけるTACI-CTLA-4含有マルチドメインスタック分子の潜在能力とヒトにおける1型糖尿病の発病に影響を及ぼす治療剤としてのTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子の潜在能力を示している。

40

【0781】

実施例15: インビボマウス狼瘡モデルにおける多特異性構築物の活性の評価

本実施例は、インビボマウスbm12誘導性SLEモデルにおける免疫応答に及ぼす例示的なCTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541マルチドメイン分子の評価について説明する。

【0782】

C57BL/6NJ(C57BL/6)マウスを、表E45で概説した群に無作為に割り当てた。雌I-A^{bm12}B6(c)-H2-Ab1^{bm12}/KhEgJ(「bm12」)マウスからの脾臓を無菌的に処理して

50

、RPMI培地に懸濁したシングル細胞懸濁液にし、プールして合計8 mLにした。合計0.2 mLのプールしたbm12脾細胞を注射による腹腔内送達で39匹のC57BL/6「レシピエント」マウスに養子移入した。レシピエント抗原提示細胞によるドナーbm12 CD4+T細胞のアロ活性化によって慢性GVHD症状が生じる。症状は、自己抗体産生、免疫細胞サブセットの変化、および軽度の腎臓疾患を含めてSLEによく似ている。このモデルでは、主としてIgG1、IgG2b、IgG2c、およびIgG3抗体に結合した自己抗原で構成される免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎が末期に発症する。

【0783】

レシピエントマウスに、脾細胞移入の1時間後から開始して、次いで、合計22回の投薬で3～4日ごとに表E45に記載の用量の試験分子を与えた。終了する1週間前に最後の投薬を投与した(75日目に最後の投薬)。対照として、マウスを、Fc対照、WT完全ECD TACI-Fc(アパタセプト)およびTACI 30-110-Fc(TACI 30-110、SEQ ID NO:718; アタセプトにあるTACI ECD部分に対応する)で処置した。5匹のC57BL/6マウスおよび5匹のbm12マウスをナীব未処置対照として使用するために保持した。

【0784】

(表E46) 処置群および投与計画

群	N	0日目で 脾細胞移入	試験物品	用量 (μg)	投与 計画	投与 体積 (IP)
1	10	bm12→C57BL/6	Fc 対照	250	Q3-4Dx22	0.1 mL
2	9	bm12→C57BL/6	アパタセプト	400	Q3-4Dx22	0.1 mL
3	10	bm12→C57BL/6	TACI-30-110 Fc	350	Q3-4Dx22	0.1 mL
4	10	bm12→C57BL/6	CTLA4 186 - GSG4S - Fc - (G4S)4 - TACI 541	460	Q3-4Dx22	0.1 mL
5	5	なし(ナীব C57BL/6 マウス)	未処置 (ナীবC57BL/6 マウス)	n/a	n/a	n/a
6	5	なし(ナীব bm12 マウス)	未処置 (ナীব bm12 マウス)	n/a	n/a	n/a

Q3-4Dx22: 合計22回の投薬で3～4日ごと

【0785】

特定の時点での抗dsDNA抗体、IgGアイソタイプ、BUN、およびCREの血清レベルについては群間の統計的有意差を、一元配置分散分析(ANOVA)を用いて求めた。標準的なANOVA(正規分布データに使用した)またはノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いるかどうか決定するために正規性検定を行った。群間の多重比較検定を、未修正のフィッシャー最小有意差(LSD)検定(標準的なANOVAの場合)、または未修正のダン検定(クラスカル・ウォリスの場合)のいずれかを用いて行った。フローサイトメトリーデータについては群間の有意差を、独立スチューデント両側t検定を用いて解析した。統計解析にはGraphPad PRISM(登録商標)ソフトウェア(バージョン8.1.2)を使用した。全て

の統計検定についてp値 < 0.05が統計的に有意だとみなされた。

【0786】

血中尿素窒素(BUN)および血清クレアチン(CRE)濃度

82日目(試験終了、最後の投薬の7日後)に収集した血清のBUNおよびCREを分析した。図27に示したように、このモデルにおいて、BUN濃度は、Fc対照群対ナীবC57BL/6群における中程度に高い濃度により示されるように($p < 0.05$)、有意に上昇した。CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541-とTACI 30-110-Fc-Fc群は両方ともそれぞれが、アバタセプト処置群と比較した場合に、有意に低いBUN濃度を示した。全体的に見て、この試験ではFc対照群におけるCREレベル増加は最小限であり、どの群との間でも有意差はなかった。

10

【0787】

血清IgGアイソタイプ濃度

本試験中に経時的に血清を収集し、14日目、42日目、および82日目からの試料のIgG 2b、IgG2c、およびIgG3濃度を、マウスIgG2b、マウスIgG2c、およびマウスIgG3酵素結合免疫測定法(ELISA)キットを用いて製造業者の説明書(Abcam; Cambridge, UK)に従って分析した。ネイティブbm12マウスについては82日目(最終)血清試料だけを分析した。bm12モデルでは、これらのIgGアイソタイプは免疫複合体中で増加することが以前に示されており、従って、潜在的に病原性がある。詳細に述べると、このモデルでは最初の4~5週間の間に血清濃度は増加し、経時的にだんだんと減少することが示されている(Akieda et al., 2015 J. Immunol. 194(9):4162-74)。

20

【0788】

図28A~28Cに示したように、14日目、42日目、および82日目から収集した血清から、例示的なTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541で処置すると本試験全体を通して各IgGアイソタイプのレベルが一貫して、かつ持続的に低く、各IgGアイソタイプについて、および試験した各時点でFc対照とTACI 30-110-Fc-Fc群の両方と有意に異なることが分かる。対照分子WT TACI-Fc(アバタセプト)は14日目の時点ではFcのみの対照と比較した場合に、各IgGアイソタイプの有意に低いレベル、82日目では低いIgG2b濃度をもたらしたが、例示的なTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子は42日目および82日目の時点でアバタセプトと比較した場合に、各IgGアイソタイプの有意に低いレベルをもたらした。全体的に見て、例示的なTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子でマウスを処置すると、血清中にある、これらの病原性IgGアイソタイプのレベルがアバタセプトと同程度に、またはアバタセプトよりもかなり多く低減し、常に、TACI 30-110-Fc-Fcよりもかなり多く低減した。

30

【0789】

血清抗dsDNA抗体分析

本試験中に経時的に血清を収集し、7日目、14日目、28日目、42日目、70日目、および82日目からの試料の抗dsDNA抗体濃度を、マウス抗dsDNA IgG抗体アッセイキットを用いて製造業者の説明書(Chondrex, Inc; Redmond, WA)に従って分析した。経時的な血清IgGアイソタイプパターンと同様に、抗dsDNA抗体レベルは約6週間でピークに達し、次の数週間にわたってだんだん少なくなった。図29に示したように、7日目、14日目、28日目、42日目、70日目、および82日目に各処置群のマウスのサブセットから収集し、ELISAによってアッセイした血清は、例示的なTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子、CTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541処置群については各時点で一貫して低レベルの抗dsDNA抗体レベルを示した。WT TACI-Fc(アバタセプト)で処置すると、14日目、28日目、および42日目にFc対照群よりも有意に低い濃度の抗dsDNAが生じた。しかしながら、例示的なTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子による処置は7日目および82日目にアバタセプト群よりも有意に低かった。これらの結果から、例示的なTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子は、SLEでは一貫して、重要な病原性抗体である血清抗dsDNA抗体の濃度をアバタセプトよりも強力に低減したことが分かる。

40

50

【0790】

リンパ球サブセットの免疫フェノタイピング

82日目にマウスを殺し、血液と組織を以下のように収集した。フローサイトメトリーのために頸部リンパ節(LN)と脾臓の一部を氷上でダルベッコリン酸緩衝食塩水に入れた。この脾臓とLNの半分をそれぞれ機械的に処理してシングル細胞懸濁液にし、脾臓細胞中にある赤血球(RBC)を1X RBC Lysis Buffer (BioLegend)で溶解し、細胞を計数した。脾臓およびLN調製物に由来する100万個の生細胞をフローサイトメトリー試薬で染色し、リンパ球サブセットを追跡するために免疫フェノタイピングを行った。

【0791】

表E47は、脾臓重量、脾臓細胞の数(脾臓細胞数)、およびフロー免疫フェノタイピングによって確かめられた時の、処置されたマウスの脾臓中にある異なる細胞サブセットのパーセントを示す。表E48は、処置されたマウスの頸部LN中にある異なる細胞サブセットのパーセントを示す。

【0792】

結果から、Fc対照処置マウスと比較して、胚中心(GC)B細胞とCD4+T_{FH}細胞のパーセントと数が低下したことを含めて、SLEに関連する免疫細胞サブセットに対する複数の効果が証明された。さらに、TACI-CTLA4-Fcマルチドメインスタック分子による処置は他の処置群と比較して脾臓とLNにあるB220+細胞を低減し、未熟T1細胞を残したが、より成熟している辺縁帯(MZ)、T2、濾胞性B細胞、および脾臓にある抗体産生形質細胞を有意に低減した。理論に拘束されるつもりはないが、これらの結果から、B細胞区画は試験分子のウォッシュアウト後に、影響を受けなかったT1細胞から再集合できたことが分かる。

【0793】

結果から、TACI-CTLA-Fcマルチドメインスタック分子で処置すると、Fc対照処置と比較して脾臓とLNにあるCD4+およびCD8+Tem細胞サブセットが低減し、CD4+およびCD8+Tcm細胞サブセットが増加することも証明された。さらに、TACI-CTLA-Fcマルチドメインスタック分子で処置すると、他の処置群のそれぞれと比較して脾臓およびLNにあるICOS+CD4+細胞とCD8+細胞のパーセントも低減した。

【0794】

(表E47)脾臓免疫フェノタイピング:処置群間の統計学的比較

データセット	アバタセプト 対 Fc対照	TACI-CTLA-4 マルチドメイン スタック分子 対 Fc対照	TACI-CTLA-4 マルチドメイン スタック分子 対 アバタセプト	TACI-CTLA-4 マルチドメイン スタック分子 対 TACI 30-110-FC
脾臓重量	0.002	<0.0001	<0.0001	0.0002
脾臓細胞数	ns	0.0002	0.0017	0.0009

