

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7679300号  
(P7679300)

(45)発行日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(24)登録日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08

請求項の数 38 (全125頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-545613(P2021-545613)	(73)特許権者	000001029 協和キリン株式会社 東京都千代田区大手町一丁目9番2号
(86)(22)出願日	令和2年9月11日(2020.9.11)	(74)代理人	110001508 弁理士法人 津国
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/034444	(72)発明者	金井 暁子 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内
(87)国際公開番号	WO2021/049606	(72)発明者	細見 仁美 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内
(87)国際公開日	令和3年3月18日(2021.3.18)	(72)発明者	米澤 早紀子 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内
審査請求日	令和5年9月8日(2023.9.8)	審査官	長谷川 強
(31)優先権主張番号	特願2019-167728(P2019-167728)		
(32)優先日	令和1年9月13日(2019.9.13)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D c R 3 改変体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

野生型哺乳動物 Decoy Receptor 3 (以下、D c R 3 と略記する) の改変体である D c R 3 改変体であって、第1のキメラ型システインリッチ領域又は第2のキメラ型システインリッチ領域を含み、

第1のキメラ型システインリッチ領域が、以下の ( a )、( b )、( c ) 又は ( d ) :

( a ) 野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型 D c R 3 のシステインリッチドメイン1 (以下、C R D 1 と略記する) が、哺乳動物 O s t e o p r o t e g e r i n (以下、O P G と略記する) の C R D 1 で置換されたアミノ酸配列 ;

( b ) 野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型 D c R 3 の C R D 4 が、O P G の C R D 4 で置換されたアミノ酸配列 ;

( c ) 野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型 D c R 3 の C R D 1 が、O P G の C R D 1 で置換され、そして、野生型 D c R 3 の C R D 4 が、O P G の C R D 4 で置換されたアミノ酸配列 ; 又は

( d ) 前記 ( a )、( b ) 又は ( c ) のアミノ酸配列において、N末端から103番目~123番目の部分が、O P G のシステインリッチドメインのアミノ酸配列のうち対応する部分で置換されたアミノ酸配列 ;

のいずれか1つを含み、

野生型 D c R 3 の C R D 2 及び C R D 3 は、第1のキメラ型システインリッチ領域に保持される ; そして

第2のキメラ型システインリッチ領域が、以下の(e)：

(e) 第1のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列において、1～5個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、

前記(e)のアミノ酸配列は、以下：

- 前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から57番目のG l uの他のアミノ酸への置換；

- 前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から58番目のA r gの他のアミノ酸への置換；及び

- 前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から60番目のA r gの他のアミノ酸への置換；

10

からなる群より選択される1又は2以上の置換を有する、又は

前記(e)のアミノ酸配列は、以下の(f)～(i)：

(f) 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から131番目及び144番目のA s nの他のアミノ酸への置換；

(g) 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から131番目、144番目及び157番目のA s nの他のアミノ酸への置換；

(h) 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から133番目のT h r及び146番目のS e rの他のアミノ酸への置換；又は

(i) 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から133番目のT h r、146番目のS e r及び159番目のT h rの他のアミノ酸への置換；

20

から選択される置換を有する、

D c R 3 改変体。

【請求項2】

1以上のN-グリコシド結合複合型糖鎖を有する、請求項1に記載のD c R 3 改変体。

【請求項3】

L I G H T、T L 1 A及びF a s Lのうちの少なくとも一つ以上に対して中和活性を有する、

L I G H T、T L 1 A及びF a s Lの全てに対して中和活性を有する、

F a s Lに対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T及びT L 1 Aのいずれか一つ以上に対して中和活性を有する、又は

30

F a s Lに対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T及びT L 1 Aに対して中和活性を有する、請求項1又は2に記載のD c R 3 改変体。

【請求項4】

前記第1のキメラ型システインリッチ領域が、前記野生型D c R 3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型D c R 3のC R D 1が、O P GのC R D 1で置換され、且つ、野生型D c R 3のC R D 4が、O P GのC R D 4で置換されたアミノ酸配列からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載のD c R 3 改変体。

【請求項5】

前記(a)のアミノ酸配列が、配列番号26又は50に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、

40

前記(b)のアミノ酸配列が、配列番号28又は52に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、

前記(c)のアミノ酸配列が、配列番号30又は54に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、

前記(d)のアミノ酸配列が、配列番号32又は56に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列である、請求項1～4のいずれか一項に記載のD c R 3 改変体。

【請求項6】

前記(e)のアミノ酸配列が、前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列

50

のN末端から57番目のGlu及び58番目のArgの、他のアミノ酸への置換を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項7】

前記(e)のアミノ酸配列が、以下：

- 前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から57番目のGluのLys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile又はMetへの置換；

- 前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から58番目のArgのAsp、Glu又はThrへの置換；及び

- 前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から60番目のArgのLysへの置換；

からなる群より選択される1又は2以上の置換を有する、請求項1～6のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項8】

前記(e)のアミノ酸配列が、前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から57番目のGluのLys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile又はMetへの置換、及び前記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から58番目のArgのAsp、Glu又はThrへの置換を有する、請求項6に記載のDcR3改変体。

【請求項9】

前記(e)のアミノ酸配列が、以下の(f')～(i')：

(f') 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から131番目及び144番目のAsnのSerへの置換；

(g') 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から131番目、144番目及び157番目のAsnのSerへの置換；

(h') 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から133番目のThr及び146番目のSerのAlaへの置換；又は

(i') 前記(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から133番目のThr、146番目のSer及び159番目のThrのAlaへの置換；

から選択される置換を有する、請求項1～8のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項10】

前記(e)のアミノ酸配列が、配列番号58、60、62、64、66、68、70、180、182、184、186、188、270、272、274、276、278、280、282、284又は286に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列である、請求項1～9のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項11】

前記DcR3改変体が、前記第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域と、前記第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域のC末端側に結合した前記野生型DcR3のヘパラン硫酸結合ドメインとを含むDcR3改変体であるか、あるいは、前記第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域を含み、前記野生型DcR3のヘパラン硫酸結合ドメインを含まないDcR3改変体である、請求項1～10のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項12】

前記DcR3改変体が、配列番号50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、180、182、184、186、188、270、272、274、276、278、280、282、284又は286に記載のアミノ酸配列を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項13】

前記DcR3改変体が、配列番号66又は186に記載のアミノ酸配列を含む、請求項

10

20

30

40

50

12に記載のDcR3改変体。

【請求項14】

前記DcR3改変体が、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体又はヒトIgG4抗体のFc領域、又は、前記Fc領域のアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなる変異型Fc領域を含む、請求項1~13のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項15】

前記変異型Fc領域が、ヒトIgG1の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される220番目のCysのSerへの置換を含む、請求項14に記載のDcR3改変体。

10

【請求項16】

前記変異型Fc領域が、ヒトIgG1の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される234番目のLeuのAlaへの置換、235番目のLeuのAlaへの置換、及び237番目のGlyのAlaへの置換を含む、請求項15に記載のDcR3改変体。

【請求項17】

前記変異型Fc領域が、ヒトIgG1の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される434番目のAsnのAlaへの置換を含む、請求項15又は16に記載のDcR3改変体。

【請求項18】

前記変異型Fc領域が、ヒトIgG1の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される252番目のMetのTyrへの置換、254番目のSerのThrへの置換、及び256番目のThrのGluへの置換を含む、請求項15に記載のDcR3改変体。

20

【請求項19】

前記変異型Fc領域が、ヒトIgG4の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される228番目のSerのProへの置換、235番目のLeuのGluへの置換、及び409番目のArgのLysへの置換を含む、請求項14に記載のDcR3改変体。

【請求項20】

前記DcR3改変体が、配列番号72、74、156、158、160、162、164、166、311、312又は313に記載のアミノ酸配列、又は配列番号72、74、156、158、160、162、164、166、311、312又は313に記載のアミノ酸配列において、1~5個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなる変異型Fc領域を含み、1~5個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列は、Fc領域のアミノ酸配列である、請求項14~19のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

30

【請求項21】

前記DcR3改変体であって、以下：

- 配列番号164に記載の変異型Fc領域、又は配列番号164のアミノ酸配列において1個のアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列；及び

- 第1のキメラ型システインリッチ領域又は第2のキメラ型システインリッチ領域であって、ここで

40

(i) 第1のキメラ型システインリッチ領域は、野生型DcR3のCRD1のOPGのCRD1への置換、及び野生型DcR3のCRD4のOPGのCRD4への置換を有し、そして

(ii) 第2のキメラ型システインリッチ領域は、57番目のGluのLys、Leu、Arg及びValから選択される他のアミノ酸への置換、又は57番目のGluのLys、Leu、Arg及びValから選択される他のアミノ酸への置換及び58番目のArgのAsp及びGluから選択される他のアミノ酸への置換を有する、

キメラ型システインリッチ領域

を含む、請求項14~19のいずれか一項に記載のDcR3改変体。

【請求項22】

50

前記 D c R 3 改変体であって、以下：

- 配列番号 1 6 0 又は 1 6 6 に記載の変異型 F c 領域、又は配列番号 1 6 0 又は 1 6 6 のアミノ酸配列において 1 個のアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列；及び

- 第 1 のキメラ型システインリッチ領域又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域であって、ここで

( i ) 第 1 のキメラ型システインリッチ領域は、野生型 D c R 3 の C R D 1 の O P G の C R D 1 への置換、及び野生型 D c R 3 の C R D 4 の O P G の C R D 4 への置換を有し、そして

( i i ) 第 2 のキメラ型システインリッチ領域は、57 番目の G l u の L y s、L e u、A r g 及び V a l から選択される他のアミノ酸への置換、又は 57 番目の G l u の L y s、L e u、A r g 及び V a l から選択される他のアミノ酸への置換及び 58 番目の A r g の A s p 及び G l u から選択される他のアミノ酸への置換を有する、キメラ型システインリッチ領域

を含む、請求項 1 4 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の D c R 3 改変体。

【請求項 2 3】

前記 D c R 3 改変体であって、以下：

- 配列番号 1 5 8 に記載の変異型 F c 領域、又は配列番号 1 5 8 のアミノ酸配列において 1 個のアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列；及び

- 第 1 のキメラ型システインリッチ領域又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域であって、ここで

( i ) 第 1 のキメラ型システインリッチ領域は、野生型 D c R 3 の C R D 1 の O P G の C R D 1 への置換、及び野生型 D c R 3 の C R D 4 の O P G の C R D 4 への置換を有し、そして

( i i ) 第 2 のキメラ型システインリッチ領域は、57 番目の G l u の L y s、L e u、A r g 及び V a l から選択される他のアミノ酸への置換、又は 57 番目の G l u の L y s、L e u、A r g 及び V a l から選択される他のアミノ酸への置換及び 58 番目の A r g の A s p 及び G l u から選択される他のアミノ酸への置換を有する、キメラ型システインリッチ領域

を含む、請求項 1 4 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の D c R 3 改変体。

【請求項 2 4】

第 2 のキメラ型システインリッチ領域は、57 番目の G l u の L y s 又は A r g への置換及び 58 番目の A r g の A s p 又は G l u への置換を有する、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の D c R 3 改変体。

【請求項 2 5】

前記 D c R 3 改変体が、配列番号 7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、9 4、9 6、9 8、1 5 0、1 6 8、1 7 0、1 7 2、1 7 4、1 7 6、1 7 8、1 9 0、1 9 2、1 9 4、1 9 6、1 9 8、2 0 0、2 0 2、2 0 4、2 0 6、2 0 8、2 1 0、2 1 2、2 1 4、2 1 6、2 1 8、2 2 0、2 2 2、2 2 4、2 2 6、2 2 8、2 3 0、2 3 2、2 3 4、2 3 6、2 3 8、2 4 0、2 4 2、2 4 4、2 4 6、2 4 8、2 5 0、2 5 2、2 5 4、2 5 6、2 5 8、2 6 0、2 6 2、2 6 4、2 6 6、2 6 8、2 8 8、2 9 0、2 9 2、2 9 4、2 9 6、2 9 8、3 0 0、3 0 2、3 0 4、3 1 4、3 1 5、3 1 6、3 1 7、3 1 8、3 1 9、3 2 0、3 2 1、3 2 2、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 6 又は 3 3 7 に記載のアミノ酸配列、あるいは、上記アミノ酸配列に対して 9 9 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の D c R 3 改変体。

【請求項 2 6】

前記 D c R 3 改変体が、配列番号 2 1 4 に記載のアミノ酸配列、又は配列番号 2 1 4 に対して 9 9 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 5 に記載の D c R 3 改変体。

10

20

30

40

50

## 【請求項 27】

前記 D c R 3 変体が、配列番号 224 に記載のアミノ酸配列、又は配列番号 224 に対して 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 25 に記載の D c R 3 変体。

## 【請求項 28】

前記 D c R 3 変体が、配列番号 256 に記載のアミノ酸配列、又は配列番号 256 に対して 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 25 に記載の D c R 3 変体。

## 【請求項 29】

前記 D c R 3 変体が、配列番号 266 に記載のアミノ酸配列、又は配列番号 266 に対して 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 25 に記載の D c R 3 変体。

10

## 【請求項 30】

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の D c R 3 変体をコードする、DNA。

## 【請求項 31】

請求項 30 に記載の DNA を含む、遺伝子組換え体ベクター。

## 【請求項 32】

請求項 31 に記載の遺伝子組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる、形質転換体。

## 【請求項 33】

宿主細胞が哺乳動物由来の細胞である、請求項 32 に記載の形質転換体。

20

## 【請求項 34】

哺乳動物由来の細胞が CHO 細胞である、請求項 33 に記載の形質転換体。

## 【請求項 35】

請求項 32 ~ 34 のいずれか一項に記載の形質転換体を培地中にて培養し、D c R 3 変体を生成及び蓄積させ、得られた培養液から前記 D c R 3 変体を精製することを特徴とする、D c R 3 変体又は D c R 3 変体組成物の製造方法。

## 【請求項 36】

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の D c R 3 変体を有効成分として含む、医薬組成物。

30

## 【請求項 37】

自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患の予防又は治療剤である、請求項 36 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 38】

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の D c R 3 変体の、自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患の予防剤又は治療剤を製造するための使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、野生型 D c R 3 の変体である D c R 3 変体に関する。より詳しくは、本発明は、D c R 3 のリガンドに対する結合活性（好ましくは中和活性）を有するとともに、哺乳動物由来の細胞を宿主として作製する時に野生型 D c R 3 と比較して凝集体の生成量が低下する、及び/又は、改善した体内動態を示す D c R 3 変体に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

Tumor necrosis factor (TNF) スーパーファミリー (TNFSF) 及び TNF 受容体スーパーファミリー (TNFRSF) はそれぞれ、構造的に類似した 18 個のリガンド及び 29 個の受容体ファミリーを形成している。このファミリーに含まれる多くの分子に対する抗体及び Fc 融合タンパク質が開発及び上市され、種々の自己免疫疾患の治療において治療効果を示している（非特許文献 1）。

50

## 【0003】

TNFRSFの多くは細胞膜上に発現し、リガンド結合により下流にシグナルを伝達するが、いくつかの分子はシグナル伝達に関与しない、おとり(デコイ)受容体(DcR)である。デコイ受容体は、これまでにDcR1、DcR2、DcR3及びOPG(Osteoprotegerin)の4つが同定されている。

## 【0004】

OPGはRANKL及びTRAILに対する可溶性デコイ受容体であり、RANKL受容体及びTRAIL受容体のリガンドとの結合に競合することでシグナル伝達を阻害する。一方、DcR1及びDcR2はTRAILに対して、並びに、DcR3はLIGHT、TL1A、及びFasLの3分子に対して、いずれもシグナルを伝達する受容体との結合を競合的に阻害することでリガンドを中和するデコイ受容体である(非特許文献2)。

10

## 【0005】

DcR3は300アミノ酸残基からなる可溶性分子である。N末端側にはシグナルペプチド、次いでTNFRSFに特徴的なシステインリッチドメイン(CRD)を4つ有し(CRD1、CRD2、CRD3及びCRD4)、C末端側にはヘパラン硫酸結合モチーフを含む塩基性アミノ酸に富んだヘパラン硫酸結合領域(HBD)を有する。LIGHT、TL1A及びFasLはいずれもDcR3のCRD2及びCRD3を介して結合する(非特許文献3、4、5)。

## 【0006】

DcR3は、リガンド中和によるデコイ受容体としての機能以外にも、HBDの活性に基づく免疫調節分子としての機能がある。例えば、単球、マクロファージ、又は樹状細胞の細胞膜上のヘパラン硫酸をはじめとするグリコサミノグリカン(GAG)に対してHBDを介して直接結合し、樹状細胞の分化によるTh2誘導、M2マクロファージの誘導、単球の接着亢進、破骨細胞分化、又はMHCクラスII分子の発現低下等、様々な免疫抑制及び免疫賦活作用を惹起することが報告されている。(非特許文献6、12)。

20

## 【0007】

DcR3リガンドは自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー、がん、感染症、又はその他各種炎症反応における関与が報告されている。例えば、LIGHT、TL1A及びFasLはいずれも炎症性腸疾患(IBD)において感受性遺伝子座に含まれており、特に、TL1Aについては病態に関連する複数の遺伝子多型の存在が分かっている。また、IBD患者の血中又は組織におけるDcR3リガンドの発現亢進、及び、マウス腸炎モデルにおけるDcR3リガンド阻害による病態改善の報告もある(非特許文献6~9)。

30

## 【0008】

ヒトの正常組織におけるDcR3の発現は極めて低レベルであるが、感染又は組織障害によりその発現が誘導される。更に、IBD、全身性エリテマトーデス(SLE)、アトピー性皮膚炎(AD)、又は関節リウマチ(RA)等の種々の自己免疫疾患又は炎症性疾患において、DcR3の血中レベルが上昇していることが分かっている。また、マウスではDcR3ホモログが同定されていないが、I型糖尿病モデル、多発性硬化症モデル、又は腎炎モデル等のマウス病態モデルにおいては、ヒトDcR3のトランスジェニックマウスにおける病態の改善、及び、プラスミド又は組換えDcR3投与による薬効が、それぞれ確認されている(非特許文献6、10)。

40

## 【0009】

Genentech社は、ヒトDcR3遺伝子をクローニングし、DcR3及びヒトIgG1のFc領域との融合体が、可溶性ヒトFasLに結合すること、*in vitro*においてヒトFasL依存的なアポトーシスを阻害することを示した(特許文献1)。

## 【0010】

Eli Lilly社は、野生型DcR3の1アミノ酸変異(R218Q)により、プロテアーゼ耐性のDcR3変異体であるFLINTを取得し、マウス及びサルにおいて野生型DcR3よりも体内動態が改善することを報告している。しかしながら、カニクイザルに野生型DcR3及びFLINTを0.5mg/kg 静脈内注射で投与した際の血中

50

半減期は、それぞれ、9時間及び12.3時間と極めて短い(特許文献2、3、非特許文献11)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【文献】特許第4303883号

【文献】米国特許 US 6,835,814 B1

【文献】米国特許 US 6,965,012 B1

【非特許文献】

【0012】

【文献】Nature Reviews Drug Discovery, 2013, 12 : p. 147 - 168

【文献】Nature Reviews Cancer, 2002.2 : p. 420 - 430

【文献】Structure, 2011, 19 : p. 162 - 171

【文献】Structure, 2014, 22 : p. 1252 - 1262

【文献】Structure, 2016, 24 : p. 2016 - 2023

【文献】Biochemical Pharmacology, 2011, 81 : p. 838 - 847

【文献】Immunology, 2009, 128 : p. 451 - 458

【文献】P. N. A. S., 2006, 103 : p. 8441 - 8446

【文献】Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2003, 285 : p. G754 - G760

【文献】Journal of Biomedical Science, 2017, 24 : 39

【文献】Drug Metabolism and Disposition, 2003, 31 : p. 502 - 507

【文献】J. Immunol., 2006, 176 : p. 173 - 180

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

野生型DcR3のアミノ酸改変体であるFLINTは体内動態が著しく悪く、作用機序がリガンド中和である組換え製剤としては頻回投与が必要となり、医薬品として望ましくない。したがって、体内動態の改善により、一定期間の投与間隔を確保できるDcR3改変体は、医薬品としてその有用性が期待される。

【0014】

また、現在までに知られている限り、哺乳動物由来の細胞を宿主として発現、単離及び精製した際に凝集体生成量が低下し、且つ、DcR3リガンドに対する中和活性を有する機能的なDcR3改変体は見出されていない。

【0015】

本発明は、DcR3のリガンドに対する結合活性(好ましくは中和活性)を有し、且つ哺乳動物由来の細胞を宿主としてDcR3タンパク質を作製する時に野生型DcR3と比較して凝集体の生成量が低下する、及び/又は、改善した体内動態を示すDcR3改変体、該DcR3改変体をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いる改変体の製造方法、並びに、該改変体を有効成分とする医薬組成物及び自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギーの予防又は治療剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記課題を解決するために、本発明は、以下の発明を提供する。

[1]野生型Decoy Receptor 3(以下、DcR3と略記する)の改変体で

10

20

30

40

50

ある D c R 3 改変体であって、前記野生型 D c R 3 よりも改善した体内動態を示す、前記 D c R 3 改変体。

[ 2 ] 1 以上の N - グリコシド結合複合型糖鎖を有する、[ 1 ] に記載の D c R 3 改変体。  
[ 3 ] L I G H T、T L 1 A 及び F a s L のうちの少なくとも一つ以上に対して中和活性を有する、[ 1 ] 又は [ 2 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 4 ] L I G H T、T L 1 A 及び F a s L の全てに対して中和活性を有する、[ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 5 ] F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つ以上に対して中和活性を有する、[ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 6 ] F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して中和活性を有する、[ 1 ] ~ [ 3 ] 及び [ 5 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 7 ] 野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域において、野生型 D c R 3 のシステインリッチドメイン（以下、C R D と略記する）の少なくとも一部が、D c R 3 以外の T N F 受容体スーパーファミリー分子のシステインリッチドメインの少なくとも一部で置換されたアミノ酸配列からなる第 1 のキメラ型システインリッチ領域、あるいは、前記第 1 のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列において、1 ~ 3 0 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなる第 2 のキメラ型システインリッチ領域を含む、D c R 3 改変体。

[ 8 ] 1 以上の N - グリコシド結合複合型糖鎖を有する、[ 7 ] に記載の D c R 3 改変体。  
[ 9 ] L I G H T、T L 1 A 及び F a s L のうちの少なくとも一つ以上に対して中和活性を有する、[ 7 ] 又は [ 8 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 1 0 ] L I G H T、T L 1 A 及び F a s L の全てに対して中和活性を有する、[ 7 ] ~ [ 9 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 1 1 ] F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つ以上に対して中和活性を有する、[ 7 ] ~ [ 9 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 1 2 ] F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して中和活性を有する、[ 7 ] ~ [ 9 ] 及び [ 1 1 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 1 3 ] 前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子が O P G である、[ 7 ] ~ [ 1 2 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 1 4 ] 前記野生型 D c R 3 のシステインリッチドメインの少なくとも一部が、C R D 1 の全部又は一部、C R D 2 の全部又は一部、C R D 3 の全部又は一部、及び、C R D 4 の全部又は一部から選択され、

前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子のシステインリッチドメインの少なくとも一部が、C R D 1 の全部又は一部、C R D 2 の全部又は一部、C R D 3 の全部又は一部、及び、C R D 4 の全部又は一部から選択される、[ 7 ] ~ [ 1 3 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 1 5 ] 前記第 1 のキメラ型システインリッチ領域が、

前記野生型 D c R 3 の C R D 1 の一部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の C R D 1 のうち前記野生型 D c R 3 の C R D 1 の一部と対応する部分での置換、

前記野生型 D c R 3 の C R D 1 の全部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の C R D 1 の全部での置換、

前記野生型 D c R 3 の C R D 2 の一部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の C R D 2 のうち前記野生型 D c R 3 の C R D 2 の一部と対応する部分での置換、

前記野生型 D c R 3 の C R D 2 の全部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の C R D 2 の全部での置換、

前記野生型 D c R 3 の C R D 3 の一部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の C R D 3 のうち前記野生型 D c R 3 の C R D 3 の一部と対応する部分での置換、

前記野生型 D c R 3 の C R D 3 の全部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の

10

20

30

40

50

C R D 3 の全部での置換、

前記野生型 D c R 3 の C R D 4 の一部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の C R D 4 のうち前記野生型 D c R 3 の C R D 4 の一部と対応する部分での置換、及び

前記野生型 D c R 3 の C R D 4 の全部の、前記 T N F 受容体スーパーファミリー分子の C R D 4 の全部での置換

から選択される一つ以上の置換を有する、[ 1 4 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 1 6 ] 前記第 1 のキメラ型システインリッチ領域において、前記野生型 D c R 3 の C R D 2 の一部又は全体が保持されている、[ 1 5 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 1 7 ] 前記第 1 のキメラ型システインリッチ領域において、前記野生型 D c R 3 の C R D 3 の一部又は全体が保持されている、[ 1 5 ] 又は [ 1 6 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 1 8 ] 前記第 1 のキメラ型システインリッチ領域が、以下の ( a )、( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列を含み、前記第 2 のキメラ型システインリッチ領域が、以下の ( e ) のアミノ酸配列を含む、[ 1 4 ] ~ [ 1 7 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

( a ) 前記野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型 D c R 3 の C R D 1 が、O P G の C R D 1 で置換されたアミノ酸配列

( b ) 前記野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型 D c R 3 の C R D 4 が、O P G の C R D 4 で置換されたアミノ酸配列

( c ) 前記野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型 D c R 3 の C R D 1 が、O P G の C R D 1 で置換され、且つ、野生型 D c R 3 の C R D 4 が、O P G の C R D 4 で置換されたアミノ酸配列

( d ) 前記 ( a )、( b ) 又は ( c ) のアミノ酸配列において、N 末端から 1 0 3 番目 ~ 1 2 3 番目の部分が、O P G のシステインリッチドメインのアミノ酸配列のうち対応する部分で置換されたアミノ酸配列

( e ) 前記 ( a )、( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列において、1 ~ 3 0 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列

[ 1 9 ] 前記 ( a ) のアミノ酸配列が、配列番号 2 6 又は 5 0 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、

前記 ( b ) のアミノ酸配列が、配列番号 2 8 又は 5 2 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、

前記 ( c ) のアミノ酸配列が、配列番号 3 0 又は 5 4 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、

前記 ( d ) のアミノ酸配列が、配列番号 3 2 又は 5 6 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列である、[ 1 8 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 2 0 ] 前記 ( e ) のアミノ酸配列が、前記 ( a )、( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 5 7 番目の G l u、5 8 番目の A r g 及び 6 0 番目の A r g からなる群から選択される 1 個又は 2 個以上のアミノ酸の、他のアミノ酸への置換を有する、[ 1 8 ] 又は [ 1 9 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 2 1 ] 前記 ( e ) のアミノ酸配列が、前記 ( a )、( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 5 7 番目の G l u 及び 5 8 番目の A r g の、他のアミノ酸への置換を有する、[ 1 8 ] ~ [ 2 0 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 2 2 ] 前記 ( e ) のアミノ酸配列が、前記 ( a )、( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 5 7 番目の G l u の L y s、L e u、A r g、V a l、A l a、P h e、H i s、I l e 又は M e t への置換、5 8 番目の A r g の A s p、G l u 又は T h r への置換、及び、6 0 番目の A r g の L y s への置換からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の置換を有する、[ 1 8 ] ~ [ 2 1 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 2 3 ] 前記 ( e ) のアミノ酸配列が、前記 ( a )、( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 5 7 番目の G l u の L y s、L e u、A r g、V a l、A l a、P h e、H i s、I l e 又は M e t への置換、及び、前記 N 末端から 5 8 番目の A r g の A s p、G l u 又は T h r への置換を有する、[ 1 8 ] ~ [ 2 2 ] のいずれか一つに記載の D

10

20

30

40

50

c R 3 改変体。

[ 2 4 ] 前記 ( e ) のアミノ酸配列が、以下の ( f ) ~ ( i ) から選択される置換を有する、[ 1 8 ] ~ [ 2 3 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

( f ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 1 番目及び 1 4 4 番目の A s n の他のアミノ酸への置換

( g ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 1 番目、1 4 4 番目及び 1 5 7 番目の A s n の他のアミノ酸への置換

( h ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 3 番目の T h r 及び 1 4 6 番目の S e r の他のアミノ酸への置換

( i ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 3 番目の T h r、1 4 6 番目の S e r 及び 1 5 9 番目の T h r の他のアミノ酸への置換

10

[ 2 5 ] 前記 ( e ) のアミノ酸配列が、以下の ( f ' ) ~ ( i ' ) から選択される置換を有する、[ 1 8 ] ~ [ 2 4 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

( f ' ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 1 番目及び 1 4 4 番目の A s n の S e r への置換

( g ' ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 1 番目、1 4 4 番目及び 1 5 7 番目の A s n の S e r への置換

( h ' ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 3 番目の T h r 及び 1 4 6 番目の S e r の A l a への置換

( i ' ) 前記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列の N 末端から 1 3 3 番目の T h r、1 4 6 番目の S e r 及び 1 5 9 番目の T h r の A l a への置換

20

[ 2 6 ] 前記 ( e ) のアミノ酸配列が、配列番号 5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、1 8 0、1 8 2、1 8 4、1 8 6、1 8 8、2 7 0、2 7 2、2 7 4、2 7 6、2 7 8、2 8 0、2 8 2、2 8 4 又は 2 8 6 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列である、[ 1 8 ] ~ [ 2 5 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

[ 2 7 ] 前記 D c R 3 改変体が、前記第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域と、前記第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端側に結合した前記野生型 D c R 3 のヘパラン硫酸結合領域の一部又は全部とを含む D c R 3 改変体であるか、あるいは、前記第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域を含み、前記野生型 D c R 3 のヘパラン硫酸結合領域を含まない D c R 3 改変体である、[ 7 ] ~ [ 2 6 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

30

[ 2 8 ] 前記 D c R 3 改変体が、

( I ) 配列番号 2 6、2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4 又は 4 6 に記載のアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列において、1 ~ 3 0 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、

( I I ) 配列番号 5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、1 8 0、1 8 2、1 8 4、1 8 6、1 8 8、2 7 0、2 7 2、2 7 4、2 7 6、2 7 8、2 8 0、2 8 2、2 8 4 又は 2 8 6 に記載のアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列において、1 ~ 3 0 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を含む、[ 2 7 ] に記載の D c R 3 改変体。

40

[ 2 9 ] 前記 D c R 3 改変体が、ヒト I g G 1、I g G 2 又は I g G 4 抗体由来の F c 領域、又は、前記 F c 領域のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなる変異型 F c 領域を含む、[ 7 ] ~ [ 2 8 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 3 0 ] 前記 F c 領域又は前記変異型 F c 領域が、その他の領域又はリンカーを介して、前記第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端側に結合している、[ 2 9 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 3 1 ] 前記変異型 F c 領域が、ヒト I g G 1 の重鎖のアミノ酸配列のうち、E U インデックスで示される 2 2 0 番目の C y s の S e r への置換を有する、[ 2 9 ] 又は [ 3 0 ]

50

に記載の D c R 3 改変体。

[ 3 2 ] 前記変異型 F c 領域が、ヒト I g G 1 の重鎖のアミノ酸配列のうち、E U インデックスで示される 2 3 4 番目の L e u の A l a への置換、2 3 5 番目の L e u の A l a への置換、及び、2 3 7 番目の G l y の A l a への置換を有する、[ 3 1 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 3 3 ] 前記変異型 F c 領域が、ヒト I g G 1 の重鎖のアミノ酸配列のうち、E U インデックスで示される 4 3 4 番目の A s n の A l a への置換を有する、[ 3 1 ] 又は [ 3 2 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 3 4 ] 前記変異型 F c 領域が、ヒト I g G 1 の重鎖のアミノ酸配列のうち、E U インデックスで示される 2 5 2 番目の M e t の T y r への置換、2 5 4 番目の S e r の T h r への置換、及び、2 5 6 番目の T h r の G l u への置換を有する、[ 3 1 ] に記載の D c R 3 改変体。

10

[ 3 5 ] 前記変異型 F c 領域が、ヒト I g G 4 の重鎖のアミノ酸配列のうち、E U インデックスで示される 2 2 8 番目の S e r の P r o への置換、2 3 5 番目の L e u の G l u への置換、及び、4 0 9 番目の A r g の L y s への置換を有する、[ 2 9 ] 又は [ 3 0 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 3 6 ] 前記 D c R 3 改変体が、配列番号 7 2、7 4、1 5 6、1 5 8、1 6 0、1 6 2、1 6 4、1 6 6、3 1 1、3 1 2 又は 3 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる変異型 F c 領域を含む、[ 2 9 ] 又は [ 3 0 ] に記載の D c R 3 改変体。

[ 3 7 ] 前記 D c R 3 改変体が、配列番号 7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、9 4、9 6、9 8、1 5 0、1 6 8、1 7 0、1 7 2、1 7 4、1 7 6、1 7 8、1 9 0、1 9 2、1 9 4、1 9 6、1 9 8、2 0 0、2 0 2、2 0 4、2 0 6、2 0 8、2 1 0、2 1 2、2 1 4、2 1 6、2 1 8、2 2 0、2 2 2、2 2 4、2 2 6、2 2 8、2 3 0、2 3 2、2 3 4、2 3 6、2 3 8、2 4 0、2 4 2、2 4 4、2 4 6、2 4 8、2 5 0、2 5 2、2 5 4、2 5 6、2 5 8、2 6 0、2 6 2、2 6 4、2 6 6、2 6 8、2 8 8、2 9 0、2 9 2、2 9 4、2 9 6、2 9 8、3 0 0、3 0 2、3 0 4、3 1 4、3 1 5、3 1 6、3 1 7、3 1 8、3 1 9、3 2 0、3 2 1、3 2 2、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 6 又は 3 3 7 に記載のアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列において、1 ~ 3 0 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含む、[ 2 9 ] ~ [ 3 6 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体。

20

30

[ 3 8 ] [ 1 ] ~ [ 3 7 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体を含む、D c R 3 改変体組成物。

[ 3 9 ] 1 以上の N - グリコシド結合複合型糖鎖を有する D c R 3 改変体と、N - グリコシド結合複合型糖鎖を有しない D c R 3 改変体とを含む、[ 3 8 ] に記載の組成物。

[ 4 0 ] [ 1 ] ~ [ 3 7 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体をコードする D N A。

[ 4 1 ] [ 4 0 ] に記載の D N A を含有する遺伝子組換え体ベクター。

[ 4 2 ] [ 4 1 ] に記載の遺伝子組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

[ 4 3 ] 宿主細胞が哺乳動物由来の細胞である、[ 4 2 ] に記載の形質転換体。

40

[ 4 4 ] 哺乳動物由来の細胞が C H O 細胞である、[ 4 3 ] に記載の形質転換体。

[ 4 5 ] [ 4 2 ] ~ [ 4 4 ] のいずれか一つに記載の形質転換体を培地中にて培養し、[ 1 ] ~ [ 3 7 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体を生成及び蓄積させ、得られた培養液から前記 D c R 3 改変体を精製することを特徴とする、D c R 3 改変体又は D c R 3 改変体組成物の製造方法。

[ 4 6 ] [ 4 5 ] に記載の製造方法を用いて製造される、D c R 3 改変体又は D c R 3 改変体組成物。

[ 4 7 ] [ 1 ] ~ [ 3 9 ] 及び [ 4 6 ] のいずれか一つに記載の D c R 3 改変体又は D c R 3 改変体組成物を有効成分として含有する、医薬組成物。

[ 4 8 ] 自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患の予防又は治療剤である、[ 4

50

7]に記載の医薬組成物。

[49]自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患の予防又は治療が必要な患者に、[47]又は[48]に記載の医薬組成物を投与することを含む、自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患の予防又は治療方法。

【発明の効果】

【0017】

本発明により、DcR3のリガンドに対する結合活性（好ましくは中和活性）を有し、且つ哺乳動物由来の細胞を宿主としてDcR3タンパク質を作製する際に野生型DcR3と比較して凝集体の生成量が減少する、及び/又は、改善した体内動態を示すDcR3改変体、該DcR3改変体をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを導

10

入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いる改変体の製造方法、並びに、該改変体を有効成分とする医薬組成物及び自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギーの予防又は治療剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1Aは哺乳動物細胞で作製した各種野生型DcR3コントロールのSDS-PAGEの結果を示す。レーン1、3はDcR3 FL-Fc、レーン2、4はDcR3 FL-FLAG、レーン5、6はS195-Fc(g1S)を、それぞれ非還元あるいは還元条件下において電気泳動した。図1BはHEK293細胞で作製された市販ヒトDcR3-Fc(レーン7)を非還元条件下において電気泳動し、抗ヒトIgG抗体によるイムノブロットで検出した。図1Cは昆虫細胞で作製された市販DcR3 FL-Fc(レーン8、9)、S195-Fc(g1S)(レーン10、11)、DcR3 FL-Fc(g1S)(レーン14、15、18、19)及びR218Q-Fc(g1S)(レーン12、13、16、17)を、それぞれ非還元あるいは還元条件下において電気泳動した。Mは分子量マーカー(バイオラッド社)を示す。

20

【図2】図2はヒトDcR3及びヒトOPGの未成熟型アミノ酸配列のアライメントにおいて、システインリッチドメインをそれぞれCRD1、CRD2、CRD3、CRD4として示したものである。

【図3】図3は作製した各種野生型DcR3コントロール、各種DcR3改変体、及び、ヒトOPGのドメイン構造を、それぞれ模式的に示す。A：DcR3 FL-Fc、B：S195-Fc、C：キメラA-Fc、D：103-123OPG-Fc、E：N型糖鎖2置換体-Fc、F：N型糖鎖3置換体-Fc、G：キメラB-Fc、H：キメラC-Fc、I：OPG。E及びFのCRD4の縦線はN型糖鎖付加残基の置換がそれぞれ2ヶ所又は3ヶ所存在することを示し、IのDDはDeath domainを示す。

30

【図4】図4は哺乳動物細胞で作製した各種DcR3改変体のSDS-PAGEの結果を示す。レーン1、4はExp1293細胞で作製したキメラA-Fc(IEGRMD g1S)、レーン2、5はCHO-S細胞で作製したキメラA-Fc(IEGRMD g1S)、レーン3、6はExp1293細胞で作製したキメラB-Fc(g1S)、レーン7、8はExp1293細胞で作製したキメラC-Fc(IEGRMD g1S)を非還元あるいは還元条件下において電気泳動した。Mは分子量マーカー(バイオラッド社)を示す。

40

【図5】図5はDSF法による融解曲線を、R218Q-Fc、S195-Fc及びキメラA-Fc(IEGRMD g1S)について示す。縦軸は蛍光強度RFU( $10^3$ )、横軸は温度( )を示す。

【図6】図6は、ヒトプライマリー細胞及びCHO細胞に対する、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体の結合を示す。各細胞に $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の各DcR3改変体を反応させ、続いて $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のPE標識抗ヒト抗体で染色し、フローサイトメトリーによりPEの蛍光強度を測定した。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo. Mean)を示す。上段はHUVEC、中段はHepatocyte、下段はCHO細胞の染色結果を示す。

50

【図7】図7は、BALB/cマウスにおいて、S195-Fc及びキメラA-Fc ( I E G R M D g 1 S ) を  $10 \text{ mg / kg i . v .}$  投与した際の血中濃度推移を示す。縦軸は血中濃度 (  $\text{ng / mL}$  ) を、横軸は投与後の経過時間 (  $\text{hr}$  ) を示す。

【図8】図8AはRANKL ( O P G リガンド )、図8BはTRAIL ( O P G リガンド ) に対する、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体の結合を、それぞれ示す。抗ヒト抗体を固相化したプレートに各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体を捕捉させた後、各濃度に希釈したRANKL又はTRAILを添加し、結合を評価した。検出にはビオチン化抗RANKL抗体又はビオチン化抗TRAIL抗体と、ストレプトアビジン-HRPを用いた。横軸にはRANKL又はTRAILの濃度 (  $\text{pg / mL}$  ) を、縦軸には吸光度 (  $450 \text{ nm}$  の吸光度から  $570 \text{ nm}$  の吸光度を差し引いた値 ) を示す。

10

【図9】図9は、LIGHTに対する、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体の中和活性を示す。LIGHTを  $100 \text{ ng / mL}$ 、並びに、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体を  $0.1$ 、 $1$ 、あるいは  $10 \mu\text{g / mL}$  添加した際の、HT-29細胞からのIL-8産生を示す。縦軸はIL-8濃度 (  $\text{pg / mL}$  ) を、横軸はインヒビターとして加えた各種DcR3改変体を示す。

【図10】図10は、TL1Aに対する、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体の中和活性を示す。TL1Aを  $100 \text{ ng / mL}$ 、並びに、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体を  $0.1$ 、 $1$ 、あるいは  $10 \mu\text{g / mL}$  添加した際の、ヒトT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を示す。縦軸はIFN- $\gamma$ 濃度 (  $\text{pg / mL}$  ) を、横軸はインヒビターとして加えた各種DcR3改変体を示す。