10

20

30

40

50

生細胞脾臓に対する%CD45+	ns	ns	ns	ns
CD45+ 細胞数/脾臓	ns	0.0078	0.0145	0.0312
CD45+細胞に対する%B220+細胞	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
B220+ 細胞数/脾臓	ns	<0.0001	<0.0001	0.0011
CD45+細胞に対する%CD3+細胞	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CD3+ 細胞数/脾臓	ns	0.0042	0.0219	ns
B220+細胞に対する%GC B細胞	0.0037	0.0056	ns	0.0182
GC B 細胞数/脾臓	0.0129	0.0011	0.001	0.0062
B220+細胞に対する%形質細胞	0.0375	<0.0001	0.0013	0.0011
形質細胞数/脾臓	0.0152	0.0011	0.0005	0.0279
CD19+細胞に対する%MZ B細胞	ns	<0.0001	0.0002	0.0416
MZ B 細胞数/脾臓	ns	<0.0001	<0.0001	ns
CD19+細胞に対する%T1 B細胞	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
T1 B 細胞数/脾臓	ns	ns	ns	ns
CD19+細胞に対する%T2 B細胞	0.0161	<0.0001	<0.0001	<0.0001
T2 B 細胞数/脾臓	ns	<0.0001	<0.0001	ns
CD19+細胞に対する%濾胞性B細胞	0.0161	<0.0001	<0.0001	<0.0001
濾胞性B 細胞数/脾臓	ns	<0.0001	<0.0001	0.0017
CD45+細胞に対する%CD4+T細胞	ns	<0.0001	<0.0001	0.023
CD4+ T 細胞数/脾臓	ns	0.0217	ns	ns
CD45+細胞に対する%CD8+T細胞	0.0013	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CD8+ T 細胞数/脾臓	ns	0.0009	0.0049	ns
CD4+ T細胞 % hIgG+ 細胞	0.0319	<0.0001	0.0005	<0.0001
CD8+ T細胞 % hIgG+ 細胞	ns	0.0154	0.0075	ns
CD45+ CD3 ⁺ % hIgG+ 非 T 細胞	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CD4+ T細胞 % ICOS+細胞	<0.0001	<0.0001	0.0082	<0.0001
CD4+ T細胞 ICOS+ 細胞数/脾臓	ns	ns	ns	0.0018
CD8+ T細胞 % ICOS+細胞	0.0009	<0.0001	0.0171	<0.0001
CD8+ T細胞 ICOS+ 細胞数/脾臓	ns	ns	ns	0.0102
CD4+ T細胞 % CD28+細胞	<0.0001	<0.0001	0.0494	0.0002
CD4+T細胞 CD28+ 細胞数/脾臓	ns	0.0154	ns	ns
CD8+ T細胞 % CD28+ cells	0.0379	0.0202	ns	<0.0001
CD8+T細胞 CD28+ 細胞数/脾臓	ns	0.0005	0.0051	0.0131
CD4+ % Treg細胞	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.0002
CD4+ Treg 細胞数/脾臓	0.01	0.0002	ns	0.0033
CD4+ % T _{FH} 細胞	0.0002	<0.0001	<0.0001	0.0005
CD4+ T _{FH} 細胞数/脾臓	0.0044	0.0009	0.0019	0.0061
CD4+ %ナイーブT細胞	ns	<0.0001	0.0001	0.0001
CD4+ ナイーブT細胞数/脾臓	ns	0.0004	0.0131	ns
CD4+ % Tem細胞	<0.0001	<0.0001	0.0002	<0.0001
CD4+ Tem 細胞数/脾臓	0.0287	0.0063	ns	<0.0001

10

20

30

40

50

CD4+ % Tcm 細胞	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
CD4+ Tcm 細胞数/脾臓	0.0066	<0.0001	ns	0.0037
CD8+ % ナイーブ T 細胞	ns	0.002	0.0078	49
CD8+ ナイーブ T 細胞数/脾臓	ns	<0.0001	0.0013	0.0129
CD8+ % Tem 細胞	0.0033	0.0002	0.0026	0.0002
CD8+ Tem 細胞数/脾臓	0.0156	0.0207	ns	0.0195
CD8+ % Tcm 細胞	0.0001	ns	ns	ns
CD8+ Tcm 細胞数/脾臓	ns	0.001	0.0447	ns

10

ns = 有意でない

【 0 7 9 5 】

(表 E 4 8) 頸部リンパ節 (LN) イムノフェノタイピング: 処置群間の統計学的比較

データセット	アバタセプト 対 Fc対照	TaBLI 対 Fc対照	TaBLI 対 アバタセプト	TaBLI 対 TACI 30-110- FC
生細胞に対する%CD45+	ns	ns	ns	ns
CD45+細胞に対する%B220+	ns	<0.0001	<0.0001	0.0003
CD45+細胞に対する%CD3+	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
B220+細胞に対する%GC B細胞	0.0237	ns	0.0324	ns
B220+細胞に対する%形質細胞	ns	0.0002	0.0057	0.0005
CD19+細胞に対する%MZ B細胞	0.0244	0.0029	<0.0001	0.0378
CD19+細胞に対する%T1 B細胞	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CD19+細胞に対する%T2 B細胞	ns	ns	ns	0.0005
CD19+細胞に対する%濾胞性B細胞	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CD45+細胞に対する%CD4+	ns	<0.0001	<0.0001	0.0053
CD45+細胞に対する%CD8+	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CD4+ % Treg 細胞	0.0002	<0.0001	0.0049	<0.0001
CD4+ % Tfh 細胞	0.0029	0.0007	0.0002	0.0003
CD4+ % hIgG+ 細胞	ns	ns	ns	ns
CD4+ % CD28+ 細胞	0.0013	0.0004	ns	0.0001
CD4+ % ICOS+ 細胞	0.0012	<0.0001	0.0387	<0.0001
CD8+ % hIgG+ 細胞	ns	ns	ns	0.0249
CD8+ % CD28+ 細胞	0.0303	0.0001	ns	0.0001
CD8+ % ICOS+ 細胞	0.0408	<0.0001	0.0459	<0.0001
CD45+ CD3 ⁻ % hIgG+ 非 T 細胞	ns	<0.0001	<0.0001	0.0218
CD4+ % ナイーブ T 細胞	ns	ns	ns	0.0002
CD4+ % Tem T 細胞	0.0415	0.0107	ns	ns
CD4+ % Tcm T 細胞	0.0007	0.0003	ns	0.0437
CD8+ % ナイーブ T 細胞	0.0483	ns	ns	ns
CD8+ % Tem T 細胞	0.0192	0.0245	ns	ns
CD8+ % Tcm T 細胞	0.0189	ns	ns	ns

20

30

40

ns = 有意でない

【 0 7 9 6 】

50

結論

これらの結果から、例示的なCTLA4 186-GSG4S-Fc-(G4S)4-TACI 541マルチドメインスタック分子などのマルチドメインTACI-CTLA-4スタック分子は、慢性GVHDおよびSLEの誘導性マウスモデルにおいて、ほとんどの場合ではTACI30-110-Fcまたはアバタセプトよりも有効に、重要なBリンパ球サブセットおよびTリンパ球サブセットの拡大を阻害し、自己抗体と潜在的に病原性のIgGの形成を低減できることが裏付けられる。これらの知見から、BAFF/APRIL B細胞経路およびCD80/86-CD28共刺激T細胞経路を両方とも同時に阻害すると、SLEにおいて有意に疾患が寛解し、病原性リンパ球が管理され得ることが分かる。従って、マルチドメインTACI-CTLA-4マルチドメインスタック分子によって成し遂げられる二重経路阻害剤はヒトにおける有効なSLE治療剤になり得る。

10

【0797】

実施例16. 例示的な単量体構築物および四量体構築物の評価

SEQ ID NO:356に示したWT BCMAと、SEQ ID NO:406に示したBCMA vTD(H19L)を用いて、1つの(単量体)または4つの(四量体バーベルおよび四量体タンデム)BCMAドメインを含有する、さらなるBCMA Fc融合タンパク質を作製した。単量体および四量体BCMA WTおよびBCMA vTDを、FcドメインとのBCMA WTおよびBCMA vTD-Fc融合タンパク質として整えた。例示的な作製されたFc融合タンパク質は実質的に実施例4に記載のように作製され、表E49A~E49Cに記載されている。

20

【0798】

簡単に言うと、単鎖Fc融合タンパク質として組換え単量体免疫調節タンパク質を作製するために、以下:WT BCMAまたはバリエーションBCMAドメイン、続いて12アミノ酸リンカー(GSGGGGSGGGGS;SEQ ID NO:805)、続いてSEQ ID NO:852に示した単鎖Fc(scFc)(免疫グロブリンタンパク質のEu Indexナンバリングシステムにより、変異L234A、L235E、およびG237Aを含有するヒトIgG1エフェクターレスFc配列(SEQ ID NO:589)、続いて(GGGGS)₁₃リンカー(SEQ ID NO:806)、続いて免疫グロブリンタンパク質のEu Indexナンバリングシステムにより、変異L234A、L235E、およびG237Aを含有する第2のヒトIgG1エフェクターレスFc配列で構成される)、のようにタンパク質をコードするように、コードDNAを作製した。作製した分子を表E49Aにまとめた。

30

【0799】

(表E49A)例示的な単量体免疫調節タンパク質

AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	説明	BCMA SEQ ID NO	リンカー SEQ ID NO	FC SEQ ID NO
807	814	BCMA 356 - GS(G4S)2 814- scFc 852	356	805	821
810	817	BCMA 406- GS(G4S)2 814 -scFc 852	406	805	821

40

【0800】

Fc融合タンパク質として組換え四量体免疫調節タンパク質を作製するために、タンパク質を以下のように異なる形式で作製した。

【0801】

ある形式では、以下のように、3つの異なるタンパク質バージョンをコードするように、コードDNAを作製した: BCMA Fc(SEQ ID NO:813): BCMA vTDドメインSEQ ID NO:406、続いて(G4S)3リンカーSEQ ID NO:595、続いてBCMA vTDドメインSEQ ID NO:406、続いてGSGGGGSのリンカーSEQ ID NO:590、続いて免疫グロブリンタンパク質のEu Indexナンバリングシステムにより、変異L234A、L235E、およびG23

50

7Aを含有するヒトIgG1エフェクターレスFc配列(SEQ ID NO:589)。

【0802】

ある形式では、以下のように、3つの異なるタンパク質バージョンをコードするように、コードDNAを作製した: WT BCMA(SEQ ID NO:809): WT BCMAドメインSEQ ID NO:356、続いてGSGGGGSのリンカーSEQ ID NO:590、続いて免疫グロブリンタンパク質のEu Indexナンバリングシステムにより、変異L234A、L235E、およびG237Aを含有するヒトIgG1エフェクターレスFc配列(SEQ ID NO:589)、続いて(G4S)3リンカーSEQ ID NO:595、続いてWT BCMAドメインSEQ ID NO:356。

【0803】

ある形式では、以下のように、3つの異なるタンパク質バージョンをコードするように、コードDNAを作製した: BCMA Fc SEQ ID NO:812): SEQ ID NO:406に示したBCMA vTD、続いてGSGGGGSのリンカーSEQ ID NO:590、続いて免疫グロブリンタンパク質のEu Indexナンバリングシステムにより、変異L234A、L235E、およびG237Aを含有するヒトIgG1エフェクターレスFc配列(SEQ ID NO:589)、続いて(G4S)3リンカーSEQ ID NO:595、続いてSEQ ID NO:406に示したBCMA vTD。