20

【図11】図11は、FasLに対する、各種野生型DcR3及び各種DcR3改変体コントロールの中和活性を示す。FasLを  $100 \text{ ng / mL}$ 、並びに、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体を  $0.01$ 、 $0.1$ 、あるいは  $1 \mu\text{g / mL}$  添加した際の、Jurkat生細胞由来のATP産生量をRLUで示す。縦軸はATP依存的な化学発光を指標にした細胞生存 (  $\text{RLU} \times 10^6$  ) を、横軸はインヒビターとして加えた各種DcR3改変体を示す。

【図12A】図12Aは、各DcR3リガンドに対する、キメラA-Fc ( g 4 P E K ) 及びFasL結合性低下改変体 ( g 4 P E K ) の結合を示す。抗ヒト抗体を固相化したセンサーチップに、キメラA-Fc ( g 4 P E K ) 又は各FasL結合性低下改変体を捕捉させ、アナライトとしてDcR3リガンド ( ヒトFasL、ヒトLIGHT、ヒトTL1A ) を流した際の、センサーグラムを示す。縦軸は結合量 ( RU ) を、横軸は時間 ( Sec ) を示す。

30

【図12B】図12Bは、各DcR3リガンドに対する、FasL結合性低下改変体 ( g 4 P E K ) の結合を示す。抗ヒト抗体を固相化したセンサーチップに、各FasL結合性低下改変体を捕捉させ、アナライトとしてDcR3リガンド ( ヒトFasL、ヒトLIGHT、ヒトTL1A ) を流した際の、センサーグラムを示す。縦軸は結合量 ( RU ) を、横軸は時間 ( Sec ) を示す。

【図12C】図12Cは、各DcR3リガンドに対する、FasL結合性低下改変体 ( g 4 P E K ) の結合を示す。抗ヒト抗体を固相化したセンサーチップに、各FasL結合性低下改変体を捕捉させ、アナライトとしてDcR3リガンド ( ヒトFasL、ヒトLIGHT、ヒトTL1A ) を流した際の、センサーグラムを示す。縦軸は結合量 ( RU ) を、横軸は時間 ( Sec ) を示す。

40

【図13】図13は、各種哺乳動物細胞で作製された野生型DcR3コントロールのSDS-PAGEの結果を示す。SDS-PAGEは、各種哺乳動物細胞で作製された市販ヒトDcR3-Fcを還元又は非還元条件下において電気泳動することにより行った。哺乳動物細胞としては、レーン1、4ではHEK293細胞 ( アブカム社 )、レーン2、5ではCHO細胞 ( A d i p o G e n 社 )、レーン3、6ではHEK293細胞 ( E n z o 社 ) を使用した。Mは分子量マーカー ( バイオラッド社 ) を示す。

【図14A】図14Aは、ProteinA精製したFasL結合性低下改変体のSEC

50

- H P L C 又は S E C - U P L C のピーク面積から算出した単量体、凝集体及び分解物含有量の割合 (%) を示す。図 1 4 A は、作製した全ての F a s L 結合性低下改変体 ( g 4 P E K ) の結果を示す。

【図 1 4 B】図 1 4 B は、P r o t e i n A 精製した F a s L 結合性低下改変体の S E C - H P L C 又は S E C - U P L C のピーク面積から算出した単量体、凝集体及び分解物含有量の割合 (%) を示す。図 1 4 B は、選抜した F a s L 結合性低下改変体の各種変異型 F c 融合体の結果を示す。

【図 1 4 C】図 1 4 C は、P r o t e i n A 精製した各種キメラ A - 変異型 F c 融合体の S E C - H P L C 又は S E C - U P L C のピーク面積から算出した単量体、凝集体及び分解物含有量の割合 (%) を示す。

【図 1 5 A】図 1 5 A は、各 D c R 3 リガンドに対する各種 D c R 3 改変体の結合活性を B I A c o r e により測定した結果を示す。抗ヒト抗体を固相化したセンサーチップに各種 D c R 3 改変体を捕捉させ、アナライトとして三量体 D c R 3 リガンド ( ヒト F a s L 、 ヒト L I G H T 、 又はヒト T L 1 A ) を流した際の各種速度論定数 (  $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$  ) を示す。図 1 5 A は、F c 配列の異なる各種キメラ A - F c の結果を示す。

【図 1 5 B】図 1 5 B は、各 D c R 3 リガンドに対する各種 D c R 3 改変体の結合活性を B I A c o r e により測定した結果を示す。抗ヒト抗体を固相化したセンサーチップに各種 D c R 3 改変体を捕捉させ、アナライトとして三量体 D c R 3 リガンド ( ヒト F a s L 、 ヒト L I G H T 、 又はヒト T L 1 A ) を流した際の各種速度論定数 (  $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$  ) を示す。図 1 5 B は、F a s L 結合性低下改変体の結果を示す。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、F a s L 結合性低下改変体選抜時の B I A c o r e により算出した各 D c R 3 リガンドに対する速度論定数 (  $K_D$  値 ) をキメラ A - F c ( g 4 P E K ) と比較した結果を示す。図 1 6 A は、1 アミノ酸置換体の結果を示す。

【図 1 6 B】図 1 6 B は、F a s L 結合性低下改変体選抜時の B I A c o r e により算出した各 D c R 3 リガンドに対する速度論定数 (  $K_D$  値 ) をキメラ A - F c ( g 4 P E K ) と比較した結果を示す。図 1 6 B は、2 アミノ酸置換体の結果を示す。

【図 1 7 A】図 1 7 A は、可溶性 L I G H T に対する各種 D c R 3 改変体の中和活性評価の結果を示す。図 1 7 A は、F c 配列の異なる各種キメラ A - F c による、I F N - 刺激腸筋線維芽細胞からの L I G H T 依存的 - C X C L 1 0 産生に対する阻害活性を示す。縦軸は C X C L 1 0 濃度 (  $ng/mL$  ) を、横軸は添加した D c R 3 改変体濃度 (  $ng/mL$  ) を示す。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、可溶性 L I G H T に対する各種 D c R 3 改変体の中和活性評価の結果を示す。図 1 7 B は、異なる変異導入 F c 配列を有するキメラ A - F c による、I F N - 刺激腸筋線維芽細胞からの L I G H T 依存的 C X C L 1 0 産生に対する阻害活性を示す。縦軸は C X C L 1 0 濃度 (  $ng/mL$  ) を、横軸は添加した D c R 3 改変体濃度 (  $ng/mL$  ) を示す。

【図 1 7 C】図 1 7 C は、可溶性 L I G H T に対する各種 D c R 3 改変体の中和活性評価の結果を示す。図 1 7 C は、1 アミノ酸置換 F a s L 結合性低下改変体による、H T - 2 9 細胞からの L I G H T 依存的 I L - 8 産生に対する阻害活性を示す。縦軸は I L - 8 濃度 (  $ng/mL$  ) を、横軸は添加した D c R 3 改変体濃度 (  $ng/mL$  ) を示す。

【図 1 7 D】図 1 7 D は、可溶性 L I G H T に対する各種 D c R 3 改変体の中和活性評価の結果を示す。図 1 7 D は、2 アミノ酸置換 F a s L 結合性低下改変体による、I F N - 刺激腸筋線維芽細胞からの L I G H T 依存的 C X C L 1 0 産生に対する阻害活性を示す。縦軸は C X C L 1 0 濃度 (  $ng/mL$  ) を、横軸は添加した D c R 3 改変体濃度 (  $ng/mL$  ) を示す。

【図 1 8 A】図 1 8 A は、可溶性 T L 1 A に対する各種 D c R 3 改変体の中和活性評価の結果を示す。図 1 8 A は、F c 配列の異なる各種キメラ A - F c による、I L - 1 2 及び I L - 1 8 刺激ヒト T 細胞からの T L 1 A 依存的 I F N - 産生に対する阻害活性を示す。縦軸は I F N - 濃度 (  $pg/mL$  ) を、横軸は添加した D c R 3 改変体濃度 (  $ng/mL$  ) を示す。

10

20

30

40

50

【図18B】図18Bは、可溶型TL1Aに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図18Bは、異なる変異導入Fc配列を有するキメラA-Fcによる、IL-12及びIL-18刺激ヒトT細胞からのTL1A依存的IFN- $\gamma$ 産生に対する阻害活性を示す。縦軸はIFN- $\gamma$ 濃度(pg/mL)を、横軸は添加したDcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

【図18C】図18Cは、可溶型TL1Aに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図18Cは、1アミノ酸置換FasL結合性低下改変体による、IL-12及びIL-18刺激ヒトT細胞からのTL1A依存的IFN- $\gamma$ 産生に対する阻害活性を示す。縦軸はIFN- $\gamma$ 濃度(pg/mL)を、横軸は添加したDcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

10

【図18D】図18Dは、可溶型TL1Aに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図18Dは、2アミノ酸置換FasL結合性低下改変体による、IL-12及びIL-18刺激ヒトT細胞からのTL1A依存的IFN- $\gamma$ 産生に対する阻害活性を示す。縦軸はIFN- $\gamma$ 濃度(pg/mL)を、横軸は添加したDcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

【図19A】図19Aは、可溶型FasLに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図19Aは、Fc配列の異なる各種キメラA-Fcによる、A3細胞の細胞死に対する阻害活性を示す。縦軸はATP依存的な化学発光を指標にした細胞生存(RLU $\times 10^6$ )を、横軸は添加した各種DcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

【図19B】図19Bは、可溶型FasLに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図19Bは、異なる変異導入Fc配列を有するキメラA-Fcによる、Jurkat細胞の細胞死に対する阻害活性を示す。縦軸はATP産生量を指標にした細胞生存(RLU $\times 10^6$ )を、横軸は添加した各種DcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

20

【図19C】図19Cは、可溶型FasLに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図19Cは、1アミノ酸置換FasL結合性低下改変体による、Jurkat細胞の細胞死に対する阻害活性を示す。縦軸はATP産生量を指標にした細胞生存(RLU $\times 10^6$ )を、横軸は添加した各種DcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

【図19D】図19Dは、可溶型FasLに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図19Dは、2アミノ酸置換FasL結合性低下改変体による、Jurkat細胞の細胞死に対する阻害活性を示す。縦軸はATP産生量を指標にした細胞生存(RLU $\times 10^6$ )を、横軸は添加した各種DcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

30

【図20A】図20Aは、膜型LIGHT強制発現株に対する、S195-Fc及びFc配列の異なる各種キメラA-Fcの結合活性評価の結果を示す。各細胞に各種DcR3改変体を反応させ、PE標識抗ヒト抗体で染色し、フローサイトメトリーによりPEの蛍光強度を測定した。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo. Mean)を示す。

【図20B】図20Bは、膜型TL1A及び膜型FasL強制発現株に対する、S195-Fc及びFc配列の異なる各種キメラA-Fcの結合活性評価の結果を示す。各細胞に各種DcR3改変体を反応させ、PE標識抗ヒト抗体で染色し、フローサイトメトリーによりPEの蛍光強度を測定した。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo. Mean)を示す。

40

【図21A】図21Aは、膜型LIGHT強制発現株に対する、S195-Fc、各種キメラA-Fc、FasL結合性低下改変体の結合活性評価の結果を示す。各細胞に各種DcR3改変体を反応させ、PE標識抗ヒト抗体で染色し、フローサイトメトリーによりPEの蛍光強度を測定した。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo. Mean)を示す。

【図21B】図21Bは、膜型TL1A強制発現株に対する、S195-Fc、各種キメラA-Fc、FasL結合性低下改変体の結合活性評価の結果を示す。各細胞に各種DcR3改変体を反応させ、PE標識抗ヒト抗体で染色し、フローサイトメトリーによりPEの蛍光強度を測定した。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo. Mean)を示す。

【図21C】図21Cは、膜型FasL強制発現株に対する、キメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体(g4PEK)の結合活性評価の結果を示す。各細胞に各種DcR3

50

改変体を反応させ、PE標識抗ヒト抗体で染色し、フローサイトメトリーによりPEの蛍光強度を測定した。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo. Mean)を示す。

【図22】図22は、プライマリー細胞の膜型LIGHTに対するキメラA-Fcの結合活性評価の結果を示す。図22Aは、活性化ヒトT細胞上の膜型LIGHTの発現をPE標識抗LIGHT抗体により測定した結果を示す。図22Bは、活性化ヒトT細胞上の膜型LIGHTに対するAlexa Fluor 488標識キメラA-Fcの結合を、フローサイトメトリーにより測定し、算出した幾何平均(Geo. Mean)を示す。いずれも縦軸は、蛍光強度の幾何平均(Geo. Mean)を示す。

【図23】図23は、プライマリー細胞の膜型TL1Aに対するキメラA-Fcの結合活性評価の結果を示す。HUVEC細胞上の膜型TL1Aに対する、競合タンパク質存在下又は非存在下における、Alexa Fluor 647標識キメラA-Fcの結合をそれぞれフローサイトメトリーにより測定し、算出した幾何平均(Geo. Mean)を示す。

【図24】図24は、プライマリー細胞由来のFasLに対するキメラA-Fcの結合活性を、AICD誘導ヒトT細胞の培養上清中における可溶性FasLに対するサンドイッチELISAによって測定した結果を示す。図24Aは、キメラA-Fcを、図24Bは、Fas-Fcをそれぞれ捕捉したプレートに培養上清を添加し、抗FasL抗体で検出した際の450nmにおける吸光度の値を示す。

【図25】図25は、Fc配列の異なる各種キメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)における溶出時間(分)の結果を示す。

【図26】図26は、Fc配列の異なる各種キメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体の、Differential Scanning Fluorimetry(DSF)法により算出したTm値( )の結果を示す。

【図27】図27は、BALB/cマウスにおける、Fc配列の異なるキメラA-Fc(Eg1S)及びFasL結合性低下改変体の、10mg/kg i.v.投与後の消失相の血中半減期(h)及び無限時間までの血中濃度-時間曲線下面積AUC0-( $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}$ )の値を示す。

【図28A】図28Aは、マウス急性異種間GVHDモデルを用いたキメラA-Fcの薬効試験における肉眼的病態スコアの指標を示す。

【図28B】図28Bは、各群の個体毎及び各群の平均の病態スコアを示す。縦軸に病態スコア、横軸に各治療群を示す。

【図29】図29は、マウス急性異種間GVHDモデルを用いたキメラA-Fcの薬効試験におけるヒトCD45陽性、ヒトCD3及びCD4陽性、ヒトCD3及びCD8陽性の各細胞について、脾臓あたりの細胞数を各群の個体毎及び各群の平均値で示す。1群はヒト細胞移入なし、2群はヒト細胞移入ありDNP抗体投与群、3群はヒト細胞移入ありキメラA-Fc投与群をそれぞれ示す。縦軸に各表面マーカー陽性細胞数、横軸に各治療群を示す。

【図30A】図30Aは、各種DcR3改変体のヒトDcR3リガンドに対する結合活性をBIAcoreにより測定した結果を示す。ヒトDcR3リガンドとして、ヒトFasL、ヒトLIGHT、又はヒトTL1Aの三量体を用いた際の各種速度論定数( $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$ )を示す。

【図30B】図30Bは、各種DcR3改変体のカニクイザルDcR3リガンドに対する結合活性をBIAcoreにより測定した結果を示す。カニクイザルDcR3リガンドとして、カニクイザルFasL、カニクイザルLIGHT、又はカニクイザルTL1Aの三量体を用いた際の各種速度論定数( $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$ )を示す。

【図31】図31は、可溶性LIGHTに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図31は、各種変異Fcを有するキメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体の、腸筋線維芽細胞のLIGHT依存的CXCL10産生に対する阻害活性を示す。縦軸はCXCL10濃度( $\text{ng/mL}$ )を、横軸は添加したDcR3改変体濃度( $\text{ng/mL}$ )を示す。

【図32】図32は、可溶性TL1Aに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果

10

20

30

40

50

を示す。図32は、各種変異Fcを有するキメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体の、ヒトT細胞のTL1A依存的IFN- $\gamma$ 産生に対する阻害活性を示す。縦軸はIFN- $\gamma$ 濃度(pg/mL)を、横軸は添加したDcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

【図33】図33は、可溶性FasLに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図33は、各種変異Fcを有するキメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体による、Jurkat細胞の細胞死に対する阻害活性を示す。縦軸はATP依存的な化学発光を指標とした細胞生存(RLU $\times 10^6$ )を、横軸は添加した各種DcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

【図34A】図34Aは、膜型LIGHT強制発現株に対する各種DcR3改変体の結合活性を、フローサイトメトリーで評価した結果を示す。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo.Mean)を示す。

10

【図34B】図34Bは、膜型TL1A強制発現株に対する各種DcR3改変体の結合活性をフローサイトメトリーにより評価した結果を示す。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo.Mean)を示す。

【図34C】図34Cは、膜型FasL強制発現株に対する各種DcR3改変体の結合活性をフローサイトメトリーにより評価した結果を示す。グラフの縦軸は、PEの幾何平均(Geo.Mean)を示す。

【図35】図35は、膜型LIGHTに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図35は、各種変異Fcを有するキメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体の、腸筋線維芽細胞の膜型LIGHT依存的CXCL10産生に対する阻害活性を示す。縦軸はCXCL10濃度(ng/mL)を、横軸は添加したDcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

20

【図36】図36は、膜型TL1Aに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図36は、各種変異Fcを有するキメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体による、ヒトCD4陽性T細胞の膜型TL1A依存的IFN- $\gamma$ 産生に対する阻害活性を示す。縦軸はIFN- $\gamma$ 濃度(pg/mL)を、横軸は添加したDcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

【図37】図37は、膜型FasLに対する各種DcR3改変体の中和活性評価の結果を示す。図37は、各種変異Fcを有するキメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体による、Jurkat細胞の膜型FasL依存的細胞死に対する阻害活性を示す。グラフの縦軸は、Annexin V陽性である死細胞分画の割合(%)を、横軸は添加した各種DcR3改変体濃度(ng/mL)を示す。

30

【図38A】図38Aは、リコンビナントヒトLIGHTに対する各種DcR3改変体の結合活性をサンドイッチELISAによって測定した結果を示す。縦軸は450nmの吸光度から570nmの吸光度を差し引いた値を、横軸は添加したリコンビナントヒトLIGHTの濃度(ng/mL)を示す。

【図38B】図38Bは、ヒトプライマリー細胞由来のLIGHTに対する各種DcR3改変体の結合活性を、ヒトT細胞の培養上清中の可溶性LIGHTに対するサンドイッチELISAによって測定した結果を示す。白いバーはヒトT細胞を刺激なしで培養した時の培養上清を、黒いバーは抗CD3抗体及び抗CD28抗体で刺激したヒトT細胞の培養上清を用いた結果を示す。縦軸は450nmの吸光度から570nmの吸光度を差し引いた値を示す。

40

【図38C】図38Cは、リコンビナントヒトTL1Aに対する各種DcR3改変体の結合活性をサンドイッチELISAによって測定した結果を示す。縦軸は450nmの吸光度から570nmの吸光度を差し引いた値を、横軸はリコンビナントTL1Aの濃度(ng/mL)を示す。

【図38D】図38Dは、ヒトプライマリー細胞由来のTL1Aに対する各種DcR3改変体の結合活性を、ヒトPBMCの培養上清中の可溶性TL1Aに対するサンドイッチELISAによって測定した結果を示す。白いバーはヒトPBMCを刺激なしで培養した時の培養上清を、黒いバーは免疫複合体で刺激したヒトPBMCの培養上清を用いた結果を

50

示す。縦軸は450 nmの吸光度から570 nmの吸光度を差し引いた値を示す。

【図38E】図38Eは、リコンビナントヒトFasLに対する各種DcR3改変体の結合活性を、サンドイッチELISAによって測定した結果を示す。縦軸は450 nmの吸光度から570 nmの吸光度を差し引いた値を、横軸はヒトFasL濃度 (ng/mL) を示す。

【図38F】図38Fは、ヒトプライマリー細胞由来のFasLに対する各種DcR3改変体の結合活性を、AICD誘導ヒトT細胞の培養上清中における可溶性FasLに対するサンドイッチELISAによって測定した結果を示す。白いバーはAICD誘導していないヒトT細胞の培養上清を、黒いバーはAICD誘導ヒトT細胞の培養上清を用いた結果を示す。縦軸は450 nmの吸光度から570 nmの吸光度を差し引いた値を示す。

【図39】図39は、各種DcR3改変体をBALB/cマウスに10 mg/kg i.v. 投与した後の消失相の血中半減期 (h) 及び無限時間までの血中濃度 - 時間曲線下面積AUC<sub>0-</sub> (μg \* h \* mL) の値を示す。

【図40】図40は、哺乳動物細胞に一過性に発現させたFc融合されていない各種DcR3改変体をイムノプロットで検出した結果を示す。レーン1、5はS195-His6を発現させた培養上清の30倍濃縮液、レーン2、6はキメラA-His6を発現させた培養上清の6倍希釈液、レーン3、7はE57K-His6を発現させた培養上清の6倍希釈液、レーン4、8は45-18-His6を発現させた培養上清の6倍希釈液を、それぞれ非還元又は還元条件下において電気泳動し、抗6x-Hisタグ抗体によるイムノプロットで検出した。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【0020】

以下で説明する形態のうち2以上の形態を組み合わせることができ、このような組み合わせも本発明に包含される。

【0021】

本発明は、野生型DcR3の改変体であるDcR3改変体に関する。具体的には、本発明は、DcR3リガンド結合活性 (又は中和活性) を有し、且つ野生型DcR3よりも改善した体内動態及び/又は哺乳動物細胞での生産の際に野生型DcR3よりも低下した凝集性を示すDcR3改変体、並びに、野生型DcR3のシステインリッチドメインにおいて、1又は2以上のアミノ酸に変異を導入したシステインリッチドメインを含むDcR3改変体に関する。

【0022】

1. 野生型DcR3

DcR3は一般的にDecoy Receptor 3、DCR3、TNFRSF6B (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B)、TR6又はM68とも呼称される。DcR3は、TNF受容体スーパーファミリーに属する、膜貫通ドメインを保有しない可溶性のデコイ受容体であり、LIGHT、TL1A、又はFasLの3つのリガンドと結合することにより、それぞれのリガンドと受容体との結合を競合的に阻害し、リガンドを中和する。また、リガンドの中和と異なる機能として、ヘパラン硫酸結合領域 (HBD) を介して、単球、マクロファージ、又は樹状細胞の細胞膜上のヘパラン硫酸をはじめとするグリコサミノグリカン (GAG) に対して直接結合し、様々な免疫抑制及び免疫賦活作用を惹起することが報告されている [Biochemical Pharmacology, 2011, 81: p. 838-847, J. Immunol., 2006, 176: p. 173-180]。

【0023】

天然に存在するDcR3は、CRD1、CRD2、CRD3、CRD4及びHBDをN

末端側から順に有する。天然に存在する D c R 3 は、C R D 1 と C R D 2 との間に存在する領域、C R D 2 と C R D 3 との間に存在する領域、C R D 3 と C R D 4 との間に存在する領域、及び、C R D 4 と H B D との間に存在する領域をさらに有する。天然に存在する D c R 3 のシステインリッチ領域は、C R D 1 の N 末端から C R D 4 の C 末端までの領域であり、C R D 1、C R D 2、C R D 3 及び C R D 4 を含むとともに、C R D 1 と C R D 2 との間に存在する領域、C R D 2 と C R D 3 との間に存在する領域、及び、C R D 3 と C R D 4 との間に存在する領域を含む。「野生型 D c R 3」は、システインリッチ領域及び H B D を含む分子であって、システインリッチ領域及び H B D が野生型である（すなわち、システインリッチ領域及び H B D が、天然に存在する D c R 3 のシステインリッチ領域及び H B D と同一である）分子を意味する。したがって、天然に存在する D c R 3 に加えて、天然に存在する D c R 3 のシステインリッチ領域及び H B D を含む限り、遺伝子多型、アイソフォーム等の天然に存在する D c R 3 の変異体も「野生型 D c R 3」に包含される。また、未成熟型 D c R 3 及び成熟型 D c R 3 も「野生型 D c R 3」に包含される。「未成熟型 D c R 3」は、シグナルペプチドを有する D c R 3 を意味し、「成熟型 D c R 3」は、シグナルペプチドが切断された D c R 3 を意味する。シグナルペプチドは、天然に存在する D c R 3 由来の配列、人工配列、発現ベクター由来の配列、天然に存在する D c R 3 を発現させる宿主細胞に適した他のタンパク質由来の配列のいずれでも良い。また、使用するシグナルペプチドによって切断箇所が異なる場合、成熟型の N 末端のアミノ酸が異なる配列も「野生型 D c R 3」に含まれる。天然に存在する D c R 3 の C R D 及び野生型 D c R 3 の C R D を「野生型 C R D」、天然に存在する D c R 3 のシステインリッチ領域及び野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域を「野生型システインリッチ領域」とも言う。

#### 【0024】

本発明における野生型 D c R 3 は、その由来が限定されるものではないが、種々の真核生物由来の D c R 3 が挙げられる。例えば、カエル等の両生類、ニワトリ等の鳥類、又は哺乳動物、例えば、ヒトを含む霊長類、又はブタやウシ等の偶蹄類由来の D c R 3 が挙げられる。本発明の D c R 3 改変体をヒトに使用する場合、野生型 D c R 3 として、ヒト由来の D c R 3 を用いることが好ましい。

#### 【0025】

ヒト由来の D c R 3 の c D N A 配列は、配列番号 1 で表され、対応する m R N A 配列は、アクセッション番号：NM\_\_003823.3としてGenBank（米国NCBI）に登録されている。ヒト由来の D c R 3 のアミノ酸配列は、配列番号 2 で表され、アクセッション番号：NP\_\_003814.1としてGenBank（米国NCBI）に登録されている。未成熟型のヒト D c R 3 は、N 末端にシグナルペプチド、次いで T N F 受容体スーパーファミリーに特徴的な 4 つの C R D（C R D 1、C R D 2、C R D 3、C R D 4）を有し、C 末端に塩基性アミノ酸に富んだ H B D を有する。成熟型のヒト D c R 3 は、未成熟型のうちシグナルペプチドが切断されたものであり、成熟型のヒト D c R 3 のアミノ酸配列は、例えば配列番号 4 で表され、成熟型のヒト D c R 3 のアミノ酸配列をコードする D N A の塩基配列は、例えば配列番号 3 で表される。本発明においては、ヒト D c R 3 のアミノ酸配列（配列番号 2）のうち、N 末端から 30 ~ 70 番目の領域が C R D 1（配列番号 6）、73 ~ 113 番目の領域が C R D 2（配列番号 8）、115 ~ 150 番目の領域が C R D 3（配列番号 10）、153 ~ 193 番目の領域が C R D 4（配列番号 12）、196 ~ 300 番目の領域が H B D（配列番号 48）と定義される（図 2）。ヒト D c R 3 の C R D 1、C R D 2、C R D 3、C R D 4 及び H B D のアミノ酸配列をコードする D N A の塩基配列は、それぞれ、例えば、配列番号 5、7、9、11 及び 47 で表される。また、C R D のアミノ酸配列は上述される以外にも複数の定義があるが、いずれの C R D のアミノ酸配列の定義であっても公知の情報を利用して本発明の D c R 3 改変体に用いることができる [UniProt O95407、GenBank NP\_\_003814.1、Structure, 2011, 19: p. 162 - 171]。

#### 【0026】

DcR3のリガンドとしては、上述の通り、いずれもTNFSFに属するLIGHT、TL1A及びFasLが挙げられる。

#### 【0027】

LIGHT (lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D (gD) for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes) は一般的に、TNFSF14 (Tumor necrosis factor superfamily member 14)、LTg、HVEM-L又はCD258とも呼称される。ヒトLIGHTのmRNA配列及びそれに対応するcDNA配列は、アクセッション番号：NM\_003807.4として、アミノ酸配列は、アクセッション番号：NP\_003798.2としてGenBank (米国NCBI) に登録されている。可溶性LIGHTは、膜型LIGHTとして細胞膜上に発現した後、プロテアーゼによって細胞外領域がシェディングされること生成される。膜型LIGHTにおける切断部位は、NP\_003798.2の82番目と83番目のアミノ酸の間である。可溶性、膜型のいずれも機能的である。

10

#### 【0028】

TL1A (Tumor necrosis factor (TNF)-like cytokine 1A) は一般的に、TNFSF15 (TNF superfamily member 15)、TL1、VEGI又はVEGI-251とも呼称される。ヒトTL1AのmRNA配列及びそれに対応するcDNA配列は、アクセッション番号：NM\_005118.3として、アミノ酸配列は、アクセッション番号：NP\_005109.2としてGenBank (米国NCBI) に登録されている。可溶性TL1Aは、膜型TL1Aとして細胞膜上に発現した後、プロテアーゼによって細胞外領域がシェディングされることで生成される。膜型TL1Aにおける切断部位は、NP\_005109.2の71番目と72番目のアミノ酸の間であり、可溶性、膜型のいずれも機能的である。

20

#### 【0029】

FasL (Fas ligand) は一般的に、FASLG、TNFSF6 (Tumor necrosis factor superfamily member 6)、CD178又はAPT1LG1とも呼称される。ヒトFasLのmRNA配列及びそれに対応するcDNA配列は、アクセッション番号：NM\_000639.2として、アミノ酸配列は、アクセッション番号：NP\_000630.1としてGenBank (米国NCBI) に登録されている。可溶性FasLは、膜型FasLとして細胞膜上に発現した後、プロテアーゼによって細胞外領域がシェディングされることで生成される。膜型FasLにおける切断部位は、NP\_000630.1の81番目と82番目の間、もしくは、129番目と130番目のアミノ酸の間である。生体内においては、膜型FasLが主に機能的なリガンドと報告されている。

30

#### 【0030】

なお、真核生物のタンパク質をコードする遺伝子には、しばしば遺伝子の多型又はアイソフォームが認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列又はアミノ酸配列に変異を生じた遺伝子も、本発明におけるLIGHT、TL1A、又はFasLをコードする遺伝子に包含される。

40

#### 【0031】

##### 2. DcR3 改変体

本発明のDcR3改変体は、キメラ型システインリッチ領域を含む。

#### 【0032】

##### 2-1. キメラ型システインリッチ領域

本発明のキメラ型システインリッチ領域は、野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、1又は2以上のアミノ酸に変異が導入されたアミノ酸配列からなる。なお、「あるアミノ酸配列/塩基配列に変異が導入された」とは、その配列において

50

1又は2以上のアミノ酸/塩基が置換、欠失、挿入又は付加されたことを意味する。「置換、欠失、挿入又は付加」には、置換、欠失、挿入及び付加から選択される2種以上の変異の組み合わせも包含される。変異は、野生型DcR3のシステインリッチ領域のうち、少なくとも、CRD1、CRD2、CRD3及びCRD4から選択される1又は2以上のCRDに導入される。野生型DcR3のシステインリッチ領域のうち、CRD1とCRD2との間に存在する領域、CRD2とCRD3との間に存在する領域、及び、CRD3とCRD4との間に存在する領域には、変異が導入されてもよいし導入されなくてもよい。CRD1とCRD2との間に存在する領域、CRD2とCRD3との間に存在する領域、及び、CRD3とCRD4との間に存在する領域から選択される1又は2以上の領域に変異が導入される場合、変異導入後の各領域を構成するアミノ酸の数は、通常1~10個、好ましくは1~7個、さらに好ましくは1~5個、さらに一層好ましくは1~3個、さらに一層好ましくは1~2個である。変異導入後の各領域のアミノ酸配列は特に限定されない。野生型DcR3のシステインリッチ領域に導入される変異には、自然に生じる変異及び人為的な変異のいずれの変異も含まれる。本発明におけるキメラ型システインリッチ領域としては、例えば、野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、1又は2以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなるキメラ型システインリッチ領域が挙げられ、このようなキメラ型システインリッチ領域としては、例えば、後述する第1及び第2のキメラ型システインリッチ領域を挙げることができる。

10

#### 【0033】

##### 2-1-1. 第1のキメラ型システインリッチ領域

20

第1のキメラ型システインリッチ領域は、野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型DcR3のCRDの少なくとも一部が、他のペプチド又はタンパク質で置換されたアミノ酸配列からなる。即ち、第1のキメラ型システインリッチ領域は、野生型DcR3のシステインリッチ領域由来のアミノ酸配列と、他のペプチド又はタンパク質由来のアミノ酸配列を含む。

#### 【0034】

野生型DcR3のシステインリッチ領域のうち、他のペプチド又はタンパク質に置換される部分は、好ましくは、CRD1、CRD2、CRD3及びCRD4から選ばれる少なくとも1つのCRDの少なくとも一部である。したがって、野生型DcR3のシステインリッチ領域のうち、他のペプチド又はタンパク質に置換される部分は、CRD1の全部又は一部、CRD2の全部又は一部、CRD3の全部又は一部、及び、CRD4の全部又は一部から選択することができる。

30

#### 【0035】

第1のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列には、野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型DcR3のCRDの少なくとも一部に加えて、野生型CRD以外の部分が他のペプチド又はタンパク質に置換されているアミノ酸配列も含まれる。他のペプチド又はタンパク質に置換されるCRD以外の部分は、CRD1とCRD2との間に存在する領域、CRD2とCRD3との間に存在する領域、及び、CRD3とCRD4との間に存在する領域から選択することができる。他のペプチド又はタンパク質に置換されるCRD以外の部分は、1つの部分であってもよいし、2つ以上の部分であってもよい。例えば、CRD1とCRD2との間に存在する領域、CRD2とCRD3との間に存在する領域、又は、CRD3とCRD4の間に存在する領域のアミノ酸配列が、他のペプチド又はタンパク質に置換されたアミノ酸配列も、第1のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列に含まれる。

40

#### 【0036】

野生型DcR3のシステインリッチ領域のうち、他のペプチド又はタンパク質に置換される部分は、1つの部分であってもよいし、2つ以上の部分であってもよい。野生型DcR3のシステインリッチ領域のうちCRDの少なくとも一部が置換される場合、置換される部分は、1つのCRDの全部又は一部でもよいし、複数のCRDの全部又は一部でもよいが、LIGHT、TL1A及びFasLとの結合に関与する野生型DcR3のCRD2

50

の全部若しくは一部、及び/又は、CRD3の全部又は一部の領域は保持され、その他のCRDの全部又は一部が他のペプチド又はタンパク質に置換されていることがより好ましい。

【0037】

置換する他のペプチド又はタンパク質としては、天然又は人工的なペプチド又はタンパク質のいずれでも良いが、例えばDcR3以外のタンパク質由来のCRDの少なくとも一部が挙げられる。好ましい一形態において、置換する他のペプチド又はタンパク質は、DcR3以外のTNF受容体スーパーファミリー(TNFRSF)分子のCRDの少なくとも一部である。すなわち、好ましい一形態において、第1のキメラ型システインリッチ領域は、野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型DcR3のシステインリッチドメインの少なくとも一部が、DcR3以外のTNFRSF分子のシステインリッチドメインの少なくとも一部で置換されたアミノ酸配列からなる。TNFRSF分子のCRDの少なくとも一部は、CRD1の全部又は一部、CRD2の全部又は一部、CRD3の全部又は一部、及び、CRD4の全部又は一部から選択することができる。したがって、第1のキメラ型システインリッチ領域は、野生型DcR3のCRD1の一部の、TNFRSF分子のCRD1のうち野生型DcR3のCRD1の一部と対応する部分での置換、野生型DcR3のCRD1の全部の、TNFRSF分子のCRD1の全部での置換、野生型DcR3のCRD2の一部の、TNFRSF分子のCRD2のうち野生型DcR3のCRD2の一部と対応する部分での置換、野生型DcR3のCRD2の全部の、TNFRSF分子のCRD2の全部での置換、野生型DcR3のCRD3の一部の、TNFRSF分子のCRD3のうち野生型DcR3のCRD3の一部と対応する部分での置換、野生型DcR3のCRD3の全部の、TNFRSF分子のCRD3の全部での置換、野生型DcR3のCRD4の一部の、TNFRSF分子のCRD4のうち野生型DcR3のCRD4の一部と対応する部分での置換、及び、野生型DcR3のCRD4の全部の、TNFRSF分子のCRD4の全部での置換から選択される一つ以上の置換を有することができる。

【0038】

第1のキメラ型システインリッチ領域としては、例えば、野生型DcR3のCRD1の、TNFRSF分子のCRD1への置換を有するキメラ型システインリッチ領域(該キメラ型システインリッチ領域において、好ましくは、野生型DcR3のその他のCRDは保持されている)、野生型DcR3のCRD4の、TNFRSF分子のCRD4への置換を有するキメラ型システインリッチ領域(該キメラ型システインリッチ領域において、好ましくは、野生型DcR3のその他のCRDは保持されている)、又は、野生型DcR3のCRD1の、TNFRSF分子のCRD1への置換、及び、野生型DcR3のCRD4の、TNFRSF分子のCRD4への置換を有するキメラ型システインリッチ領域(該キメラ型システインリッチ領域において、好ましくは、野生型DcR3のその他のCRDは保持されている)等が挙げられる。また、これらの置換の一つ以上に加えて、野生型DcR3のCRD2の一部分の、該一部分と対応するTNFRSF分子のCRD2の一部分への置換、及び/又は、野生型DcR3のCRD3の一部分の、該一部分と対応するTNFRSF分子のCRD3の一部分への置換をさらに有するキメラ型システインリッチ領域も、第1のキメラ型システインリッチ領域に含まれる。

【0039】

ヒトのTNFRSFには29個の受容体が属しており、いずれの受容体も、N末端の細胞外ドメインにCRDを有し、CRD1につき、6つのCys残基が3つのジスルフィド結合を形成するのが典型的で、各受容体によって、1つから4つのCRDを有する[Trends Biochem Sci, 2002, 27: p-19-26.]。

【0040】

ヒトのTNFRSFとしては、例えばDcR1(TNFRSF10C、TRAIL-R3、LIT、TRID、CD263)、DcR2(TNFRSF10D、TRAIL-R4、TRUNDD、CD264)、TNFR type I(TNFRSF1A、TNF-

10

20

30

40

50

R、CD120a、TNFAR、TNF-R55、TNFR60)、TNFR type II (TNFRSF1B、TNFBR、CD120b、TNFR80、p75、TNF-R75)、LTBR (Lymphotoxin beta receptor、TNFRSF3、TNFR III、TNFCR、TNFR-RP、TNFR2-RP)、OX-40 (TNFRSF4、ACT35、TXGP1L、CD134)、CD40 (TNFRSF5、Bp50、p50)、Fas (Fas cell surface death receptor、TNFRSF6、CD95、APO-1、APT1、FAS1)、CD27 (TNFRSF7、S152、Tp55)、CD30 (TNFRSF8、Ki-1)、4-1BB (TNFRSF9、CD137、ILA)、DR4 (TNFRSF10A、Apo2、TRAILR-1、CD261)、DR5 (TNFRSF10B、TRAIL-R2、KILLER、TRICK2A、TRICKB、CD262)、RANK (TNFRSF11A、CD265、FEO)、FN14 (TNFRSF12A、TweakR、CD266)、TACI (TNFRSF13B、CD267、IGAD2)、BAFFR (TNFRSF13C、CD268)、HVEM (TNFRSF14、ATAR、TR2、LIGHTR、HVEA、CD270)、NGFR (nerve growth factor receptor、TNFRSF16、p75NTR、CD271)、BCMA (TNFRSF17、BCM、CD269、TNFRSF13A)、GITR (TNFRSF18、AITR、CD357)、TROY (TNFRSF19、TAJ-alpha、TAJ、TRADE)、RELT (TNFRSF19L)、DR6 (Death Receptor 6、TNFRSF21、CD358)、DR3 (Death Receptor 3、TNFRSF25、TRAMP、WSL-1、LARD、WSL-LR、DDR3、TR3、APO-3)、EDAR (ectodysplasin A receptor、ED3、DL、ED5、EDA3、Edar、ED1R、EDA1R)、EDAR2R (ectodysplasin A2 receptor、XEDAR、EDAA2R、EDA-A2R、TNFRSF27)、又はOsteoprotegerin (OPG、TNFRSF11B、TR1、OCIF)が挙げられる。

10

20

#### 【0041】

第1のキメラ型ス테인リッチ領域において、野生型DcR3の少なくとも一部を置換する他のペプチド又はタンパク質としては、限定されるものではないが、TNFRSFの中でもOPGが特に好ましい。

30

#### 【0042】

OPGは、その由来に限定されるものではないが、種々の真核生物由来のOPGが挙げられる。例えば、カエル等の両生類、ニワトリ等の鳥類、又は哺乳動物、例えば、ヒトを含む霊長類、ブタやウシ等の偶蹄類、又はマウスを含むげっ歯類等由来のOPGが挙げられる。