【0804】

(表E49B)例示的な四量体免疫調節タンパク質

AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	説明	1つ目のBCMA	リンカー	2つ目のBCMA	リンカー	Fc
813	820	BCMA 406-- (G4S)3 (595) BCMA 406-- GSG4S (590) Fc 589	406	595	406	590	589

【0805】

(表E49C)例示的な四量体免疫調節タンパク質

AA SEQ ID NO	NT SEQ ID NO	説明	1つ目のBCMA	リンカー	FC	リンカー	2つ目のBCMA
809	816	BCMA 356 GSG4S (590) Fc 589 (G4S)3 (595) BCMA 356	356	590	589	595	356
812	819	BCMA 406-- GSG4S (590) Fc 589- (G4S)3(595) BCMA 406-	406	590	589	595	406

【0806】

A. 例示的なマルチドメイン分子の生理活性

ある実験では、表E49A～E49Cに示した例示的な分子を、APRIL媒介性またはBAFF媒介性シグナルを遮断するかどうかJurkat/NF-κB/TACIレポーター細胞を用いて評価した。表E50は、APRIL媒介性またはBAFF媒介性TACIシグナル伝達の阻害の最大半量阻害濃度(IC50)値を示す。場合によっては、試験したタンパク質はWT対照の親と比較されず、以下の表では(-)で表される。表E50の結果から、全ての作製された形式はAPRIL媒介性またはBAFF媒介性シグナル伝達を両方とも遮断することが証明される。

【0807】

(表E50)例示的な単量体および四量体免疫調節タンパク質の評価

10

20

30

40

50

SEQ ID NO	フォーマット	APRIL IC ₅₀ (pM)	BAFF IC ₅₀ (pM)	BAFF 60-mer IC ₅₀ (pM)
807	BCMA 356 - GS(G4S)2 814-Fc 589-(GGGGS) ₁₃ 815-Fc 589	-	-	-
809	BCMA 356 GSG4S (590) Fc 589 (G4S)3 (595) BCMA 356	3255	3073	84875
810	BCMA 406-- GS(G4S)2 814-Fc 589-(GGGGS) ₁₃ 815-Fc 589	-	-	-
812	BCMA 406-- GSG4S (590) Fc 589- (G4S)3(595) BCMA 406-	2717	583	2324
813	BCMA 406-- (G4S)3 (595) BCMA 406-- GSG4S (590) Fc 589	775	638	630

10

20

【0808】

実施例17. マルチドメインT細胞阻害性およびB細胞阻害性免疫調節タンパク質の作製

おおむね実施例7Aに記載のように、(1)T細胞阻害性分子(TIM)として、野生型CTLA-4細胞外ドメインと、(2)B細胞阻害性分子(BIM)として、BCMAまたはAPRILなどのB細胞刺激性受容体に結合する野生型TACI細胞外ドメイン部分またはそのバリエーションと、を含有するホモ二量体Fc融合体として、マルチドメイン免疫調節タンパク質を作製した。

【0809】

マルチドメイン免疫調節タンパク質のTIM(野生型CTLA-4)またはBIM(野生型TACIまたはバリエーション)を、GSGGGGS(SEQ ID NO:590)および(GGGGS)₄(SEQ ID NO:600)などのペプチドリンカーを介してFc領域のN末端またはC末端に多様に連結した。ホモ二量体Fc融合体を作製するために、SEQ ID NO:589、822、823、および824に示した配列を含む様々な例示的なIgG1 Fc領域を使用した。

30

【0810】

以下の表E51は、例示的な作製されたマルチドメインホモ二量体免疫調節Fc融合タンパク質を示す。

【0811】

(表E51)マルチドメイン免疫調節タンパク質(ホモ二量体)

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO	CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 589 (G4S)4 (TACI 528)	796	759	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (589)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 853 (G4S)4 (TACI 528)	797	786	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (853)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 854 (G4S)4 (TACI 528)	798	787	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (854)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc	799	788	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q(68- 110)	GSG4S (590)	Fc (589)

10

20

30

40

50

説明	DNA SEQ ID NO	タンパク質 SEQ ID NO	CTLA-4 (SEQ ID NO)	TACI (SEQ ID NO)	リンカー (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)
589 (G4S)4 (TACI 542)				(542)	(G4S)4 (600)	
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 853 (G4S)4 (TACI 542)	800	789	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q(68- 110) (542)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (853)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 854 (G4S)4 (TACI 542)	801	790	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q(68- 110) (542)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (854)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 855 (G4S)4 (TACI 528)	802	791	CTLA-4 ECD (1)	68-110 WT (528)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (855)
(CTLA4 WT ECD 1) GSG4S Fc 855 (G4S)4 (TACI 542)	803	792	CTLA-4 ECD (1)	Q75E, R84Q(68- 110) (542)	GSG4S (590) (G4S)4 (600)	Fc (855)

10

20

30

40

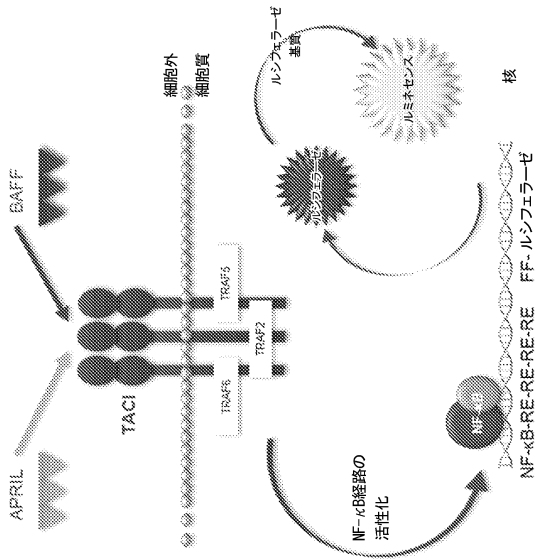
【 0 8 1 2 】

本発明は、例えば、本発明の様々な局面を例示するために提供された、特定の開示された態様に範囲が限定されることを意図していない。記載の組成物および方法に対する様々な変更が本明細書の説明および開示から明らかになる。このような変更は、本開示の真の範囲および趣旨から逸脱することなく実施することができ、本開示の範囲内にあると意図される。

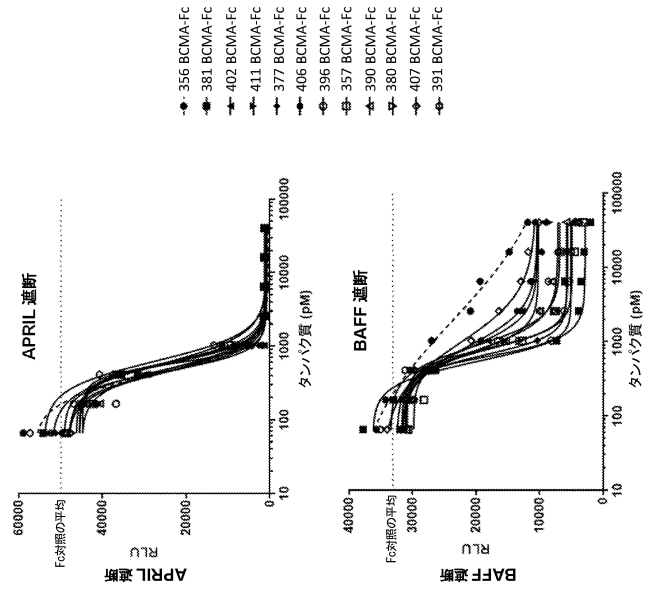
50

【図面】

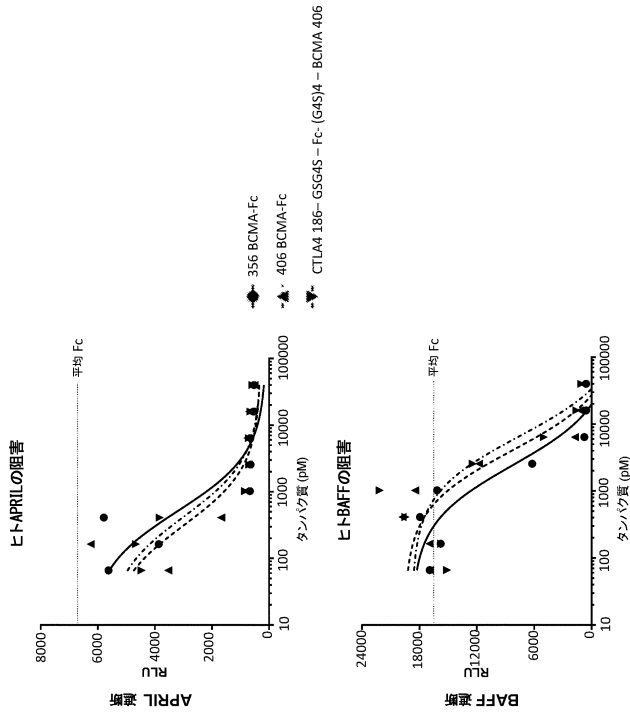
【図 1】



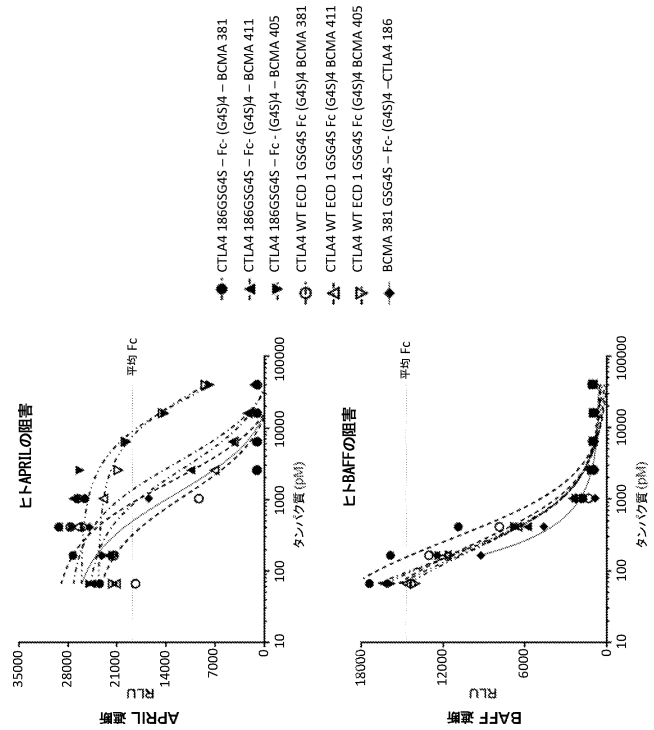
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