#### 【0043】

ヒト由来のOPGのcDNA配列は、配列番号13で表され、対応するmRNA配列は、アクセッション番号：NM\_002546.3としてGenBank (米国NCBI)に登録されている。ヒト由来のOPGのアミノ酸配列は、配列番号14で表され、アクセッション番号：NP\_002537.3としてGenBank (米国NCBI)に登録されている。

40

#### 【0044】

未成熟型のヒトOPG (配列番号14)は、N末端にシグナルペプチドを有する。成熟型のヒトOPGは、未成熟型のうち、シグナルペプチドが切断されたものであり、成熟型のヒトOPGのアミノ酸配列は、例えば配列番号16で表され、成熟型のヒトOPGのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列は、例えば配列番号15で表される。本発明において、未成熟型ヒトOPGのアミノ酸配列 (配列番号14)のうち、N末端から22~62番目の領域がCRD1 (配列番号18)、65~105番目の領域がCRD2 (配列番号20)、107~142番目の領域がCRD3 (配列番号22)、145~185番目の領域がCRD4 (配列番号24)と定義される。ヒトOPGのCRD1、CRD2、

50

CRD3及びCRD4のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列は、それぞれ、例えば、配列番号17、19、21及び23で表される。また、CRDのアミノ酸配列については上述される以外にも複数の定義があるが、いずれのCRDアミノ酸配列の定義であっても公知の情報を利用して本発明のDcR3改変体に用いることができる[UniProt O00300、GenBank NP\_002537.3]。

【0045】

なお、真核生物のタンパク質をコードする遺伝子には、しばしば遺伝子の多型やアイソフォームが認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列又はアミノ酸配列に変異を生じた遺伝子も、本発明のOPGをコードする遺伝子に包含される。

10

【0046】

OPGはRANKLと結合し、その活性を中和することで破骨細胞による骨破壊を抑制する[J. Immunol., 2012, 189: p. 245 - 252]。また、OPGはTRAILとも結合し、その活性を中和することで、TRAILを介したアポトーシスを阻害する[Am. J. Cancer Res., 2012, 2: p. 45 - 64]。いずれのリガンドの中和によっても、望まない活性等を引き起こす可能性があることから、本発明のDcR3改変体は、RANKL及びTRAILのいずれに対しても中和活性を有さないことが望ましい。

【0047】

好ましい一形態において、第1のキメラ型システインリッチ領域は、以下の(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列を含むか、又は、該アミノ酸配列からなる。

20

(a) 野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型DcR3のCRD1が、OPGのCRD1で置換されたアミノ酸配列(該アミノ酸配列において、好ましくは、野生型DcR3のその他のCRDは保持されている)

(b) 野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型DcR3のCRD4が、OPGのCRD4で置換されたアミノ酸配列(該アミノ酸配列において、好ましくは、野生型DcR3のその他のCRDは保持されている)

(c) 野生型DcR3のシステインリッチ領域のアミノ酸配列において、野生型DcR3のCRD1が、OPGのCRD1で置換され、且つ、野生型DcR3のCRD4が、OPGのCRD4で置換されたアミノ酸配列(該アミノ酸配列において、好ましくは、野生型DcR3のその他のCRDは保持されている)

30

(d) 上記(a)、(b)又は(c)のアミノ酸配列において、野生型DcR3のCRD2の一部分が、OPGのCRD2の対応部分で置換され、且つ/又は、野生型DcR3のCRD3の一部分が、OPGのCRD3の対応部分で置換されたアミノ酸配列(該アミノ酸配列において、好ましくは、野生型DcR3のその他のCRDは保持されている)

【0048】

上記(d)のアミノ酸配列としては、例えば、(a)、(b)又は(c)のアミノ酸配列において、N末端から103番目~123番目の部分が、OPGのCRDのアミノ酸配列のうち対応する部分で置換されたアミノ酸配列が挙げられる。このアミノ酸配列は、野生型DcR3のCRD3のうち18番目~36番目の部分及びCRD3のアミノ酸配列のC末端側に続く2アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が、該アミノ酸配列と対応するOPGの一部分に置換されている。

40

【0049】

上記(a)のアミノ酸配列の具体例としては、配列番号26又は50に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1~164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列が挙げられ、上記(b)のアミノ酸配列の具体例としては、配列番号28又は52に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1~164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列が挙げられ、上記(c)のアミノ酸配列の具体例としては、配列番号30又は54に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1~164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列が挙げられ、上記(d)のアミノ酸配列の具体例としては、配列番号32又は56に記載のアミノ酸配列のうちN末端が

50

ら 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列が挙げられる。

【0050】

なお、配列番号 26 は、キメラ B - HBD (野生型 DcR3 (配列番号 4) において、CRD1 を OPG の CRD1 に置換した DcR3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 28 は、キメラ C - HBD (野生型 DcR3 (配列番号 4) において、CRD4 を OPG の CRD4 に置換した DcR3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 30 は、キメラ A - HBD (野生型 DcR3 (配列番号 4) において、CDR1 及び CDR4 をそれぞれ OPG の CDR1 及び CDR4 に置換した DcR3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 32 は、103 - 123 OPG - HBD (キメラ A - HBD において、CRD3 のうち 18 番目 ~ 36 番目の部分及びその C 末端側の 2 アミノ酸を含むアミノ酸配列をヒト OPG に置換した DcR3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 50 は、キメラ B (野生型 DcR3 (配列番号 4) において、CRD1 を OPG の CRD1 に置換し、且つヘパラン硫酸結合領域を削除した DcR3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 52 は、キメラ C (野生型 DcR3 (配列番号 4) において、CRD4 を OPG の CRD4 に置換し、且つヘパラン硫酸結合領域を削除した DcR3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 54 は、キメラ A (野生型 DcR3 (配列番号 4) において、CDR1 及び CDR4 をそれぞれ OPG の CDR1 及び CDR4 に置換し、且つヘパラン硫酸結合領域を削除した DcR3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 56 は、103 - 123 OPG (キメラ A において、CRD3 のうち 18 番目 ~ 36 番目の部分及びその C 末端側の 2 アミノ酸を含むアミノ酸配列をヒト OPG に置換した DcR3 改変体) のアミノ酸配列を表す。

10

20

【0051】

好ましい一形態において、第 1 のキメラ型システインリッチ領域を含む DcR3 改変体としては、LIGHT、TL1A 及び FasL のうちの少なくとも一つ以上に対して結合活性を有する DcR3 改変体、LIGHT、TL1A 及び FasL の全てに対して結合活性を有する DcR3 改変体、FasL に対して結合活性を有さず、且つ、LIGHT 及び TL1A のいずれか一つに対して結合活性を有する DcR3 改変体、又は、FasL に対して結合活性を有さず、且つ、LIGHT 及び TL1A に対して結合活性を有する DcR3 改変体が挙げられる。

【0052】

本発明において、「リガンドに対して結合活性を有する」とは、当該リガンドに対する第 1 のキメラ型システインリッチ領域を含む DcR3 改変体の結合活性が、当該リガンドに対する野生型 DcR3 の結合活性と比較して同等であり、有意に低下していないこと、及び、当該リガンドに対する野生型 DcR3 の結合活性と比較して、有意に増強していることを含む意味で用いられる。例えば表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) により測定する場合、野生型 DcR3 と比較して DcR3 改変体の解離定数 ( $K_D$ ) 値が 3 倍未満の場合、リガンドに対して結合活性を有すると判断することができる。

30

【0053】

本発明において、DcR3 改変体が「リガンドに対して結合活性を有さない」という表現は、当該リガンドに対する第 1 のキメラ型システインリッチ領域を含む DcR3 改変体の結合活性が、検出されないこと、及び、当該リガンドに対する野生型 DcR3 の結合活性と比較して有意に低下していることを含む意味で用いられる。例えば SPR 法により測定する場合、野生型 DcR3 と比較して DcR3 改変体の  $K_D$  値が 3 倍より大きい場合、又は DcR3 改変体の  $R_{max}$  が 5 未満の場合、リガンドに対して結合活性が優位に低下していると判断し、その DcR3 改変体がリガンドに対して結合活性を有しないと定義できる。

40

【0054】

特に好ましい一形態において、第 1 のキメラ型システインリッチ領域を含む DcR3 改変体としては、FasL に対する結合性が低下した DcR3 改変体が挙げられる。「FasL 結合性低下改変体」は、FasL に対して結合活性を有さず、且つ、LIGHT 及び TL1A のいずれか一つ以上に対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を

50

含む D c R 3 改変体、又は、F a s L に対して結合活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体を意味する。

【 0 0 5 5 】

好ましい一形態において、本発明の D c R 3 改変体は、L I G H T、T L 1 A 及び F a s L のうちの少なくとも一つ以上に対して中和活性を有する D c R 3 改変体、L I G H T、T L 1 A 及び F a s L の全てに対して中和活性を有する D c R 3 改変体、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つに対して中和活性を有する D c R 3 改変体、あるいは、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して中和活性を有する D c R 3 改変体である。

10

【 0 0 5 6 】

本発明において、「あるリガンドに対する中和活性」という表現は、当該リガンドが D c R 3 改変体と結合することにより、当該リガンドの細胞膜表面上の受容体への結合を阻害すること、及び、当該リガンドの細胞膜表面上の受容体への結合を阻害することにより、当該リガンドが細胞膜表面上の受容体に結合することによって惹起される細胞機能、すなわち、当該リガンドの生物活性（例えば、細胞に対するサイトカイン産生、増殖亢進、アポトーシス誘導等の生物活性）を阻害することが含まれる。

【 0 0 5 7 】

本発明において、D c R 3 改変体が「中和活性を有する」という表現は、当該リガンドに対する D c R 3 改変体の中和活性が、当該リガンドに対する野生型 D c R 3 の中和活性と比較して、有意な差がないこと、及び、当該リガンドに対する野生型 D c R 3 の中和活性と比較して、有意に増強していることを含む意味で用いられる。

20

【 0 0 5 8 】

本発明において、D c R 3 改変体が「中和活性を有さない」という表現は、当該リガンドに対する D c R 3 改変体の中和活性が、当該リガンドに対する野生型 D c R 3 の中和活性と比較して、有意に低下していることを含む意味で用いられる。

【 0 0 5 9 】

特に好ましい一形態において、本発明における D c R 3 改変体は、F a s L に対する結合性が低下した D c R 3 改変体である。「F a s L 結合性低下改変体」は、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つ以上に対して中和活性を有する D c R 3 改変体、又は、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して中和活性を有する D c R 3 改変体を意味する。

30

【 0 0 6 0 】

2 - 1 - 2 . 第 2 のキメラ型システインリッチ領域

第 2 のキメラ型システインリッチ領域は、第 1 のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列において、1 ~ 3 0 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたものである。

【 0 0 6 1 】

第 1 のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得る方法としては、部位特異的変異導入法 [ M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s ( 1 9 8 9 ) , C u r r e n t P r o t o c o l s i n m o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s ( 1 9 8 7 - 1 9 9 7 ) , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 1 0 , 6 4 8 7 ( 1 9 8 2 ) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A . , 7 9 , 6 4 0 9 , ( 1 9 8 2 ) , G e n e , 3 4 , 3 1 5 ( 1 9 8 5 ) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A . , 8 2 , 4 8 8 ( 1 9 8 5 ) ] が挙げられる。

40

【 0 0 6 2 】

第 1 のキメラ型システインリッチ領域に対して加えられる変異（修飾）には、天然の突然変異及び人工的なアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加のいずれも含まれ、第 2 のキメ

50

ラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列としては、第1のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列において、1個若しくは2個以上、好ましくは1～30個、より好ましくは1～10個、より一層好ましくは1～5個、より一層好ましくは1～3個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列、あるいは、第1のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、例えば93%以上、95%以上、97%以上98%以上又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。アミノ酸置換体の記載方法としては、例えば、アミノ酸置換するアミノ酸配列のN末端から131番目のAsnをSerに置換した場合、N131Sと表記することができる。

**【0063】**

好ましい一形態において、第2のキメラ型システインリッチ領域は、以下の(e)のアミノ酸配列を含むか、又は、該アミノ酸配列からなる。

(e) 上記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列において、1～30個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列。

**【0064】**

第1のキメラ型システインリッチ領域に対して加えられる変異(修飾)としては、例えば、糖鎖付加部位の追加又は削除が挙げられる。第1のキメラ型システインリッチ領域に対する糖鎖付加部位の追加又は削除により、本発明のDcR3改変体の生物活性又はその特性、血中半減期等の体内動態、あるいは、タンパク質の安定性等の物理又は化学的な特性を制御できる。

**【0065】**

糖鎖付加とは、一般にペプチド又はタンパク質のアスパラギン残基に糖鎖がN-グリコシド結合すること、及び/並びに、セリン又はスレオニン残基に糖鎖がO-グリコシド結合することである。DcR3改変体に付加されるO型糖鎖としては、コア1、コア2等、又はN型糖鎖としてはハイマンノース型、ハイブリッド型、又は複合型糖鎖が挙げられるが、好ましくは複合型糖鎖である。

**【0066】**

第1のキメラ型システインリッチ領域に対して加えられる変異(修飾)としては、例えば、第1のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列のうち少なくとも1ヶ所以上のアミノ酸を、N-グリコシド結合又はO-グリコシド結合にて糖鎖が付加し得るアミノ酸に置換し、糖鎖を追加することが挙げられ、特にN-グリコシド結合型糖鎖を追加することが好ましい。

**【0067】**

また、例えばキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列のうち、少なくとも1ヶ所以上、好ましくは2ヶ所以上の、N-グリコシド結合に関与するアミノ酸を他のアミノ酸に置換し、糖鎖を除去することも本発明に含まれる。一般に、ペプチド又はタンパク質を酵母、昆虫細胞又は哺乳動物細胞を用いて発現する場合に、Asn-X-Thr/Ser(ここで、XはPro以外の任意のアミノ酸残基である。)の配列を認識して糖鎖のN-グリコシド結合が生じる。例えば、DcR3改変体に存在するAsn-X-Thr/Ser配列のAsn、Ser又はThrを他のアミノ酸に置換することで、N-グリコシド結合型糖鎖を除去することができる。

**【0068】**

第2のキメラ型システインリッチ領域としては、本発明のDcR3改変体の凝集体を低減する為に、特に第1のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列(例えば、配列番号30のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)のN末端から157番目のAsnにN-グリコシド結合する糖鎖を保持しているキメラ型システインリッチ領域が好ましい。

**【0069】**

好ましい一形態において、糖鎖付加部位が除去された第2のキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列(上記(e)のアミノ酸配列の一形態)は、

10

20

30

40

50

( f ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 131 番目及び 144 番目の A s n の他のアミノ酸への置換、

( g ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 131 番目、144 番目及び 157 番目の A s n の他のアミノ酸への置換、

( h ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 133 番目の T h r 及び 146 番目の S e r の他のアミノ酸への置換、並びに、

( i ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 133 番目の T h r、146 番目の S e r 及び 159 番目の T h r の他のアミノ酸への置換

から選択される置換を有する。

#### 【 0070 】

さらに好ましい一形態において、糖鎖付加部位が除去されたアミノ酸配列 ( 上記 ( e ) のアミノ酸配列の一形態 ) は、

( f ' ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 131 番目及び 144 番目の A s n の S e r への置換、

( g ' ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 131 番目、144 番目及び 157 番目の A s n の S e r への置換、

( h ' ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 133 番目の T h r 及び 146 番目の S e r の A l a への置換、並びに、

( i ' ) 上記 ( b )、( c ) 又は ( d ) のアミノ酸配列 ( 例えば、配列番号 28、30、32、52、54 又は 56 で示されたアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) の N 末端から 133 番目の T h r、146 番目の S e r 及び 159 番目の T h r の A l a への置換

から選択される置換を有する。

#### 【 0071 】

上記 ( f ' ) の置換を有するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号 30 又は配列番号 54 に記載のアミノ酸配列のうち、N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 131 番目及び 144 番目の A s n が S e r に置換 ( N131S / N144S ) されたアミノ酸配列 ( 配列番号 34 又は配列番号 58 に記載のアミノ酸配列のうち、N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) 等が挙げられる。

#### 【 0072 】

なお、配列番号 34 は、N131S / N144S - H B D ( キメラ A - H B D において、N 末端から 131 番目及び 144 番目の A s n を S e r に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列、配列番号 58 は、N131S / N144S ( キメラ A において、N 末端から 131 番目及び 144 番目の A s n を S e r に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列を表す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 3 】

上記 ( h ' ) の置換を有するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号 3 0 又は配列番号 5 4 に記載のアミノ酸配列のうち、N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 1 3 3 番目の T h r 及び 1 4 6 番目の S e r が A l a に置換 ( T 1 3 3 A / S 1 4 6 A ) されたアミノ酸配列 ( 配列番号 3 6 又は配列番号 6 0 に記載のアミノ酸配列のうち、N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) 等が挙げられる。

## 【 0 0 7 4 】

なお、配列番号 3 6 は、T 1 3 3 A / S 1 4 6 A - H B D ( キメラ A - H B D において、N 末端から 1 3 3 番目の T h r 及び 1 4 6 番目の S e r を A l a に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列、配列番号 6 0 は、T 1 3 3 A / S 1 4 6 A ( キメラ A において、N 末端から 1 3 3 番目の T h r 及び 1 4 6 番目の S e r を A l a に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列を表す。

10

## 【 0 0 7 5 】

上記 ( g ' ) の置換を有するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号 3 0 又は配列番号 5 4 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 1 3 1 番目、1 4 4 番目及び 1 5 7 番目の A s n が S e r に置換 ( N 1 3 1 S / N 1 4 4 S / N 1 5 7 S ) されたアミノ酸配列 ( 配列番号 3 8 又は配列番号 6 2 に記載のアミノ酸配列のうち、N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) 等が挙げられる。

20

## 【 0 0 7 6 】

なお、配列番号 3 8 は、N 1 3 1 S / N 1 4 4 S / N 1 5 7 S - H B D ( キメラ A - H B D において、N 末端から 1 3 1 番目、1 4 4 番目及び 1 5 7 番目の A s n を S e r に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列、配列番号 6 2 は、N 1 3 1 S / N 1 4 4 S / N 1 5 7 S ( キメラ A において、N 末端から 1 3 1 番目、1 4 4 番目及び 1 5 7 番目の A s n を S e r に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列を表す。

## 【 0 0 7 7 】

上記 ( i ' ) の置換を有するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号 3 0 又は配列番号 5 4 に記載のアミノ酸配列のうち、N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 1 3 3 番目の T h r 、1 4 6 番目の S e r 及び 1 5 9 番目の T h r が A l a に置換 ( T 1 3 3 A / S 1 4 6 A / T 1 5 9 A ) されたアミノ酸配列 ( 配列番号 4 0 又は配列番号 6 4 に記載のアミノ酸配列のうち、N 末端から 1 ~ 1 6 4 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列 ) 等が挙げられる。

30

## 【 0 0 7 8 】

なお、配列番号 4 0 は、T 1 3 3 A / S 1 4 6 A / T 1 5 9 A - H B D ( キメラ A - H B D において、N 末端から 1 3 3 番目の T h r 、1 4 6 番目の S e r 及び 1 5 9 番目の T h r を A l a に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列、配列番号 6 4 は、T 1 3 3 A / S 1 4 6 A / T 1 5 9 A ( キメラ A において、N 末端から 1 3 3 番目の T h r 、1 4 6 番目の S e r 及び 1 5 9 番目の T h r を A l a に置換した D c R 3 改変体 ) のアミノ酸配列を表す。

40

## 【 0 0 7 9 】

第 1 のキメラ型システインリッチ領域に対して加えられる変異 ( 修飾 ) においては、例えば、L I G H T 、 T L 1 A 及び F a s L との結合に関与する第 1 のキメラ型システインリッチ領域の C R D 2 及び C R D 3 には変異を入れず、第 1 のキメラ型システインリッチ領域の C R D 1 及び / 又は C R D 4 に変異を導入することで、L I G H T 、 T L 1 A 及び F a s L とキメラ型システインリッチ領域との結合活性が低下しないキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体を取得することができる。一方、L I G H T 、 T L 1 A 又は F a s L との結合に関与する第 1 のキメラ型システインリッチ領域の C R D 2 又は / 及び C R D 3 に変異を導入することで、L I G H T 、 T L 1 A 又は F a s L とキメラ型システインリッチ領域との結合活性が変化したキメラ型システインリッチ領域を含む D c R

50

3 改変体を取得することができる。すなわち、上述の変異を導入することによって、望ましい L I G H T、T L 1 A 又は F a s L との結合特性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体を取得することができる。

【0080】

好ましい一形態において、第2のキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体としては、L I G H T、T L 1 A 及び F a s L のうちの少なくとも一つ以上に対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、L I G H T、T L 1 A 及び F a s L の全てに対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、F a s L に対して結合活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つに対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、又は、F a s L に対して結合活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体等が挙げられる。本発明の D c R 3 改変体が「リガンドに対して結合活性を有する」及び「リガンドに対して結合活性を有さない」という表現の意義は上記の通りである。

10

【0081】

特に好ましい一形態において、第2のキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体としては、F a s L に対する結合性が低下した D c R 3 改変体が挙げられる。「F a s L 結合性低下改変体」は、F a s L に対して結合活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つ以上に対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、又は、F a s L に対して結合活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して結合活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体を意味する。

20

【0082】

好ましい一形態において、第2のキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体としては、L I G H T、T L 1 A 及び F a s L のうちの少なくとも一つ以上に対して中和活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、L I G H T、T L 1 A 及び F a s L の全てに対して中和活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つに対して中和活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、又は、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して中和活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体等が挙げられる。本発明の D c R 3 改変体が「リガンドに対して中和活性を有する」及び「リガンドに対して中和活性を有さない」という表現の意義は上記の通りである。

30

【0083】

特に好ましい一形態において、第2のキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体としては、F a s L に対する中和活性が低下した D c R 3 改変体が挙げられる。「F a s L 結合性低下改変体」は、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A のいずれか一つ以上に対して中和活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体、又は、F a s L に対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T 及び T L 1 A に対して中和活性を有するキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体を意味する。

40

【0084】

例えば、F a s L 結合性低下改変体であるキメラ型システインリッチ領域を含む D c R 3 改変体は、結晶構造解析等から推測される D c R 3 又は D c R 3 改変体の各リガンドとの結合部位が A l a 又は他のアミノ酸に置換されている修飾体を作製し、L I G H T、T L 1 A 又は F a s L リガンドに対する結合活性及び中和活性を測定することにより取得することができる。また、D c R 3 又は D c R 3 改変体のリガンド結合部位周辺を他のアミノ酸にランダムに変換した遺伝子ライブラリを作製し、ファージや酵母、哺乳動物細胞等にディスプレイさせ、L I G H T、T L 1 A 又は F a s L リガンドに対する結合活性及び中和活性を指標にスクリーニングすることにより取得することもできる。

50

## 【0085】

F a s L 結合性低下改変体に含まれるキメラ型システインリッチ領域のアミノ酸配列（上記（e）のアミノ酸配列の一形態）としては、例えば、上記（a）、（b）、（c）又は（d）のアミノ酸配列のN末端から57番目のG l u、58番目のA r g及び60番目のA r gからなる群から選択される1個又は2個以上のアミノ酸の、他のアミノ酸への置換を有するアミノ酸配列が挙げられる。

## 【0086】

57番目のG l uと置換される他のアミノ酸は、特に限定されず、20種類のアミノ酸（G l u、A l a、A s p、L y s、L e u、C y s、P h e、G l y、H i s、I l e、M e t、A s n、P r o、G l n、A r g、S e r、T h r、V a l、T r p、T y r）のうちG l uを除く19種類のアミノ酸から適宜選択することができるが、L y s、L e u、A r g、V a l、A l a、P h e、H i s、I l e及びM e tから選択することが好ましく、L y s、L e u、A r g及びV a lから選択することがさらに好ましく、L y s、A r g及びV a lから選択することがさらに好ましく、L y s及びA r gから選択することがさらに好ましい。

10

## 【0087】

58番目のA r gと置換される他のアミノ酸は、特に限定されず、20種類のアミノ酸のうちA r gを除く19種類のアミノ酸から適宜選択することができるが、A s p、G l u及びT h rから選択することが好ましく、A s p及びG l uから選択することがさらに好ましい。

20

## 【0088】

60番目のA r gと置換される他のアミノ酸は、特に限定されず、20種類のアミノ酸のうちA r gを除く19種類のアミノ酸から適宜選択することができるが、L y sであることが好ましい。

## 【0089】

好ましい一形態において、57番目のG l u、58番目のA r g及び60番目のA r gからなる群から選択される1個又は2個以上のアミノ酸は、57番目のG l uからなる1個のアミノ酸である。

## 【0090】

好ましいさらに別の形態において、57番目のG l u、58番目のA r g及び60番目のA r gからなる群から選択される1個又は2個以上のアミノ酸は、57番目のG l u及び58番目のA r gからなる2個のアミノ酸である。この形態において、57番目のG l uのL y s、L e u、A r g、V a l、A l a、P h e、H i s、I l e又はM e tでの置換と、58番目のA r gのA s p、G l u又はT h rでの置換とを組み合わせることが好ましく、57番目のG l uのL y s、L e u、A r g又はV a lでの置換と、58番目のA r gのA s p又はG l uでの置換とを組み合わせることがさらに好ましく、57番目のG l uのL y s又はA r gでの置換と、58番目のA r gのA s p又はG l uでの置換とを組み合わせることがさらに好ましい。

30

## 【0091】

第2のキメラ型システインリッチ領域は、57番目のG l u、58番目のA r g及び60番目のA r g以外の1個又は2個以上のアミノ酸の、他のアミノ酸への置換を有していてもよい。57番目のG l u、58番目のA r g及び60番目のA r g以外のアミノ酸としては、例えば、上記（a）、（b）、（c）又は（d）のアミノ酸配列のN末端から53番目のT r p、54番目のA s n、55番目のT y r、56番目のL e u等が挙げられる。

40

## 【0092】

53番目のT r pと置換される他のアミノ酸は、特に限定されず、20種類のアミノ酸のうちT r pを除く19種類のアミノ酸から適宜選択することができるが、A s p及びA s nから選択することが好ましい。53番目のT r pの他のアミノ酸での置換は、例えば、57番目のG l uの他のアミノ酸での置換と組み合わせることができる。

50

## 【 0 0 9 3 】

54番目のA s nと置換される他のアミノ酸は、特に限定されず、20種類のアミノ酸のうちA s nを除く19種類のアミノ酸から適宜選択することができるが、A s pであることが好ましい。54番目のA s nの他のアミノ酸での置換は、例えば、57番目のG l uの他のアミノ酸での置換と組み合わせることができる。

## 【 0 0 9 4 】

55番目のT y rと置換される他のアミノ酸は、特に限定されず、20種類のアミノ酸のうちT y rを除く19種類のアミノ酸から適宜選択することができるが、T h r、A s p、G l n及びG l uから選択することが好ましい。55番目のT y rの他のアミノ酸での置換は、例えば、57番目のG l uの他のアミノ酸での置換と組み合わせることができる。

10

## 【 0 0 9 5 】

56番目のL e uと置換される他のアミノ酸は、特に限定されず、20種類のアミノ酸のうちL e uを除く19種類のアミノ酸から適宜選択することができるが、A s p、G l n、T h r、G l u、G l y、A s n及びP r oから選択することが好ましい。56番目のL e uの他のアミノ酸での置換は、例えば、57番目のG l uの他のアミノ酸での置換と組み合わせることができる。

## 【 0 0 9 6 】

上記(a)、(b)、(c)又は(d)のアミノ酸配列のN末端から57番目のG l u、58番目のA r g及び60番目のA r gからなる群から選択される1個又は2個以上のアミノ酸の、他のアミノ酸への置換を有するアミノ酸配列としては、具体的には、

20

配列番号30に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から57番目のG l uがL y sに置換されたアミノ酸配列(配列番号42に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号54に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から57番目のG l uがL y sに置換されたアミノ酸配列(配列番号66に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号30に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から57番目のG l uがL e uに置換されたアミノ酸配列(配列番号44に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

30

配列番号54に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から57番目のG l uがL e uに置換されたアミノ酸配列(配列番号68に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号30に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から60番目のA r gがL y sに置換されたアミノ酸配列(配列番号46に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

40

配列番号54に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から60番目のA r gがL y sに置換されたアミノ酸配列(配列番号70に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号30に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から57番目のG l uがA r gに置換されたアミノ酸配列、

配列番号54に記載のアミノ酸配列のうちN末端から1～164番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N末端から57番目のG l uがA r gに置換されたアミノ酸配

50



ら 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号 30 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が L y s に、58 番目の A r g が G l u に置換されたアミノ酸配列、

配列番号 54 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が L y s に、58 番目の A r g が G l u に置換されたアミノ酸配列 (配列番号 186 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号 30 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が A r g に、58 番目の A r g が A s p に置換されたアミノ酸配列、

10

配列番号 54 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が A r g に、58 番目の A r g が A s p に置換されたアミノ酸配列 (配列番号 188 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号 30 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が L y s に、58 番目の A r g が T h r に置換されたアミノ酸配列、

配列番号 54 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が L y s に、58 番目の A r g が T h r に置換されたアミノ酸配列 (配列番号 280 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

20

配列番号 30 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が L e u に、58 番目の A r g が G l u に置換されたアミノ酸配列、

配列番号 54 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が L e u に、58 番目の A r g が G l u に置換されたアミノ酸配列 (配列番号 282 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号 30 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が V a l に、58 番目の A r g が T h r に置換されたアミノ酸配列、

30

配列番号 54 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が V a l に、58 番目の A r g が T h r に置換されたアミノ酸配列 (配列番号 284 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)、

配列番号 30 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が V a l に、58 番目の A r g が T G l u に置換されたアミノ酸配列、

配列番号 54 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、N 末端から 57 番目の G l u が V a l に、58 番目の A r g が G l u に置換されたアミノ酸配列 (配列番号 286 に記載のアミノ酸配列のうち N 末端から 1 ~ 164 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列)

40

等が挙げられる。

【0097】

なお、配列番号 42 は、キメラ A - E 57 K - H B D (キメラ A - H B D において、N 末端から 57 番目の G l u を L y s に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 44 は、キメラ A - E 57 L - H B D (キメラ A - H B D において、N 末端から 57 番目の G l u を L e u に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 46 は、キメラ A - R 60 K - H B D (キメラ A - H B D において、N 末端から 60 番目の A r g を L

50

y s に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 66 は、キメラ A - E 5 7 K (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を L y s に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 68 は、キメラ A - E 5 7 L (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を L e u に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 70 は、キメラ A - R 6 0 K (キメラ A において、N 末端から 60 番目の A r g を L y s に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 180 は、キメラ A - E 5 7 R (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を A r g に置換した D c R 3 改変体) アミノ酸配列、配列番号 182 は、キメラ A - E 5 7 V (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を V a l に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 184 は、キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 D (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を L y s に、58 番目の A r g を A s p に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 186 は、キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を L y s に、58 番目の A r g を G l u に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 188 は、キメラ A - E 5 7 R \_ R 5 8 D (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を A r g に、58 番目の A r g を A s p に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 270 は、キメラ A - E 5 7 A (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を A l a に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 272 は、キメラ A - E 5 7 F (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を P h e に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 274 は、キメラ A - E 5 7 H (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を H i s に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 276 は、キメラ A - E 5 7 I (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を I l e に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 278 は、キメラ A - E 5 7 M (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を M e t に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 280 は、キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 T (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を L y s に、58 番目の A r g を T h r に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 282 は、キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 T (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を L y s に、58 番目の A r g を T h r に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 284 は、キメラ A - E 5 7 V \_ R 5 8 T (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を V a l に、58 番目の A r g を T h r に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列、配列番号 286 は、キメラ A - E 5 7 V \_ R 5 8 E (キメラ A において、N 末端から 57 番目の G l u を V a l に、58 番目の A r g を G l u に置換した D c R 3 改変体) のアミノ酸配列を表す。

【0098】

## 2 - 2 . その他の領域

本発明の D c R 3 改変体は、第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端側に結合した 1 種又は 2 種以上のその他の領域を含んでもよいし、含まなくてもよい。その他の領域としては、例えば、野生型 D c R 3 において C R D 4 と H B D との間に存在する領域の一部又は全部、D c R 3 以外の T N F 受容体スーパーファミリー ( T N F R S F ) 分子において C R D 4 のアミノ酸配列の C 末端に続く領域の一部又は全部、野生型 D c R 3 の H B D の一部又は全部等が挙げられる。「第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端側に結合したその他の領域」という表現は、その他の領域が、第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端に直接結合している場合、及び、その他の領域が、第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端に、さらに別の領域を介して結合している場合を包含する意味で用いられる。

【0099】

一形態において、本発明の D c R 3 改変体は、第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端側に結合したその他の領域として、野生型 D c R 3 において C R D 4 と H B D との間に存在する領域の一部又は全部を含む。この形態において、その他の領域は、第 1 又は第 2 のキメラ型システインリッチ領域の C 末端に直接結合していることが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0100】

別の形態において、本発明のDcR3改変体は、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域のC末端側に結合したその他の領域として、DcR3以外のTNFRSF受容体スーパーファミリー(TNFRSF)分子においてCRD4のアミノ酸配列のC末端に続く領域の一部又は全部を含む。この形態において、その他の領域は、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域のC末端に直接結合していることが好ましい。TNFRSFに関する説明は、上記と同様である。TNFRSFは、好ましくはOPGである。

## 【0101】

第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域(例えば、上記(b)~(d)のアミノ酸配列からなる第1のキメラ型システインリッチ領域)において、野生型DcR3のCRD4がOPGのCRD4で置換されている場合、本発明のDcR3改変体は、キメラ型システインリッチ領域のC末端に結合したその他の領域として、OPGのCRD4のアミノ酸配列のC末端に続く複数のアミノ酸残基を含むことが好ましい。すなわち、野生型DcR3のCR4がOPGのCRD4で置換される際、野生型DcR3のCRD4のアミノ酸配列のC末端に続く複数のアミノ酸残基も、OPGのCRD4のアミノ酸配列のC末端に続く複数のアミノ酸残基で置換されることが好ましい。OPGのCRD4のアミノ酸配列のC末端に続く複数のアミノ酸残基としては、例えば、OPGのアミノ酸配列(配列番号14)のうち186番目~194番目のアミノ酸残基が好ましいが、野生型DcR3のCRD4のC末端に続く複数のアミノ酸残基と置換されるアミノ酸残基の数は適宜調節することができる。OPGのCRD4のアミノ酸配列のC末端に続く複数のアミノ酸残基の数は、通常1~12個、好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~9個、1~6個、又は1~3個である。また、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域(例えば、上記(a)及び(d)のアミノ酸配列からなる第1のキメラ型システインリッチ領域)において、CRD4が野生型DcR3由来である場合、第1のキメラ型システインリッチ領域におけるCRD4のアミノ酸配列のC末端には、野生型DcR3のCRD4のアミノ酸配列のC末端に続くアミノ酸配列が結合していることが好ましい。このようなアミノ酸配列としては、例えば、配列番号2の194番目~195番目のアミノ酸が挙げられるが、野生型DcR3のCRD4のアミノ酸配列のC末端に続くアミノ酸配列を構成するアミノ酸残基の数は適宜調節することができる。野生型DcR3のCRD4のC末端に続くアミノ酸配列を構成するアミノ酸残基の数は、通常1~10個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、さらに一層好ましくは1~2個である。

## 【0102】

さらに別の形態において、本発明のDcR3改変体は、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域のC末端側に結合したその他の領域として、野生型DcR3のHBDの一部又は全部を含む。この形態において、その他の領域は、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域のC末端に直接結合していてもよいし、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域のC末端に、野生型DcR3においてCRD4とHBDとの間に存在する領域の一部又は全部を介して、あるいは、DcR3以外のTNFRSF分子においてCRD4のアミノ酸配列のC末端に続く領域の一部又は全部を介して、結合していてもよい。

## 【0103】

本発明のDcR3改変体は、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域のC末端側に結合したその他の領域として、HBDを含まず、OPGのアミノ酸配列(配列番号14)のうち186番目~194番目のアミノ酸残基を含むことが好ましい。

## 【0104】

## 3. 糖鎖を含むDcR3改変体

本発明のDcR3改変体としては、少なくとも1つの糖鎖を含むDcR3改変体も含まれる。上述したDcR3改変体に含まれるシステインリッチ領域や、それ以外のアミノ酸残基に少なくとも1つの糖鎖が結合していれば、いずれの糖鎖を含むDcR3改変体も本発明に含まれる。

## 【0105】

糖タンパク質は、1又は2以上の糖鎖を有する。糖タンパク質が2以上の糖鎖を有する場合、糖タンパク質が糖鎖は1種であってもよいし、2種以上であってもよい。糖タンパク質が有する糖鎖としては、例えば、ペプチド又はタンパク質のアミノ酸残基（例えば、アスパラギン残基等）にN-グリコシド結合する糖鎖、ペプチド又はタンパク質のアミノ酸残基（例えば、セリン残基、スレオニン残基等）にO-グリコシド結合する糖鎖等が挙げられる。O型糖鎖としては、例えば、コア1、コア2等が挙げられ、N型糖鎖としては、例えば、ハイマンノース型、ハイブリッド型、複合型糖鎖が挙げられるが、好ましくは、複合型糖鎖である。

#### 【0106】

##### 4. Fc領域を含むDcR3改変体

本発明のDcR3改変体としては、キメラ型システインリッチ領域（又はその他の領域を含むキメラ型がシステインリッチ領域）のN末端側又はC末端側に、同種又は異種のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質が、直接、又は必要であれば適当なペプチドリンカーを介して結合又は融合しているタンパク質も含まれる。ペプチドリンカーを構成するアミノ酸の数は、特に限定されないが、例えば4個、5個、6個、又は15個等が挙げられる。

#### 【0107】

キメラ型システインリッチ領域に結合又は融合させるポリペプチド又はタンパク質としては、例えば、免疫グロブリンの定常領域又はFc領域、FcRn（neonatal Fc receptor）に結合するペプチド、アルブミン、プロテインA、プロテインG、  
-ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、ポリヒスチジン、FLAGペプチド等のポリペプチド又はタンパク質が挙げられるが、好ましくは、免疫グロブリンのFc領域又はその変異体（変異型Fc領域）、さらに好ましくは、哺乳動物由来の免疫グロブリンのFc領域又はその変異体（変異型Fc領域）である。

#### 【0108】

免疫グロブリン（抗体とも記載する）のFc領域としては、ヒトへの使用の場合においてはヒト免疫グロブリンのFc領域が好ましい。免疫グロブリンのクラス及びサブクラスとしては、以下のものに限定されないが、IgG、IgD、IgE、IgM、IgA、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、又はIgA1等が挙げられ、ヒトに使用するのであれば、ヒト免疫グロブリンのクラス及びサブクラスを使用することが好ましい。また、キメラ型システインリッチ領域に結合又は融合させるポリペプチド又はタンパク質として免疫グロブリンのFc領域を用いる場合には、好ましくは、キメラ型システインリッチ領域のC末端側に免疫グロブリンのFc領域を結合又は融合させる。

#### 【0109】

免疫グロブリンは、重鎖及び軽鎖のポリペプチドより構成され、ヒトIgGの重鎖の定常領域は、N末端から順に、CH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインにより構成されている。本発明におけるIgGのFc領域には、CH2ドメインとCH3ドメインとを合わせた領域、及び、ヒンジドメインの一部又は全部とCH2ドメインとCH3ドメインとを合わせた領域も含まれる。本発明におけるIgGのFc領域に含まれる各ドメインは、EUインデックスの番号で特定することができる。具体的には、ヒンジドメインはEUインデックス216番目～230番目、CH2ドメインは231番目～340番目、CH3はEUインデックス341番目～447番目によりそれぞれ特定される。

#### 【0110】

また、キメラ型システインリッチ領域に結合又は融合するポリペプチド又はタンパク質には、DcR3改変体の生物活性又はその特性、血中半減期等の体内動態、あるいは、タンパク質の安定性等の物理又は化学的な特性の変更の為に、さらに1以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は追加された、修飾されたポリペプチド又はタンパク質も含まれる。キ

10

20

30

40

50

メラ型システインリッチ領域に結合又は融合させるポリペプチド又はタンパク質の修飾には、天然の突然変異及び人工的なアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加のいずれも含まれる。修飾されたポリペプチド又はタンパク質としては、例えば、免疫グロブリンのFc領域のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなる変異型Fc領域が挙げられる。変異型Fc領域のアミノ酸配列としては、例えば、免疫グロブリンのFc領域のアミノ酸配列において、1個若しくは複数個、好ましくは2～30個、より好ましくは2～10個、特に好ましくは2～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列、あるいは、免疫グロブリンのFc領域のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