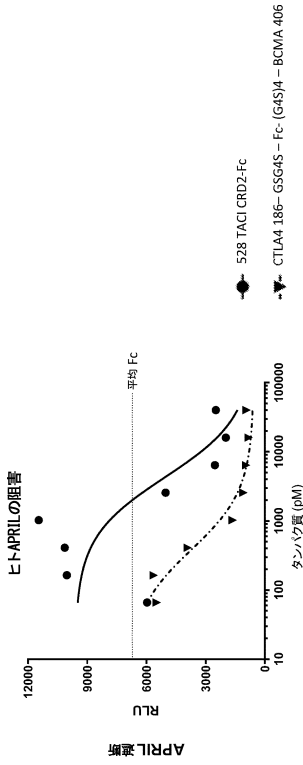
20

30

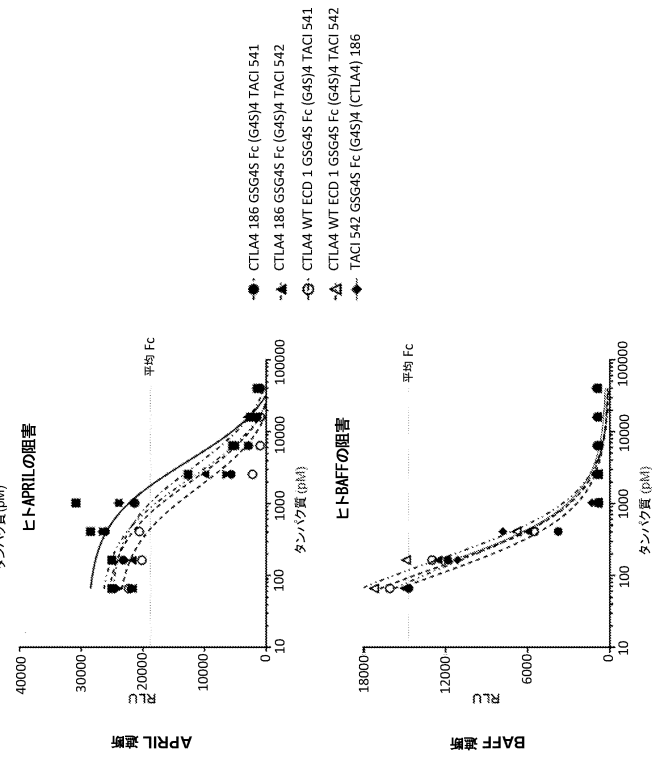
40

50

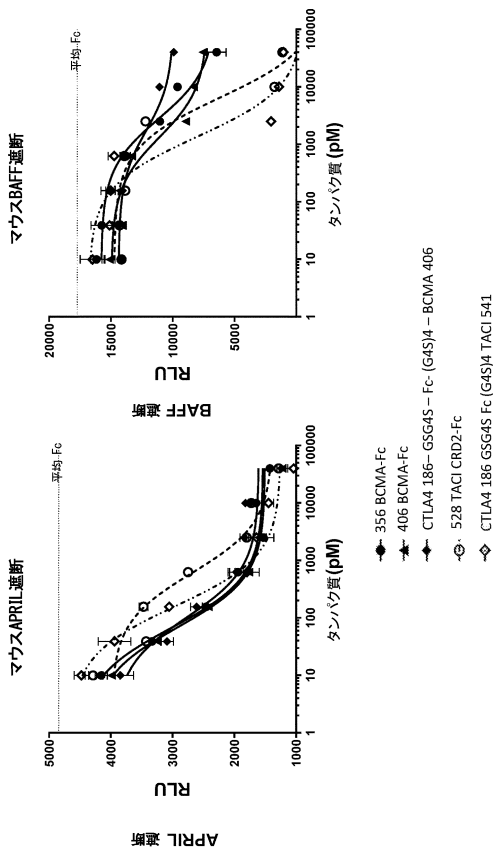
【図 3 C】



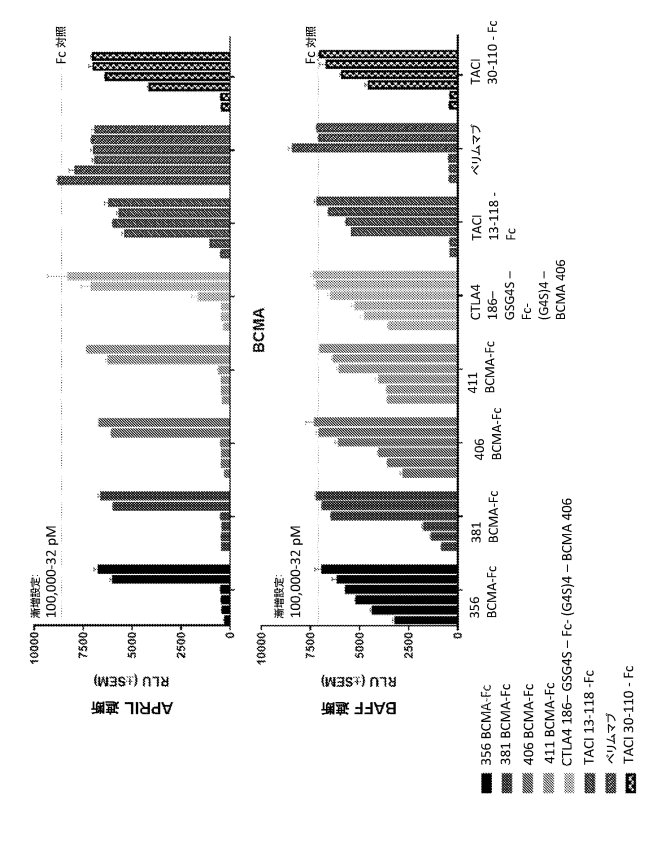
【図 3 D】



【図 4】



【図 5 A】



10

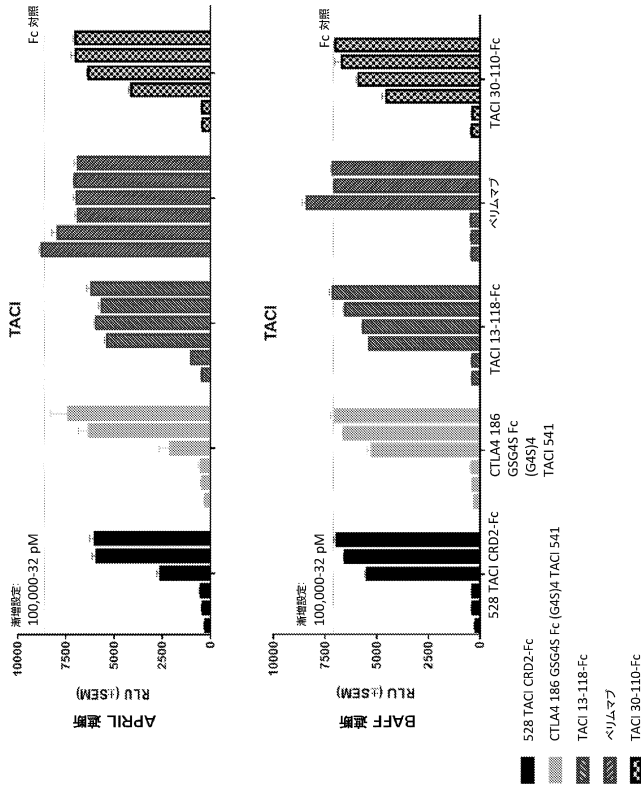
20

30

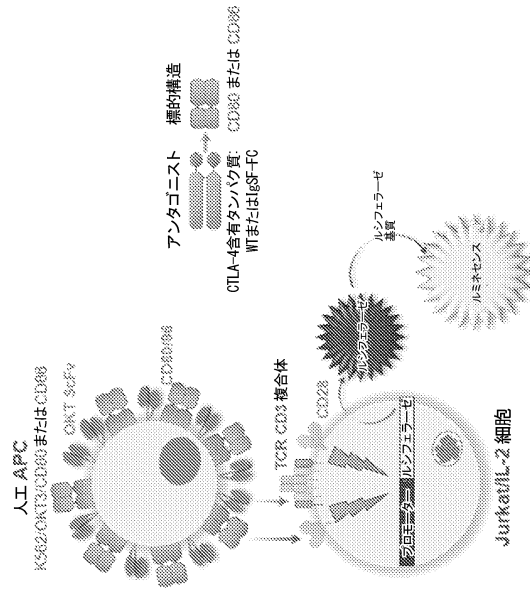
40

50

【図 5 B】



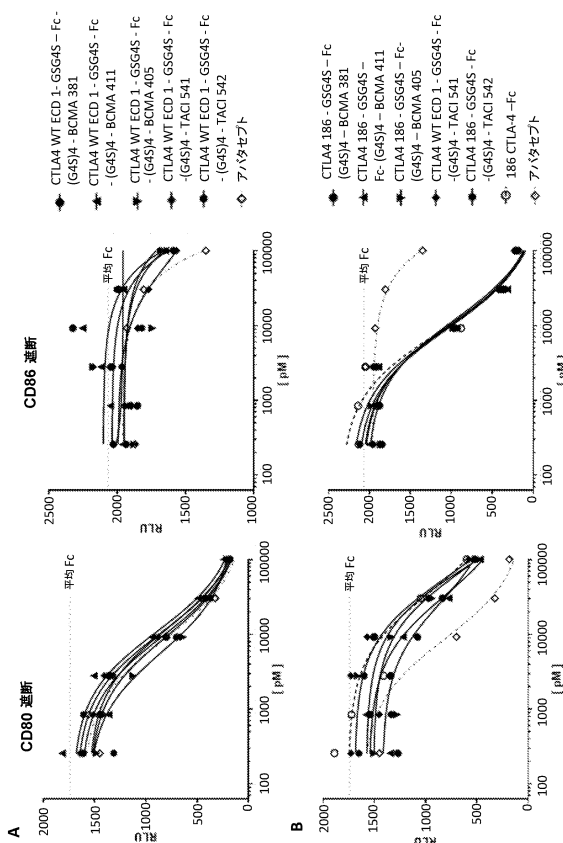
【図 6】



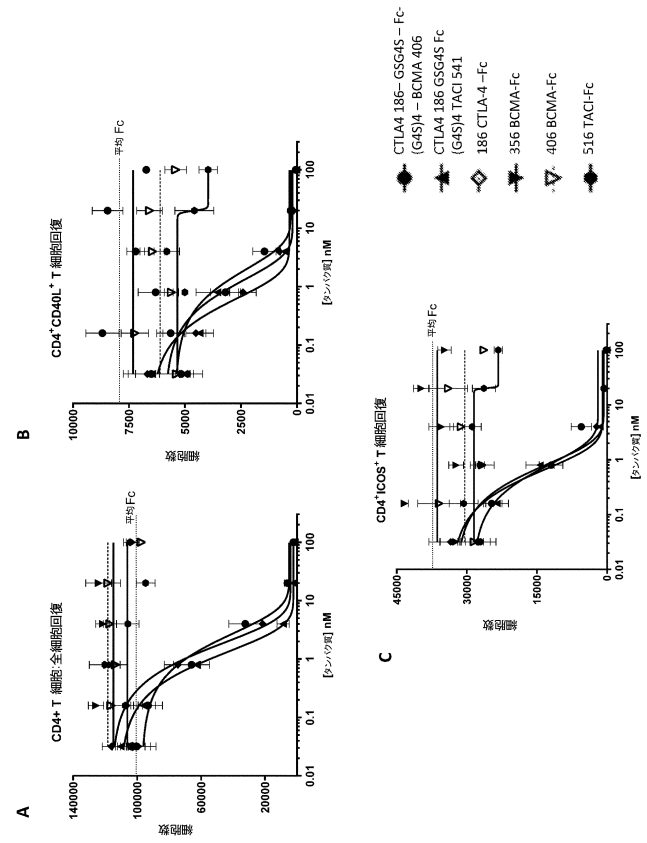
10

20

【図 7】



【図 8 - 1】

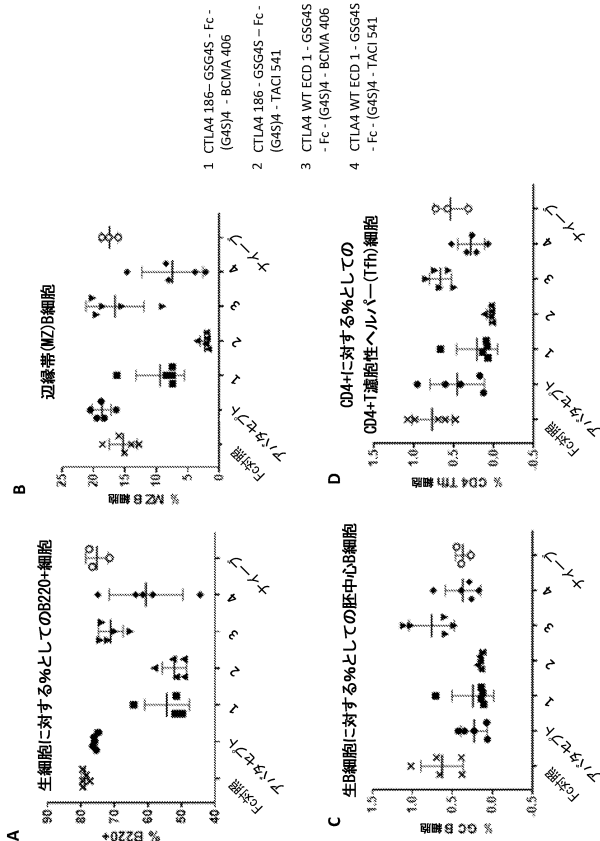


30

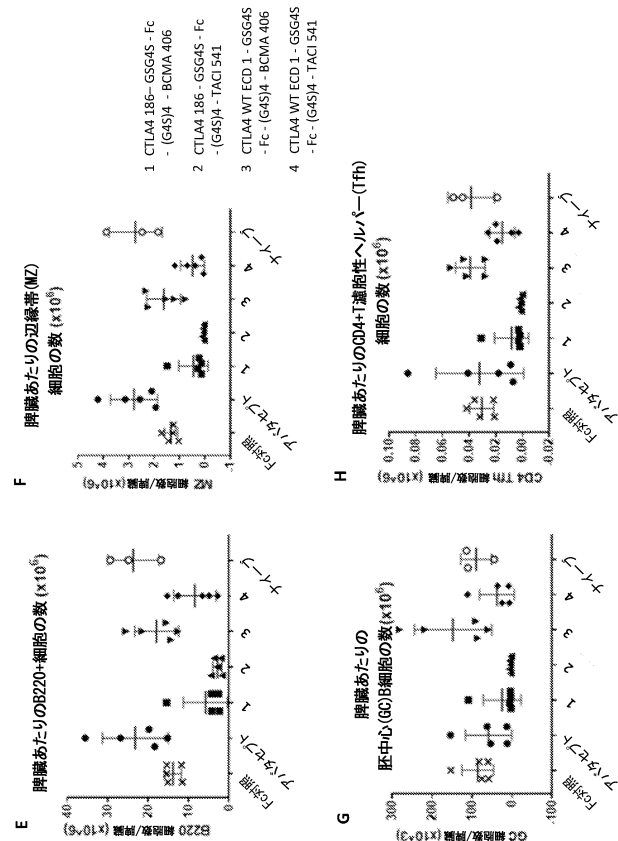
40

50

【図 1 2 - 1】



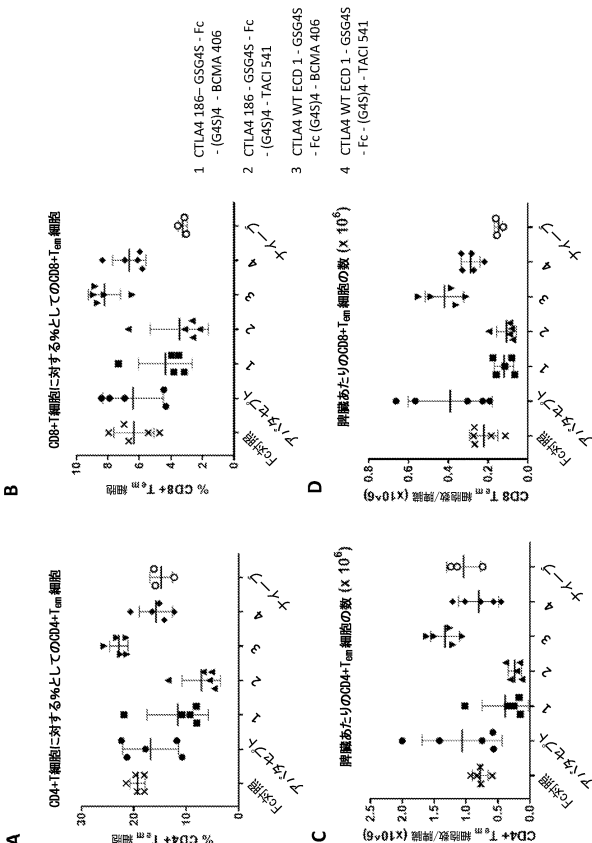
【図 1 2 - 2】



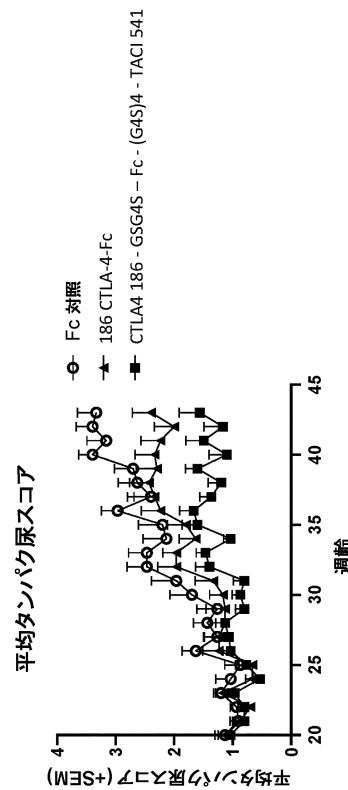
10

20

【図 1 3】



【図 1 4 A】

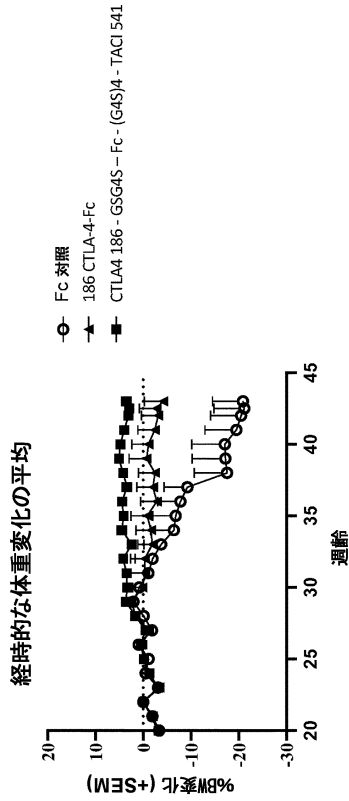


30

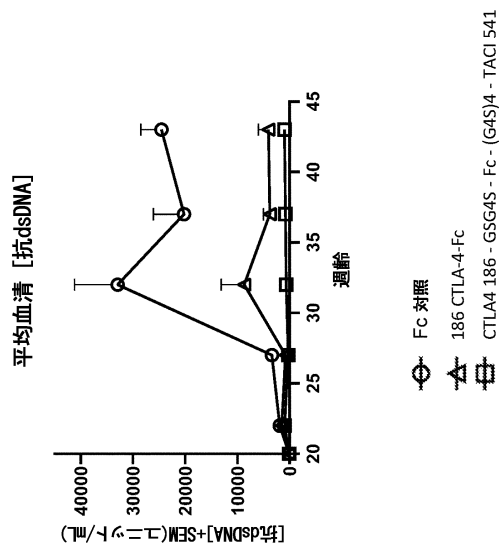
40

50

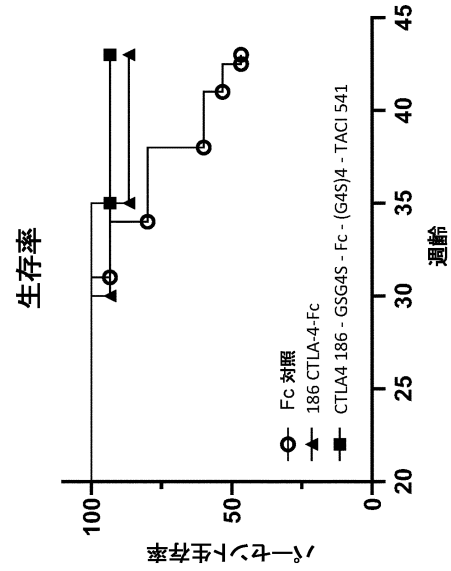
【図 1 4 B】



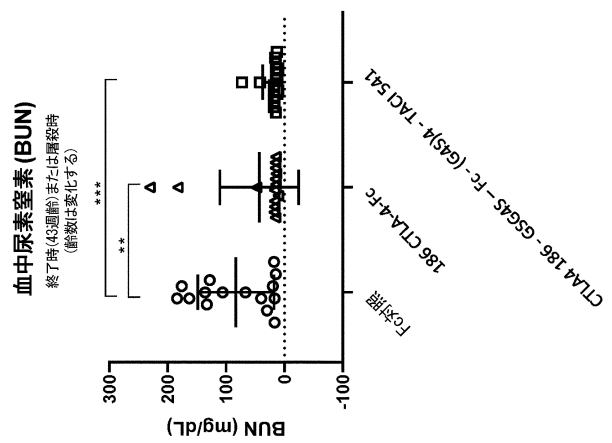
【図 1 4 D】



【図 1 4 C】



【図 1 4 E】



10

20

30

40

50

10

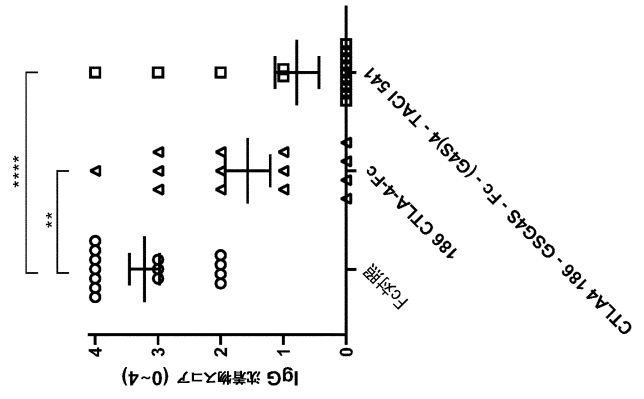
20

30

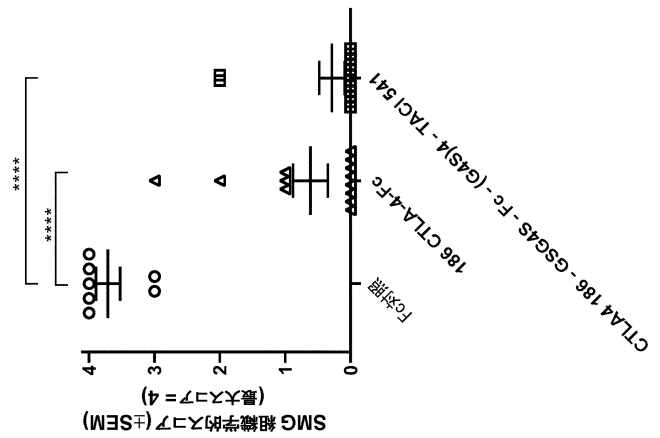
40

50

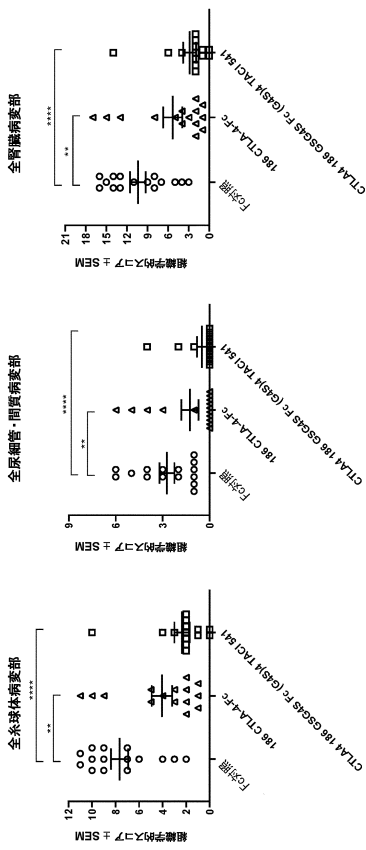
【図 1 4 G】



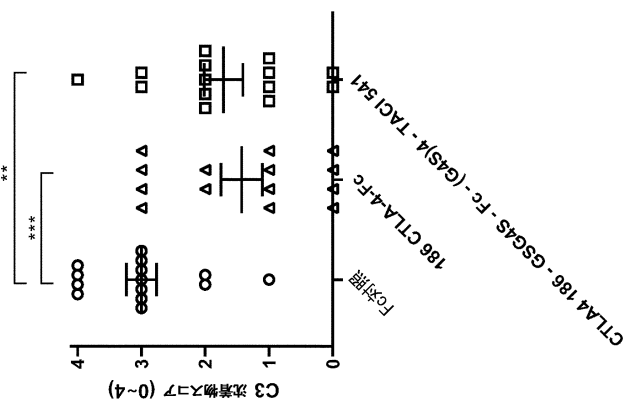
【図 1 4 I】



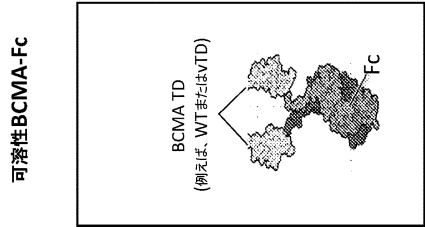