10

## 【0111】

上述の糖鎖付加部位の追加又は削除も、メラ型システインリッチ領域に結合又は融合させるポリペプチド又はタンパク質の修飾に含まれる。例えば、N型糖鎖付加部位を含むポリペプチドを付加又は挿入することにより、糖鎖付加部位を追加することができる。具体的なポリペプチドの配列として、5アミノ酸からなる、GGNGT又はYGGNTが挙げられる[国際公開特許第2014/153111号]。

## 【0112】

補体依存性細胞傷害(CDC)活性を低下又は消失させるヒトIgG1の置換としては、EUインデックスで示される234番目のLeu(L234)、235番目のLeu(L235)、265番目のAsp(D265)、270番目のAsp(D265)、322番目のLys(K322)、329番目のPro(P329)、331番目のPro(P331)等から選択される1又は2以上のアミノ酸の、他のアミノ酸での置換等が挙げられ、具体的には、EUインデックスで示されるL234、L235、D270、K322、P329、P331等から選択される1又は2以上のアミノ酸のAlaでの置換や、P331のSer又はGlyでの置換等が挙げられる[J. Immunol., 2000, 164: p. 4178-4184, Cell. Immunol., 2000, 200: p. 16-26]。

20

## 【0113】

抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性、抗体依存性細胞貪食作用(ADCP)等のエフェクター活性を低下又は消失させるヒトIgG1の置換としては、EUインデックスで示される297番目のAsn(N297)、234番目のLeu(L234)、235番目のLeu(L235)、237番目のGly(G237)、226番目のCys(C226)、229番目のCys(C229)、238番目のPro(P238)、233番目のGlu(E233)、267番目のSer(S267)、328番目のLeu(L328)、331番目のPro(P331)等から選択される1又は2以上のアミノ酸の、他のアミノ酸への置換が挙げられ、具体的には、EUインデックスで示されるN297のAlaでの置換(N297A)、N297のGlnでの置換(N297Q)、N297のGlyでの置換(N297G)、又は、L234のAlaでの置換(L234A)/L235のAlaでの置換(L235A)/G237のAlaでの置換(G237A)等のアミノ酸置換が挙げられる。なお、「/」は「及び」を意味する(以下同様である)。

30

40

## 【0114】

その他に、抑制性受容体であるFcRIIbへの結合活性を上昇させる修飾としては、EUインデックスで示される236番目のGlyのAspでの置換(G236D)、328番目のLeuのPheでの置換(L328F)、239番目のSerのAspでの置換(S239D)、267番目のSerのGluでの置換(S267E)等が挙げられる[Curr. Opin. Cell. Biol., 2009, 20: p. 685-691]。また、エンドソーム内でのpHの低い環境においてFcRn(neonatal Fc receptor)との結合を増強させ、抗体の消失を回避し血中半減期を延長する修飾としては、EUインデックスで示される250番目のThrのGlnでの置換(T250Q)、428番目のMetのLeuでの置換(M428L)、252番目のMetのT

50

y rでの置換 (M 2 5 2 Y)、2 5 4番目のS e rのT h rでの置換 (S 2 5 4 T)、2 5 6番目のT h rのG l uでの置換 (T 2 5 6 E)、2 5 2番目のM e tのT y rでの置換 (M 2 5 2 Y) / 2 5 4番目のS e rのT h rでの置換 (S 2 5 4 T) / 2 5 6番目のT h rのG l uでの置換 (T 2 5 6 E)、4 2 8番目のM e tのL e uでの置換 (M 4 2 8 L) / 4 3 4番目のA s nのS e rでの置換 (N 4 3 4 S)、4 3 4番目のA s nのA l aでの置換 (N 4 3 4 A)、4 3 4番目のA s nのH i sでの置換 (N 4 3 4 H) 等が挙げられる [ J . I m m u n o l . , 2 0 0 9 , 1 8 2 : p . 7 6 6 3 - 7 6 7 1 , M A b s , 2 0 1 7 , 9 : p . 8 4 4 - 8 5 3 ]。

【 0 1 1 5 】

好ましい一形態において、変異型F c領域は、ヒトI g G 1サブクラスに属する抗体の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される220番目のC y sのS e rへの置換を有する。この形態に係る変異型F c領域としては、例えば、ヒトI g G 1の重鎖の定常領域 (配列番号153) からCH1ドメイン及びヒンジドメインに含まれるEUインデックスで示される216番目のG l uを除いたF c領域 (EUインデックス217番目~447番目) のうち、軽鎖との結合に關与するEUインデックスで示される220番目のC y sがS e rに置換 (C 2 2 0 S) されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのF c領域 (以下、g 1 Sと記載、配列番号72)、ヒトI g G 1の重鎖の定常領域 (配列番号153) からCH1ドメインを除いたF c領域 (EUインデックス216番目~447番目) のうち、220番目のC y sがS e rに置換 (C 2 2 0 S) されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのF c領域 (以下、E g 1 Sと記載、配列番号156) 等が挙げられる。本発明のD c R 3改変体がこの形態に係る変異型F c領域を含む場合、本発明のD c R 3改変体に含まれる第1のキメラ型システインリッチ領域としては、野生型D c R 3のC R D 1がO P GのC R D 1で置換され、且つ、野生型D c R 3のC R D 4がO P GのC R D 4で置換されている第1のキメラ型システインリッチ領域が好ましい。また、本発明のD c R 3改変体がこの形態に係る変異型F c領域を含む場合、本発明のD c R 3改変体に含まれる第2のキメラ型システインリッチ領域は、57番目のG l uの他のアミノ酸での置換、又は、57番目のG l uの他のアミノ酸での置換及び58番目のA r gの他のアミノ酸での置換を有することが好ましい。57番目のG l uと置換される他のアミノ酸は、L y s、L e u、A r g、V a l、A l a、P h e、H i s、I l e及びM e tから選択することが好ましく、L y s、L e u、A r g及びV a lから選択することがさらに好ましい。58番目のA r gと置換される他のアミノ酸は、A s p、G l u及びT h rから選択することが好ましく、A s p及びG l uから選択することがさらに好ましい。57番目のG l uの他のアミノ酸での置換と、58番目のA r gの他のアミノ酸での置換とを組み合わせる場合、57番目のG l uのL y s、L e u、A r g、V a l、A l a、P h e、H i s、I l e又はM e tでの置換と、58番目のA r gのA s p、G l u又はT h rでの置換とを組み合わせることが好ましく、57番目のG l uのL y s、L e u、A r g又はV a lでの置換と、58番目のA r gのA s p又はG l uでの置換とを組み合わせることがさらに好ましく、57番目のG l uのL y s又はA r gでの置換と、58番目のA r gのA s p又はG l uでの置換とを組み合わせることがさらに一層好ましい。

【 0 1 1 6 】

好ましい別の形態において、変異型F c領域は、ヒトI g G 4サブクラスに属する抗体の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される228番目のS e rのP r oへの置換、EUインデックスで示される235番目のL e uのG l uへの置換、及び、EUインデックスで示される409番目のA r gのL y sへの置換を有する。この形態に係る変異型F c領域としては、例えば、ヒトI g G 4の重鎖の定常領域 (配列番号154) からCH1ドメインを除き、国際公開特許2006/33386に記載のEUインデックスで示される228番目のS e rがP r oに、235番目のL e uがG l uに、409番目のA r gがL y sに置換されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのF c (以下、g 4 P E Kと記載、配列番号74) が挙げられる。本発明のD c R 3改変体がこの形態

10

20

30

40

50

に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第1のキメラ型システインリッチ領域としては、野生型DcR3のCRD1がOPGのCRD1で置換され、且つ、野生型DcR3のCRD4がOPGのCRD4で置換されている第1のキメラ型システインリッチ領域が好ましい。また、本発明のDcR3改変体がこの形態に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第2のキメラ型システインリッチ領域は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換、又は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換及び58番目のArgの他のアミノ酸での置換を有することが好ましい。57番目のGluと置換される他のアミノ酸は、Lys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile及びMetから選択することが好ましく、Lys、Leu、Arg及びValから選択することがさらに好ましい。58番目のArgと置換される他のアミノ酸は、Asp、Glu及びThrから選択することが好ましく、Asp及びGluから選択することがさらに好ましい。57番目のGluの他のアミノ酸での置換と、58番目のArgの他のアミノ酸での置換とを組み合わせる場合、57番目のGluのLys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile又はMetでの置換と、58番目のArgのAsp、Glu又はThrでの置換とを組み合わせることが好ましく、57番目のGluのLys、Leu、Arg又はValでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに好ましく、57番目のGluのLys又はArgでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに一層好ましい。

10

## 【0117】

20

好ましいさらに別の形態において、変異型Fc領域は、ヒトIgG1サブクラスに属する抗体の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される234番目のLeuのAlaへの置換、EUインデックスで示される235番目のLeuのAlaへの置換、及び、EUインデックスで示される237番目のGlyのAlaへの置換を有する。この形態に係る変異型Fc領域としては、例えば、配列番号72で示されるg1S、又は配列番号156で示されるEg1SのFc領域のうち、234番目のLeuがAlaに、235番目のLeuがAlaに、237番目のGlyがAlaに置換されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのFc領域（以下、g1S LALAGA、又はEg1S LALAGAと記載、配列番号162、164）等が挙げられる。本発明のDcR3改変体がこの形態に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第1のキメラ型システインリッチ領域としては、野生型DcR3のCRD1がOPGのCRD1で置換され、且つ、野生型DcR3のCRD4がOPGのCRD4で置換されている第1のキメラ型システインリッチ領域が好ましい。また、本発明のDcR3改変体がこの形態に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第2のキメラ型システインリッチ領域は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換、又は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換及び58番目のArgの他のアミノ酸での置換を有することが好ましい。57番目のGluと置換される他のアミノ酸は、Lys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile及びMetから選択することが好ましく、Lys、Leu、Arg及びValから選択することがさらに好ましい。58番目のArgと置換される他のアミノ酸は、Asp、Glu及びThrから選択することが好ましく、Asp及びGluから選択することがさらに好ましい。57番目のGluの他のアミノ酸での置換と、58番目のArgの他のアミノ酸での置換とを組み合わせる場合、57番目のGluのLys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile又はMetでの置換と、58番目のArgのAsp、Glu又はThrでの置換とを組み合わせることが好ましく、57番目のGluのLys、Leu、Arg又はValでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに好ましく、57番目のGluのLys又はArgでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに一層好ましい。

30

40

## 【0118】

好ましいさらに別の形態において、変異型Fc領域は、ヒトIgG1サブクラスに属す

50

る抗体の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される434番目のAsnのAlaへの置換を有する。この形態に係る変異型Fc領域としては、例えば、配列番号72で示されるg1S、又は配列番号156で示されるEg1SのFc領域のうち、434番目のAsnがAlaに置換されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのFc領域（以下、g1S N434A、又はEg1S N434Aと記載、配列番号312、160）、配列番号162で示されるg1S LALAGA、又は配列番号164で示されるEg1S LALAGANAのFc領域のうち、434番目のAsnがAlaに置換されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのFc領域（以下、g1S LALAGANA、又はEg1S LALAGANAと記載、配列番号313、166）等が挙げられる。本発明のDcR3改変体がこの形態に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第1のキメラ型システインリッチ領域としては、野生型DcR3のCRD1がOPGのCRD1で置換され、且つ、野生型DcR3のCRD4がOPGのCRD4で置換されている第1のキメラ型システインリッチ領域が好ましい。また、本発明のDcR3改変体がこの形態に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第2のキメラ型システインリッチ領域は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換、又は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換及び58番目のArgの他のアミノ酸での置換を有することが好ましい。57番目のGluと置換される他のアミノ酸は、Lys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile及びMetから選択することが好ましく、Lys、Leu、Arg及びValから選択することがさらに好ましい。58番目のArgと置換される他のアミノ酸は、Asp、Glu及びThrから選択することが好ましく、Asp及びGluから選択することがさらに好ましい。57番目のGluの他のアミノ酸での置換と、58番目のArgの他のアミノ酸での置換とを組み合わせる場合、57番目のGluのLys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile又はMetでの置換と、58番目のArgのAsp、Glu又はThrでの置換とを組み合わせることが好ましく、57番目のGluのLys、Leu、Arg又はValでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに好ましく、57番目のGluのLys又はArgでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに一層好ましい。

#### 【0119】

好ましいさらに別の形態において、変異型Fc領域は、ヒトIgG1サブクラスに属する抗体の重鎖のアミノ酸配列のうち、EUインデックスで示される252番目のMetのTyrへの置換、EUインデックスで示される254番目のSerのThrへの置換、及び、EUインデックスで示される256番目のThrのGluへの置換を有する。この形態に係る変異型Fc領域としては、例えば、配列番号72で示されるg1S、又は配列番号156で示されるEg1SのFc領域のうち、252番目のMetがTyrに、254番目のSerがThrに、256番目のThrがGluに置換されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのFc領域（以下、g1S YTE、又はEg1S YTEと記載、配列番号311、158）等が挙げられる。本発明のDcR3改変体がこの形態に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第1のキメラ型システインリッチ領域としては、野生型DcR3のCRD1がOPGのCRD1で置換され、且つ、野生型DcR3のCRD4がOPGのCRD4で置換されている第1のキメラ型システインリッチ領域が好ましい。また、本発明のDcR3改変体がこの形態に係る変異型Fc領域を含む場合、本発明のDcR3改変体に含まれる第2のキメラ型システインリッチ領域は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換、又は、57番目のGluの他のアミノ酸での置換及び58番目のArgの他のアミノ酸での置換を有することが好ましい。57番目のGluと置換される他のアミノ酸は、Lys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile及びMetから選択することが好ましく、Lys、Leu、Arg及びValから選択することがさらに好ましい。58番目のArgと置換される他のアミノ酸は、Asp、Glu及びThrから選択することが好ましく、Asp及びGluから選択することがさらに好ましい。57番目のGluの他のアミノ酸での置換と、58番目

10

20

30

40

50

のArgの他のアミノ酸での置換とを組み合わせる場合、57番目のGluのLys、Leu、Arg、Val、Ala、Phe、His、Ile又はMetでの置換と、58番目のArgのAsp、Glu又はThrでの置換とを組み合わせることが好ましく、57番目のGluのLys、Leu、Arg又はValでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに好ましく、57番目のGluのLys又はArgでの置換と、58番目のArgのAsp又はGluでの置換とを組み合わせることがさらに一層好ましい。

【0120】

変異型Fc領域としては、これらに限定されるものではないが、例えば、配列番号72、74、156、158、160、162、164、166、311、312又は313に記載のアミノ酸配列を含むか、あるいは、該アミノ酸配列からなる変異型Fc領域が挙げられる。

10

【0121】

キメラ型システインリッチ領域のN末端又はC末端側に、さらに同種又は異種のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を連結するために付加するペプチドリンカーとしては、限定されるものではないが、例えば、IEGRMDリンカー又はGSリンカー等のペプチドリンカー、化学リンカー等が挙げられる。

【0122】

本発明のDcR3改変体として、最も好ましくは、第1又は第2のキメラ型システインリッチ領域とFc領域又は変異型Fc領域とを含むDcR3改変体が挙げられる。

20

【0123】

一態様において、本発明のDcR3改変体に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号26、28、30、32、34、36、38、40、42、44又は46に記載のアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列において1~30個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。この態様において、本発明のDcR3改変体は、上記アミノ酸配列からなってもよいし、上記アミノ酸配列を含んでもよいが、上記アミノ酸配列からなることが好ましい。なお、上記アミノ酸配列は、HBDを含む。

【0124】

別の態様において、本発明のDcR3改変体に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、180、182、184、186、188、270、272、274、276、278、280、282、284又は286に記載のアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列において、1~30個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。この態様において、本発明のDcR3改変体は、上記アミノ酸配列からなってもよいし、上記アミノ酸配列を含んでもよいが、上記アミノ酸配列からなることが好ましい。なお、上記アミノ酸配列は、HBDを含まない。

30

【0125】

別の様態において、本発明のDcR3改変体に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、180、182、184、186、188、270、272、274、276、278、280、282、284又は286に記載のアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列において、1~30個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列と、変異型Fc領域として、配列番号72、74、156、158、160、162、164、166、311、312又は313に記載のアミノ酸配列とを含むアミノ酸配列が挙げられる。

40

【0126】

さらに別の態様において、本発明のDcR3改変体に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、150、168、170、172、174、176、178、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、

50

234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、  
 254、256、258、260、262、264、266、268、288、290、  
 292、294、296、298、300、302、304、314、315、316、  
 317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、  
 327、328、329、330、331、332、333、334、335、336又  
 は337に記載のアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列において、1~30個のアミ  
 ノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。この態様において、  
 本発明のDcR3改変体は、上記アミノ酸配列からなってもよいし、上記アミノ酸配列を  
 含んでもよいが、上記アミノ酸配列からなることが好ましい。なお、上記アミノ酸配列は  
 、Fc領域又はその変異体(変異型Fc領域)を含む。

10

## 【0127】

なお、配列番号76は、キメラB-Fc(IEGRMD g1S)(キメラBと、IE  
 GRMDリンカーと、Fc(g1S)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、  
 配列番号78は、キメラC-Fc(IEGRMD g1S)(キメラCと、IEGRMD  
 リンカーと、Fc(g1S)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号  
 80は、キメラA-Fc(IEGRMD g1S)(キメラAと、IEGRMDリンカー  
 と、Fc(g1S)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号82は、  
 キメラA-Fc(g4PEK)(キメラAと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR  
 3改変体)のアミノ酸配列、配列番号84は、103-123OPG-Fc(g4PEK  
 )(103-123OPGと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変体)のア  
 ミノ酸配列、配列番号86は、N131S/N144S-Fc(g4PEK)(N131  
 S/N144Sと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列  
 、配列番号88は、T133A/S146A-Fc(g4PEK)(T133A/S14  
 6Aと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号  
 90は、N131S/N144S/N157S-Fc(g4PEK)(N131S/N1  
 44S/N157Sと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸  
 配列、配列番号92は、T133A/S146A/T159A-Fc(g4PEK)(T  
 133A/S146A/T159Aと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変  
 体)のアミノ酸配列、配列番号94は、キメラA-E57K-Fc(g4PEK)(キメ  
 ラA-E57Kと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列  
 、配列番号96は、キメラA-E57L-Fc(g4PEK)(キメラA-E57Lと、  
 Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号98は、  
 キメラA-R60K-Fc(g4PEK)(キメラA-R60Kと、Fc(g4PEK)  
 とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号150は、キメラA-Fc(  
 g1S)(キメラAと、Fc(g1S)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列  
 、配列番号168は、キメラA-Fc(Eg1S)(キメラAと、Fc(Eg1S)とを  
 融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号170は、キメラA-Fc(Eg  
 1S-YTE)(キメラAと、Fc(Eg1S-YTE)とを融合させたDcR3改変体  
 )のアミノ酸配列、配列番号172は、キメラA-Fc(Eg1S-N434A)(キメ  
 ラAと、Fc(Eg1S-N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列  
 、配列番号174は、キメラA-Fc(g1S-LALAGA)(キメラAと、Fc(g  
 1S-LALAGA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号176  
 は、キメラA-Fc(Eg1S-LALAGA)(キメラAと、Fc(Eg1S-LAL  
 AGA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号178は、キメラA  
 -Fc(Eg1S-LALAGANA)(キメラAと、Fc(Eg1S-LALAGAN  
 A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号190は、キメラA-E  
 57R-Fc(g4PEK)(キメラA-E57Rと、Fc(g4PEK)とを融合させ  
 たDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号192は、キメラA-E57V-Fc(g  
 4PEK)(キメラA-E57Vと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改変体  
 )のアミノ酸配列、配列番号194は、キメラA-E57K\_R58D-Fc(g4PE