【図 1 4 F】



【図 1 4 H】



【図 1 5】

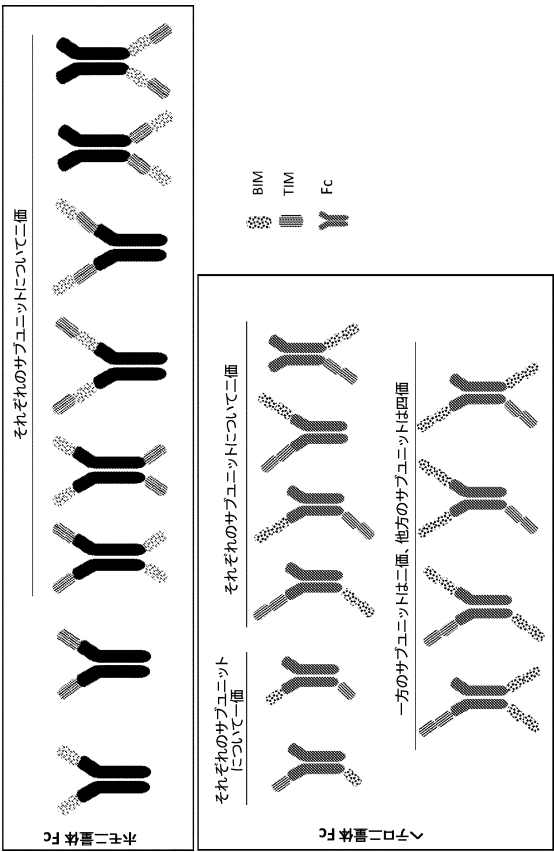


【図 1 7 A】

TACI 709	MSGLGRSRGGRSRVDQEEERFPQGLWTGVAMRSCPPEEQYWDPLLGTCTMSCKTICNHQSQR	60
TACI 528	-----	0
TACI 709	TCAAFGRSLSCRKEQGYDHLRLRDCISCSASICGQHPKQAYFCENKLRSPVNLPPELRR	120
TACI 528	-----SLSCRKEQGYDHLRLRDCISCSASICGQHPKQAYFCENKLR-----	43

TACI 709	QRSGVENNSDNGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADOVALVYST	166
TACI 528	-----	43

【図 1 6】



【図 1 7 B】

BCMA 710	MLQWAGQCSQNEYFDLSLLHACIFPCQLRCSSTNPPLTCQRYCNASYTNSVKGTNA	54
BCMA 356	--LQWAGQCSQNEYFDLSLLHACIFPCQLRCSSTNPPLTCQRYCNASYTNSVKGTNA	53

10

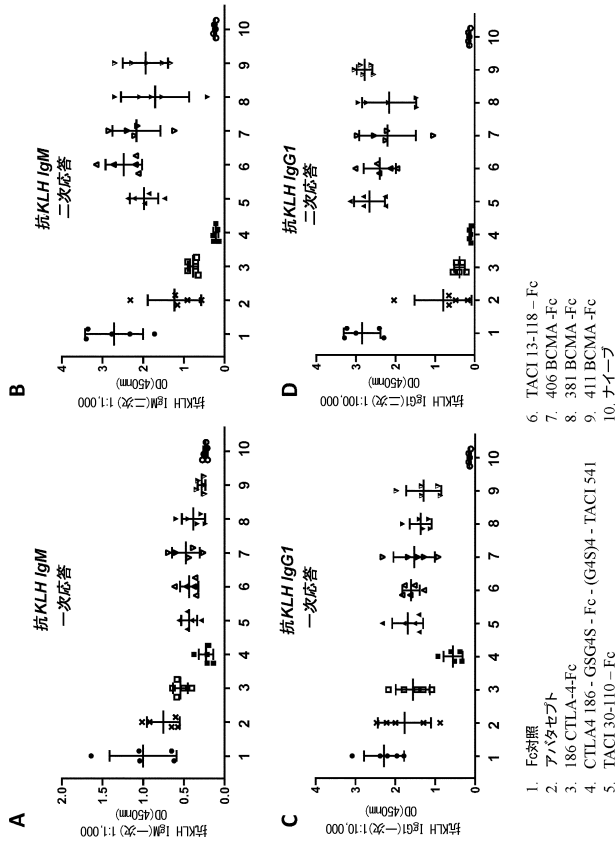
20

30

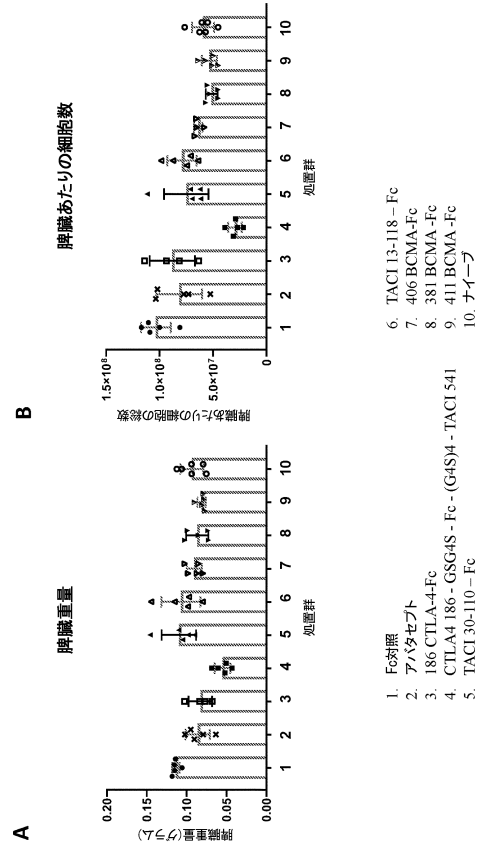
40

50

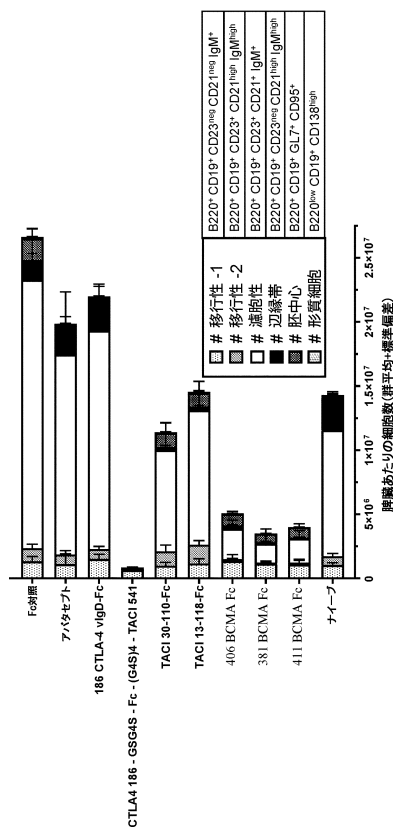
【図 18】



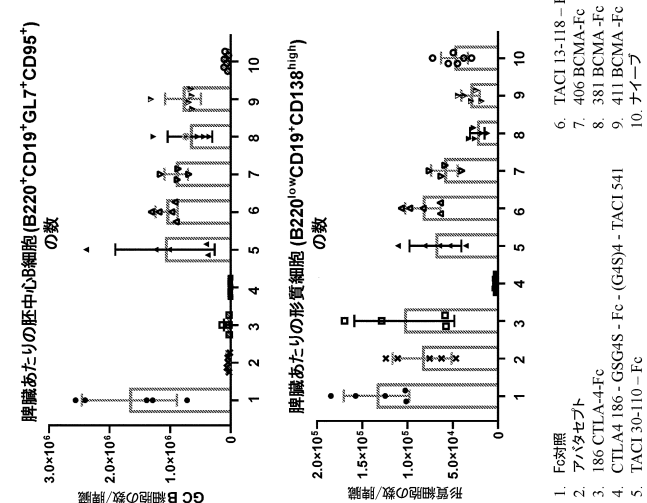
【図 19】



【図 20】



【図 21】



10

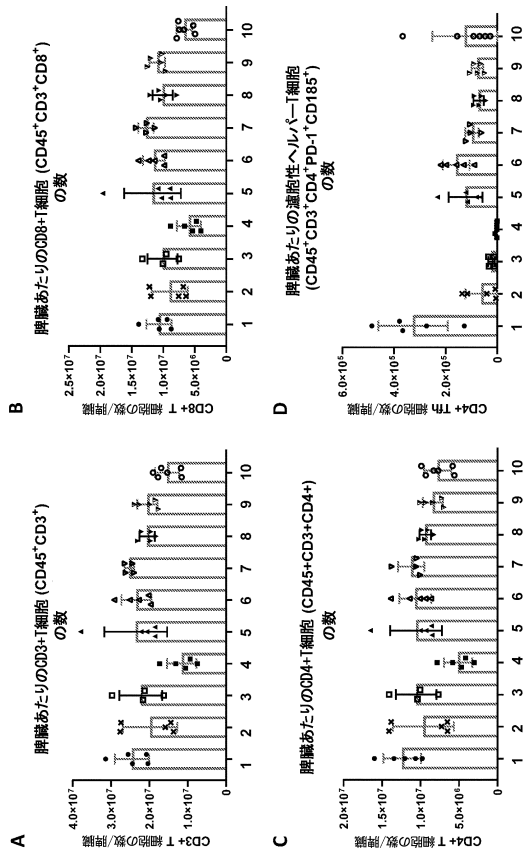
20

30

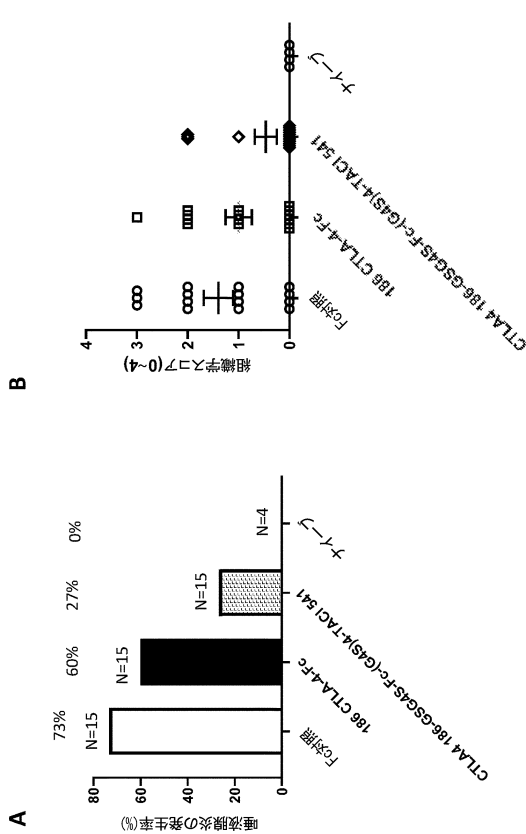
40

50

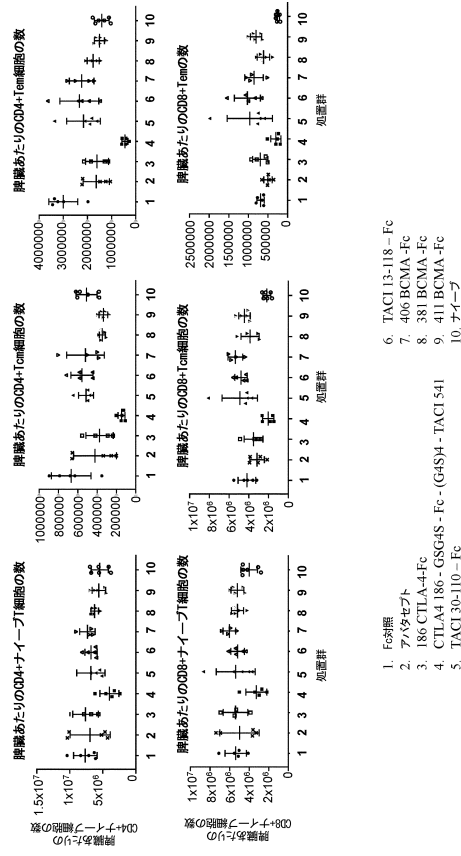
【図 2 2】



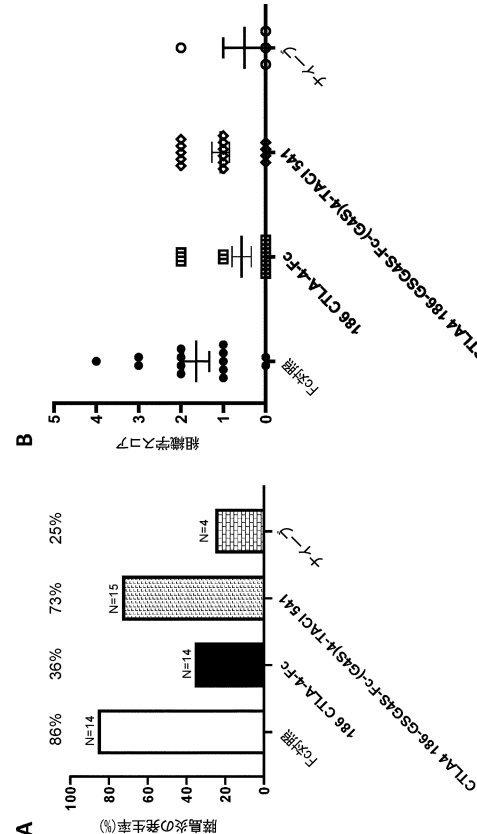
【図 2 4】



【図 2 3】



【図 2 5】



10

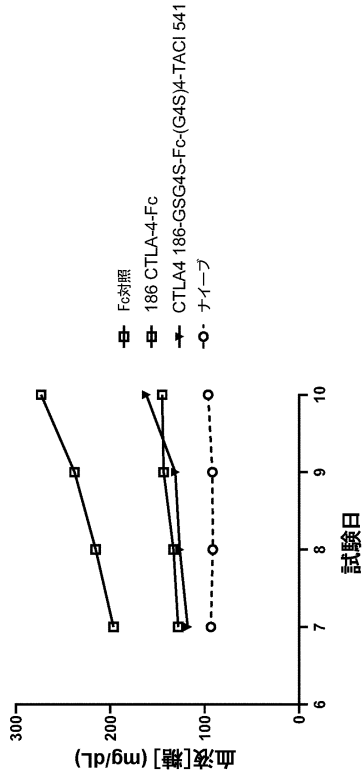
20

30

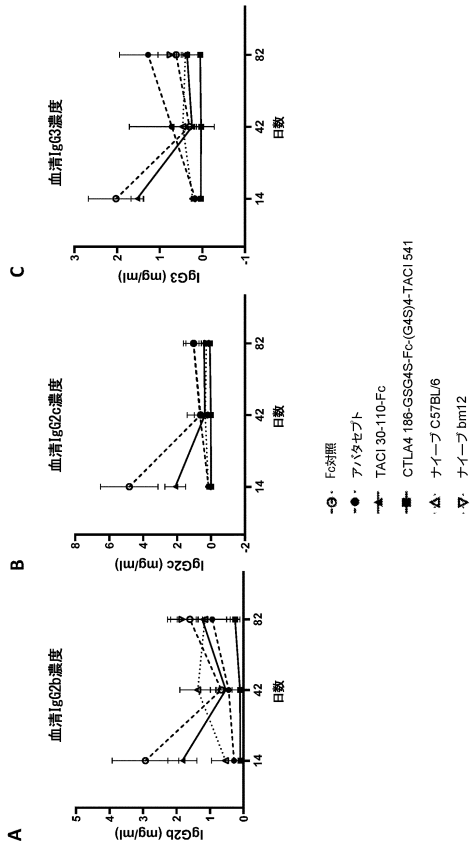
40

50

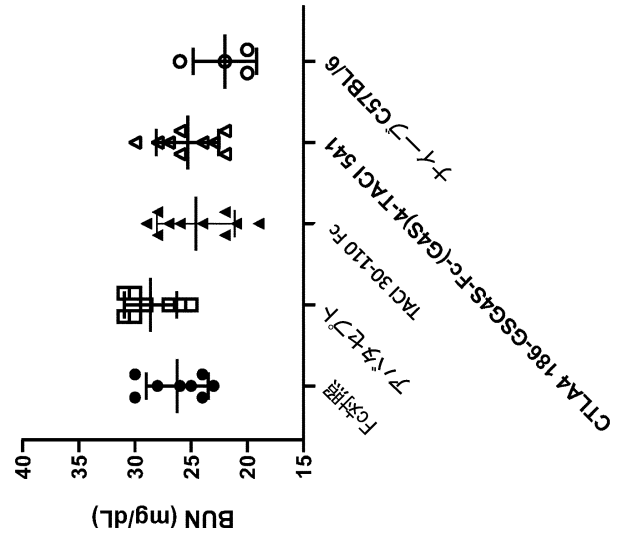
【図 2 6】



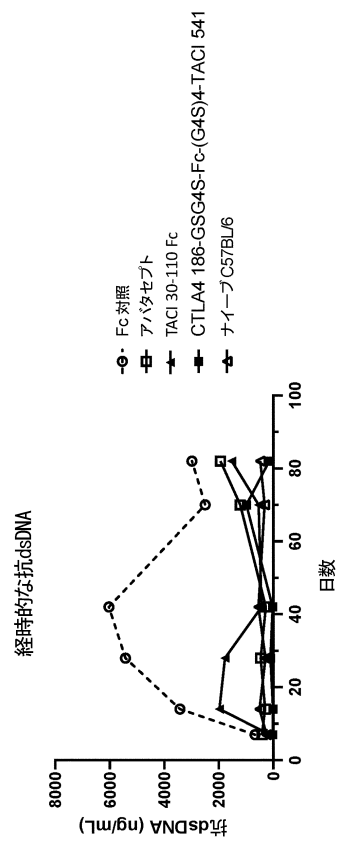
【図 2 8】



【図 2 7】



【図 2 9】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023525032000001.app

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2021/031432

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/031432**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-164 (partially)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/031432

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/705 A61P37/00 C07K19/00
ADD. C07K14/71 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/047329 A1 (SHATTUCK LABS INC [US]) 5 March 2020 (2020-03-05)	1, 21-164
Y	claims and examples	2-9, 15-20
X	----- HANS J.P.M. KOENEN ET AL: "A Novel Bispecific Antihuman CD40/CD86 Fusion Protein with T-cell Tolerizing Potential", TRANSPLANTATION, vol. 78, no. 10, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 1429-1438, XP055136508, ISSN: 0041-1337, DOI: 10.1097/01.TP.0000140481.41441.63 claims and examples, Figure 3A ----- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2022

Date of mailing of the international search report

04/03/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gómez Ortiz, Mariola

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/031432

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/136179 A1 (ALPINE IMMUNE SCIENCES INC [US]) 11 July 2019 (2019-07-11) Example 1; SEQ ID NO 3495 -----	1-5, 7-9
Y	WO 2013/041029 A1 (IGENIMED PHARMACEUTICALS INC [CN]) 28 March 2013 (2013-03-28) Claim 5; SEQ ID NO 1 -----	1-6
X	WO 2019/074983 A1 (ALPINE IMMUNE SCIENCES INC [US]) 18 April 2019 (2019-04-18) cited in the application [0140], Claims and Examples -----	1-5
Y	US 2017/081387 A1 (CAI ZELING [CN] ET AL) 23 March 2017 (2017-03-23) Figures, Examples and claims, [0115], -----	15-20
A	WO 2017/106061 A1 (MACROGENICS INC [US]) 22 June 2017 (2017-06-22) Examples and claims -----	1-164
A	SATHISH JEAN G ET AL: "Challenges and approaches for the development of safer immunomodulatory biologics", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 12, no. 4, 28 March 2013 (2013-03-28), pages 306-324, XP037075473, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/NRD3974 [retrieved on 2013-03-28] the whole document -----	1-164
A	WO 2006/073941 A2 (GENENTECH INC [US]; BIOGEN IDEC INC [US] ET AL.) 13 July 2006 (2006-07-13) Examples and claims 90, 107-109 -----	1-164

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/031432

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020047329 A1	05-03-2020	NONE	
WO 2019136179 A1	11-07-2019	AU 2019205273 A1 BR 112020013236 A2 CA 3087149 A1 EP 3735417 A1 SG 11202006148U A WO 2019136179 A1	16-07-2020 01-12-2020 11-07-2019 11-11-2020 29-07-2020 11-07-2019
WO 2013041029 A1	28-03-2013	NONE	
WO 2019074983 A1	18-04-2019	CA 3077509 A1 CN 111801347 A EP 3694870 A1 JP 2020536552 A KR 20200074137 A MA 50360 A US 2020308249 A1 WO 2019074983 A1	18-04-2019 20-10-2020 19-08-2020 17-12-2020 24-06-2020 19-08-2020 01-10-2020 18-04-2019
US 2017081387 A1	23-03-2017	US 2017081387 A1 WO 2015172305 A1	23-03-2017 19-11-2015
WO 2017106061 A1	22-06-2017	AR 107781 A1 AU 2016370376 A1 BR 112018011781 A2 CA 3006462 A1 CL 2018001545 A1 CN 108367069 A CO 2018005932 A2 CR 20180318 A EA 201891178 A1 EC SP18043564 A EP 3389714 A1 GE P20217328 B HK 1255039 A1 JP 6955507 B2 JP 2019506444 A JP 2022001584 A KR 20180086250 A MA 44082 A PH 12018501220 A1 SG 11201804839W A TW 201725215 A US 2019161548 A1 US 2021130470 A1 WO 2017106061 A1 ZA 201803472 B	06-06-2018 21-06-2018 04-12-2018 22-06-2017 05-10-2018 03-08-2018 20-06-2018 19-09-2018 31-01-2019 30-06-2018 24-10-2018 10-12-2021 02-08-2019 27-10-2021 07-03-2019 06-01-2022 30-07-2018 24-10-2018 28-01-2019 30-07-2018 16-07-2017 30-05-2019 06-05-2021 22-06-2017 30-01-2019
WO 2006073941 A2	13-07-2006	AU 2005323025 A1 BR PI0518994 A2 CA 2595112 A1 CN 101120021 A EA 200701211 A1 EP 1838735 A2 JP 2008526205 A KR 20070107687 A US 2008181888 A1	13-07-2006 02-12-2008 13-07-2006 06-02-2008 28-12-2007 03-10-2007 24-07-2008 07-11-2007 31-07-2008

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

International Application No. PCT/US2021/031432

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-164(partially)

An immunomodulatory protein comprising:

(1) at least one T cell inhibitory molecule (TIM) that binds to (i) a T cell stimulatory receptor, or (ii) a ligand of a T cell stimulatory receptor; and/or that antagonizes activity of a T cell stimulatory receptor; and
(2) at least one B cell inhibitory molecule (BIM) that binds to a ligand of a B cell stimulatory receptor and/or antagonizes activity of a B cell stimulatory receptor.

2. The immunomodulatory protein of claim 1, wherein the TIM binds to a ligand of a T cell stimulatory receptor.

3. The immunomodulatory protein of claim 2, wherein: the T cell stimulatory receptor is CD28; and/or the ligand of the T cell stimulatory receptor is CD80 or CD86.

4. The immunomodulatory protein of any of claims 1-3, wherein the TIM is a CTLA-4 extracellular domain or a binding portion thereof that binds to CD80 or CD86.

2. claims: 1-164(partially)

An immunomodulatory protein comprising:

(1) at least one T cell inhibitory molecule (TIM) that binds to (i) a T cell stimulatory receptor, or (ii) a ligand of a T cell stimulatory receptor; and/or that antagonizes activity of a T cell stimulatory receptor; and
(2) at least one B cell inhibitory molecule (BIM) that binds to a ligand of a B cell stimulatory receptor and/or antagonizes activity of a B cell stimulatory receptor; wherein:

the ligand of a B cell stimulatory receptor is APRIL or BAFF; and/or

the B cell stimulatory receptor is TACI, BCMA, or BAFF-receptor.

3. claims: 1-164(partially)

An immunomodulatory protein comprising:

(1) at least one T cell inhibitory molecule (TIM) that binds to (i) a T cell stimulatory receptor, or (ii) a ligand of a T cell stimulatory receptor; and/or that antagonizes activity of a T cell stimulatory receptor; and
(2) at least one B cell inhibitory molecule (BIM) that binds to a ligand of a B cell stimulatory receptor and/or antagonizes activity of a B cell stimulatory receptor;

wherein the BIM is a TACI extracellular domain or a binding portion thereof that binds to APRIL, BAFF, or a BAFF/APRIL heterotrimer.

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2021/031432

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

4. claims: 1-164(partially)

An immunomodulatory protein comprising:

(1) at least one T cell inhibitory molecule (TIM) that binds to (i) a T cell stimulatory receptor, or (ii) a ligand of a T cell stimulatory receptor; and/or that antagonizes activity of a T cell stimulatory receptor; and

(2) at least one B cell inhibitory molecule (BIM) that binds to a ligand of a B cell stimulatory receptor and/or antagonizes activity of a B cell stimulatory receptor.

wherein the BIM is a BCMA extracellular domain or a binding portion thereof that binds to APRIL, BAFF, or a BAFF/APRIL heterotrimer.

5. claims: 49-164(partially)

An immunomodulatory protein comprising a variant BCMA polypeptide, wherein the variant BCMA polypeptide comprises one or more amino acid substitutions in the extracellular domain (ECD) of a reference BCMA polypeptide at positions selected from among 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 and 48, corresponding to numbering of positions set forth in SEQ ID NO:710.

An immunomodulatory protein comprising a variant BCMA-Fc fusion protein, wherein the variant BCMA-Fc fusion protein comprises a variant BCMA polypeptide, an Fc region, and a linker between the BCMA polypeptide and Fc region, wherein the variant BCMA polypeptide comprises one or more amino acid substitutions in the extracellular domain (ECD) of a reference BCMA polypeptide corresponding to positions selected from among 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 46, 47 and 48 with reference to positions set forth in SEQ ID NO:710.

6. claims: 1-48, 51-164(all partially)

An immunomodulatory protein comprising:

(1) at least one T cell inhibitory molecule (TIM) that binds to (i) a T cell stimulatory receptor, or (ii) a ligand of a T cell stimulatory receptor; and/or that antagonizes activity of a T cell stimulatory receptor; and

(2) at least one B cell inhibitory molecule (BIM) that binds to a ligand of a B cell stimulatory receptor and/or antagonizes activity of a B cell stimulatory receptor.

wherein the at least one TIM or the at least one BIM is linked to a multimerization moiety that promotes dimerization, wherein the immunomodulatory protein is a dimer.

79. The immunomodulatory protein of claim 78, wherein the multimerization domain is an immunoglobulin Fc region.

10

20

30

40

50

International Application No. **PCT/US2021/031432**

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	5/38 (2006.01)	A 6 1 P	5/38	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
		A 6 1 K	39/395	D
		A 6 1 K	39/395	N

(32)優先日 令和2年9月18日(2020.9.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ディロン ステイシー

アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州 シアトル イースト ブレイン ストリート 1 8 8 ス
イト 2 0 0

- (72)発明者 リクソン マーク
アメリカ合衆国 98102 ワシントン州 シアトル イースト ブレイン ストリート 188 ス
イート 200
- (72)発明者 エヴァンス ローレンス
アメリカ合衆国 98102 ワシントン州 シアトル イースト ブレイン ストリート 188 ス
イート 200
- (72)発明者 デモンテ ダニエル ウィリアム
アメリカ合衆国 98102 ワシントン州 シアトル イースト ブレイン ストリート 188 ス
イート 200
- (72)発明者 カイパー ジョセフ エル.
アメリカ合衆国 98102 ワシントン州 シアトル イースト ブレイン ストリート 188 ス
イート 200
- (72)発明者 ペン スタンフォード エル.
アメリカ合衆国 98102 ワシントン州 シアトル イースト ブレイン ストリート 188 ス
イート 200
- (72)発明者 スワンソン ライアン
アメリカ合衆国 98102 ワシントン州 シアトル イースト ブレイン ストリート 188 ス
イート 200
- F ターム (参考) 4C084 AA01 AA02 AA03 AA07 BA02 BA08 BA21 BA23 MA02 MA13
MA16 MA17 MA31 MA35 MA37 MA43 MA44 MA52 MA55 MA56 MA58
MA60 MA63 MA66 NA05 NA14 ZA011 ZA012 ZA151 ZA152 ZA211 ZA212
ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA941
ZA942 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB331 ZB332
ZC021 ZC022 ZC061 ZC062 ZC081 ZC082 ZC351 ZC352 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 BB42 CC23 EE03 GG01 GG02 GG03
GG04 GG05 GG06 GG08
4H045 AA10 BA10 BA41 CA40 DA50 EA20 FA72 FA74

【要約の続き】