20

30

40

50

K) (キメラA - E57K\_\_R58Dと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR3改  
 変体)のアミノ酸配列、配列番号196は、キメラA - E57K\_\_R58E - Fc(g4  
 PEK) (キメラA - E57K\_\_R58Eと、Fc(g4PEK)とを融合させたDcR  
 3変体)のアミノ酸配列、配列番号198は、キメラA - E57R\_\_R58D - Fc(  
 g4PEK) (キメラA - E57R\_\_R58Dと、Fc(g4PEK)とを融合させたD  
 cR3変体)のアミノ酸配列、配列番号200は、キメラA - E57K - Fc(Eg1  
 S) (キメラA - E57Kと、Fc(Eg1S)とを融合させたDcR3変体)のアミ  
 ノ酸配列、配列番号202は、キメラA - E57L - Fc(Eg1S) (キメラA - E5  
 7Lと、Fc(Eg1S)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号2  
 04は、キメラA - E57R - Fc(Eg1S) (キメラA - E57Rと、Fc(Eg1S) 10  
 )とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号206は、キメラA - E  
 57V - Fc(Eg1S) (キメラA - E57Vと、Fc(Eg1S)とを融合させたD  
 cR3変体)のアミノ酸配列、配列番号208は、キメラA - E57K\_\_R58D - F  
 c(Eg1S) (キメラA - E57K\_\_R58Dと、Fc(Eg1S)とを融合させたD  
 cR3変体)のアミノ酸配列、配列番号210は、キメラA - E57K\_\_R58E - F  
 c(Eg1S) (キメラA - E57K\_\_R58Eと、Fc(Eg1S)とを融合させたD  
 cR3変体)のアミノ酸配列、配列番号212は、キメラA - E57R\_\_R58D - F  
 c(Eg1S) (キメラA - E57R\_\_R58Dと、Fc(Eg1S)とを融合させたD  
 cR3変体)のアミノ酸配列、配列番号214は、キメラA - E57K - Fc(Eg1  
 S YTE) (キメラA - E57Kと、Fc(Eg1S YTE)とを融合させたDcR3 20  
 変体)のアミノ酸配列、配列番号216は、キメラA - E57L - Fc(Eg1S Y  
 TE) (キメラA - E57Lと、Fc(Eg1S YTE)とを融合させたDcR3変  
 体)のアミノ酸配列、配列番号218は、キメラA - E57R - Fc(Eg1S YTE  
 ) (キメラA - E57Rと、Fc(Eg1S YTE)とを融合させたDcR3変  
 体)のアミノ酸配列、配列番号220は、キメラA - E57V - Fc(Eg1S YTE) (キ  
 メラA - E57Vと、Fc(Eg1S YTE)とを融合させたDcR3変体)のア  
 ミノ酸配列、配列番号222は、キメラA - E57K\_\_R58D - Fc(Eg1S YT  
 E) (キメラA - E57K\_\_R58Dと、Fc(Eg1S YTE)とを融合させたDc  
 R3変体)のアミノ酸配列、配列番号224は、キメラA - E57K\_\_R58E - Fc  
 (Eg1S YTE) (キメラA - E57K\_\_R58Eと、Fc(Eg1S YTE)とを 30  
 融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号226は、キメラA - E57R\_\_  
 R58D - Fc(Eg1S YTE) (キメラA - E57R\_\_R58Dと、Fc(Eg1S  
 YTE)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号228は、キメラA  
 - E57K - Fc(Eg1S N434A) (キメラA - E57Kと、Fc(Eg1S N  
 434A)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号230は、キメラ  
 A - E57L - Fc(Eg1S N434A) (キメラA - E57Lと、Fc(Eg1S  
 N434A)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号232は、キメ  
 ラA - E57R - Fc(Eg1S N434A) (キメラA - E57Rと、Fc(Eg1S  
 N434A)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号234は、キメ  
 ラA - E57V - Fc(Eg1S N434A) (キメラA - E57Vと、Fc(Eg1S 40  
 N434A)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号236は、キメ  
 ラA - E57K\_\_R58D - Fc(Eg1S N434A) (キメラA - E57K\_\_R5  
 8Dと、Fc(Eg1S N434A)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列  
 、配列番号238は、キメラA - E57K\_\_R58E - Fc(Eg1S N434A) (キ  
 メラA - E57K\_\_R58Eと、Fc(Eg1S N434A)とを融合させたDcR  
 3変体)のアミノ酸配列、配列番号240は、キメラA - E57R\_\_R58D - Fc(  
 Eg1S N434A) (キメラA - E57R\_\_R58Dと、Fc(Eg1S N434A  
 )とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号242は、キメラA - E5  
 7K - Fc(Eg1S LALAGA) (キメラA - E57Kと、Fc(Eg1S LAL  
 AGA)とを融合させたDcR3変体)のアミノ酸配列、配列番号244は、キメラA 50



、配列番号316は、キメラA - Fc (g1S LALAGANA) (キメラAと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号317は、キメラA - E57K - Fc (g1S YTE) (キメラA - E57Kと、Fc (g1S YTE)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号318は、キメラA - E57L - Fc (g1S YTE) (キメラA - E57Lと、Fc (g1S YTE)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号319は、キメラA - E57R - Fc (g1S YTE) (キメラA - E57Rと、Fc (g1S YTE)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号320は、キメラA - E57V - Fc (g1S YTE) (キメラA - E57Vと、Fc (g1S YTE)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号321は、キメラA - E57K\_\_R58D - Fc (g1S YTE) (キメラA - E57K\_\_R58Dと、Fc (g1S YTE)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号322は、キメラA - E57K\_\_R58E - Fc (g1S YTE) (キメラA - E57K\_\_R58Eと、Fc (g1S YTE)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号323は、キメラA - E57R\_\_R58D - Fc (g1S YTE) (キメラA - E57R\_\_R58Dと、Fc (g1S YTE)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号324は、キメラA - E57K - Fc (g1S N434A) (キメラA - E57Kと、Fc (g1S N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号325は、キメラA - E57L - Fc (g1S N434A) (キメラA - E57Lと、Fc (g1S N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号326は、キメラA - E57R - Fc (g1S N434A) (キメラA - E57Rと、Fc (g1S N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号327は、キメラA - E57V - Fc (g1S N434A) (キメラA - E57Vと、Fc (g1S N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号328は、キメラA - E57K\_\_R58D - Fc (g1S N434A) (キメラA - E57K\_\_R58Dと、Fc (g1S N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号329は、キメラA - E57K\_\_R58E - Fc (g1S N434A) (キメラA - E57K\_\_R58Eと、Fc (g1S N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号330は、キメラA - E57R\_\_R58D - Fc (g1S N434A) (キメラA - E57R\_\_R58Dと、Fc (g1S N434A)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号331は、キメラA - E57K - Fc (g1S LALAGANA) (キメラA - E57Kと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号332は、キメラA - E57L - Fc (g1S LALAGANA) (キメラA - E57Lと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号333は、キメラA - E57R - Fc (g1S LALAGANA) (キメラA - E57Rと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号334は、キメラA - E57V - Fc (g1S LALAGANA) (キメラA - E57Vと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号335は、キメラA - E57K\_\_R58D - Fc (g1S LALAGANA) (キメラA - E57K\_\_R58Dと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号336は、キメラA - E57K\_\_R58E - Fc (g1S LALAGANA) (キメラA - E57K\_\_R58Eと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列、配列番号337は、キメラA - E57R\_\_R58D - Fc (g1S LALAGANA) (キメラA - E57R\_\_R58Dと、Fc (g1S LALAGANA)とを融合させたDcR3改変体)のアミノ酸配列を表す。

【0128】

上記態様のいずれにおいても、上記アミノ酸配列に対して加えられる変異(修飾)には、天然の突然変異及び人工的なアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加のいずれも含まれる

10

20

30

40

50

。また、上記態様のいずれにおいても、上記アミノ酸配列において、1～30個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加された配列としては、1個若しくは2個以上、好ましくは2～30個、より好ましくは2～10個、特に好ましくは2～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、例えば93%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

#### 【0129】

本発明のDcR3改変体は、生物活性又はその特性、血中半減期等の体内動態、あるいは、タンパク質の安定性等の物理又は化学的な特性の変更を目的に、さらに化学修飾されていてもよい。

#### 【0130】

化学修飾としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)化、アセチル化、アミド化又はリン酸化等が挙げられ、特に好ましくはPEG化である。PEG化は、例えば、タンパク質のN末端のアミノ基、あるいは、Lysのアミノ基、カルボキシル基、チオール基又はヒドロキシル基等の官能基を側鎖に有するアミノ酸残基に1又は複数のPEG分子を結合させることである。

#### 【0131】

PEG分子の平均分子量は、以下に限定されないが、約3000～約50000の範囲で使用可能である。

#### 【0132】

PEG分子をDcR3改変体に結合させる方法としては、PEG末端部分に、例えば、カルボキシル基、ホルミル(アルデヒド)基、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基、アミノ基、チオール基又はマレイミド基等の活性基を導入し、DcR3改変体の側鎖に有するアミノ基、カルボキシル基、チオール基又はヒドロキシル基等の官能基と反応させる方法が挙げられる。

#### 【0133】

シグナルペプチドは、限定されるものではないが、DcR3改変体に含まれるN末端側のCRDドメインがヒトDcR3由来である場合は、配列番号2の1～29番目のアミノ酸配列からなるヒトDcR3のシグナルペプチドが挙げられる。また、DcR3改変体に含まれるN末端側のCRDドメインがヒトOPG由来である場合は、配列番号14の1～21番目のアミノ酸配列からなるヒトOPG由来のシグナルペプチドが挙げられる。また、人工配列、発現ベクター由来の配列、DcR3改変体を発現させる宿主細胞に適した他のタンパク質由来の配列のいずれも本発明のシグナルペプチドに含まれる。シグナルペプチドを含むDcR3改変体は未成熟型のポリペプチドであり、一実施形態では成熟の過程でシグナルペプチドは切断される。本発明のDcR3改変体には、上記シグナルペプチドの切断が予測部位と異なる位置で切断された、異なるN末端を有するものも含まれる。

#### 【0134】

##### 5. DcR3改変体の製造方法

本発明のDcR3改変体は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、該DcR3改変体をコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

#### 【0135】

シグナルペプチドは、限定されるものではないが、DcR3改変体に含まれるN末端側のCRDドメインがヒトDcR3由来である場合は、配列番号2の1～29番目のアミノ酸配列からなるヒトDcR3のシグナルペプチドが挙げられる。また、DcR3改変体に含まれるN末端側のCRDドメインがヒトOPG由来である場合は、配列番号14の1～21番目のアミノ酸配列からなるヒトOPG由来のシグナルペプチドが挙げられる。また、人工配列、発現ベクター由来の配列、DcR3改変体を発現させる宿主細胞に適した他

10

20

30

40

50

のタンパク質由来の配列のいずれも本発明の D c R 3 改変体の製造に用いることができる。本発明の D c R 3 改変体には、上記シグナルペプチドの切断が予測部位と異なる位置で切断された、異なる N 末端を有するものも含まれる。

**【 0 1 3 6 】**

本発明の D c R 3 改変体は、アミノ酸置換前の野生型 D c R 3 のシステインリッチ領域のアミノ酸配列、D c R 3 改変体のシステインリッチ領域のアミノ酸配列、又は D c R 3 改変体のアミノ酸配列に基づき人工的に設計することで取得することも、突然変異体を分析することで取得することもできる。突然変異導入法としては、プライマーを使用する P C R 法を利用した部位特異的突然変異誘発法が好ましい ( K u n k e l ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 9 8 5 , 8 2 : 4 8 8 - 4 9 2 ) 。その他に、変異導入した遺伝子を全合成する方法や、変異を含むプライマーを使用して、変異部位より前の部分と後ろの部分に分けて P C R を行い、該 2 断片を、変異を含む領域のオーバーラップにより連結させ、I n - f u s i o n クローニング法 ( C l o n t e c h 社 ) 等によりベクターに挿入する方法が挙げられる。

10

**【 0 1 3 7 】**

目的の結合様式を有する変異の同定方法としては、ランダムに変異を導入したライブラリを作製し、ファージや酵母等にディスプレイさせ、結合活性によりスクリーニングすることで目的の結合様式を持つ変異体を取得する方法が挙げられる。あるいは、特定のアミノ酸を異なるアミノ酸に置換するための D N A 変異を導入したベクターを宿主細胞中で発現させて製造し、目的の結合様式をもつ変異体を取得する方法が挙げられる。本発明の D c R 3 改変体をコードする D N A は、本発明の D c R 3 改変体のアミノ酸配列から、これをコードする塩基配列を設計し、D N A 合成機により合成することができる。またヒト等の c D N A を鋳型とした P C R により、単離することもできる。

20

**【 0 1 3 8 】**

上記で得られた本発明の D c R 3 改変体をコードする D N A を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製し、該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入する。

**【 0 1 3 9 】**

D c R 3 改変体をコードする D N A の塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とする D c R 3 改変体の生産率を向上させることができる。上記の該 D c R 3 改変体をコードする D N A を作製する際に、その 5 ' 末端に分泌タンパク質のシグナルペプチドをコードする D N A を付加して作製し、該 D N A を用いて、上記と同様にして組換えベクターを作製し、宿主細胞に導入することにより、該ペプチドを培地中に分泌させて製造することができる。シグナルペプチドとしては、例えば、D c R 3 あるいは O P G 由来の配列、人工配列、発現ベクター由来の配列、又は宿主細胞に適したその他のタンパク質由来の配列等が挙げられる。

30

**【 0 1 4 0 】**

一態様において、D c R 3 改変体のアミノ酸配列をコードする D N A の塩基配列としては、例えば、配列番号 2 5、2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3 及び 4 5 に記載の塩基配列が挙げられる。

40

**【 0 1 4 1 】**

別の態様において、D c R 3 改変体のアミノ酸配列をコードする D N A の塩基配列としては、例えば、配列番号 4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、1 7 9、1 8 1、1 8 3、1 8 5、1 8 7、2 6 9、2 7 1、2 7 3、2 7 5、2 7 7、2 7 9、2 8 1、2 8 3 及び 2 8 5 に記載の塩基配列が挙げられる。

**【 0 1 4 2 】**

さらに別の態様において、D c R 3 改変体のアミノ酸配列をコードする D N A の塩基配列としては、例えば、配列番号 7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、8 7、8 9、9 1、9 3、9 5、9 7、1 4 9、1 6 7、1 6 9、1 7 1、1 7 3、1 7 5、1 7 7、1 8 9、1 9 1、1 9 3、1 9 5、1 9 7、1 9 9、2 0 1、2 0 3、2 0 5、2 0 7、2 0

50

9、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、287、289、291、293、295、297、299、301及び303に記載の塩基配列が挙げられる。

【0143】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製又は染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。

【0144】

宿主細胞としては、例えば酵母、昆虫細胞、動物細胞等、DcR3改変体をコードする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。好ましくは、タンパク質をグリコシル化することができる酵母、動物細胞、又は昆虫細胞が挙げられる。

【0145】

酵母としては、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、シュワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、カンディダ (*Candida*) 属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*、又は *Candida utilis* 等が挙げられる。

【0146】

昆虫細胞としては、例えば、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製)、又は *Drosophila melanogaster* の末期胚由来の S2 (Schneider 2) 細胞 (Thermo Scientific 社) 等が挙げられる。

【0147】

動物細胞としては、例えば、ヒトの細胞である ナマルバ (*Namalwa*) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞 [Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (pp. 883 - 900)], CHO/DG44, CHO-K1 (ATCC 番号: CCL-61), Freestyle CHO-S 細胞, ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子が欠損した CHO 細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)], 6-フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO 細胞 (国際公開第 2005/035586 号、国際公開第 02/31140 号)、ヒトの細胞である 293 細胞 (ATCC 番号: CRL-1573)、Freestyle 293F 細胞、Expi293 細胞 (Thermo Scientific 社)、DUKXB11 (ATCC 番号: CCL-9096)、Pro-5 (ATCC 番号: CCL-1781)、CHO-S (Life

10

20

30

40

50

Technologies、Cat # 11619)、Pro-3、ラットミエローマ細胞 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (又はYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞NSO、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14、又はシリアンハムスター細胞BHK、HBT5637 (特開昭63-299号公報)等が挙げられる。

【0148】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC番号: 37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCP50 (ATCC37419)、pHS19、又はpHS15等を挙げる事ができる。

【0149】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal11プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF1プロモーター、又はCUP1プロモーター等を挙げる事ができる。

10

【0150】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、又はProc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)に記載の方法等を挙げる事ができる。

20

【0151】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vector, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992), Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ペプチドを発現することができる。

【0152】

即ち、組換え遺伝子導入ベクター及び欠損型バキュロウイルスゲノムを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ペプチドを発現させることができる。

30

【0153】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393 (ベクトン・ディッキンソン社製)、又はpBlueBac4.5 (インビトロジェン社製)等を挙げる事ができる。

【0154】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヤガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

40

【0155】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクター及び上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075号公報) 又はリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等を挙げる事ができる。

【0156】

昆虫細胞Drosophila melanogasterの末期胚由来のS2 (Schneider 2)細胞 (Thermo Scientific社)を宿主として用いる場合には、例えば、Mol. Biotechnol., 2015, 10: p. 914-922等に記載された方法によって、pMTBiPV5-HisA (Thermo Sci

50

entific社)等の遺伝子導入ベクターを、リン酸カルシウム法により宿主細胞に導入することによって、ペプチドを発現することができる。

【0157】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCI哺乳類発現ベクター(Promega社)、pcDNA3.1(+)(インビトロジェン社製)、pcDNA I/Amp、pcDNA I、pcDM8(フナコシ社製)、pAGE107〔特開平3-22979号公報、Cytotechnology, 3, 133(1990)〕、pAS3-3(特開平2-227075号公報)、pCDM8〔Nature, 329, 840(1987)〕、pREP4(インビトロジェン社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307(1987)〕、pAGE210、pME18 SFL3、又はpKANTEX93(国際公開第97/10354号)等を挙げることができる。

10

【0158】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、又はSRプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0159】

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133(1990)〕、リン酸カルシウム法(特開平2-227075号公報)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)〕、又はVirology, 52, 456(1973)記載の方法等を挙げることができる。

20

【0160】

上述した方法で得られる本発明のDcR3改変体の発現ベクター、又はそれらを改変した発現ベクターを用いて該DcR3改変体の一過性発現を行うことができる。

【0161】

発現ベクターを導入する宿主細胞には、DcR3改変体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばCOS-7細胞(ATCC番号: CRL1651)を用いる〔Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283(1991)〕。COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法〔Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, (1991)〕、又はリポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)〕等を用いる。

30

【0162】

CHO-S細胞又はExp1293細胞(Thermo Scientific社)を用いる場合には、発現ベクターの導入には、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)〕等を用いる。

40

【0163】

上述した方法で得られる本発明のDcR3改変体の発現ベクター、又はそれらを改変した発現ベクターを用いて該DcR3改変体を安定に発現する形質転換株を取得することができる。

発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、G418硫酸塩等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する(日本国特開平2-257891号公報)。

【0164】

形質転換体が酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体である場合、該形質転

50

換体を培養する培地として、該形質転換体が資化し得る炭素源、窒素源、及び/又は無機塩類等を含むし、該形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、又は合成培地のいずれを用いてもよい。

【0165】

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプン又はデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、又はプロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0166】

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、及び/又はリン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物等を用いることができる。

10

【0167】

無機塩としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、及び/又は炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0168】

培養は、振盪培養又は深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行うことが好ましい。培養温度は15～40が好ましく、培養時間は、通常16時間～7日間が好ましい。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、又はアンモニア等を用いて行うことができる。

20

【0169】

また、培養中必要に応じて、アンピシリン又はテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0170】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(ベクトン・ディキンソン社製)、Sf-900 I I SFM培地(インビトロジェン社製)、ExCell 400、ExCell 405(いずれもJRH バイオサイエンシズ社製)、グレース(Grace)の昆虫培地[Nature, 195, 788(1962)]、又はSchneider's Medium(Thermo Fisher社)等を用いることができる。

30

【0171】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体の培養は、通常、pHは6～7、温度は25～30が好ましく、1～5日間行うのが好ましい。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0172】

動物細胞培養用培地には、RPMI 1640培地(インビトロジェン社製)、GIT培地(日本製薬社製)、EX-CELL 301培地(ジェイアールエイチ社製)、EX-CELL 325 PF CHO serum-Free培地(Sigma Aldrich社)、IMDM培地(インビトロジェン社製)、Hybridoma-SFM培地(インビトロジェン社製)、Eagleのミニマル・エッセンシャル培地(MEM)[Science, 122, 501(1952)]、ダルベッコ改変イーグル培地[Virology, 8, 396(1959)]、199培地[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)]又はこれら培地にFBS等の各種添加物を添加した培地等を用いる。

40

【0173】

動物細胞の培養は、通常、5%CO<sub>2</sub>存在下で行うのが好ましく、pHは6～8、温度は30～40が好ましく、1～7日間行うのが好ましい。また、培養中必要に応じて、

50

カナマイシン又はペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0174】

得られた形質転換株を培地中で培養することで、培養上清中にD c R 3 改変体又はD c R 3 改変体を発現蓄積させる。また、形質転換株は、D H F R 増幅系（日本国特開平2 - 2 5 7 8 9 1 号公報）等を利用してD c R 3 改変体又はD c R 3 改変体の発現量を上昇させることができる。

【0175】

以上のようにして培養物中に本発明に係るD c R 3 改変体を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明に係るD c R 3 改変体を製造することができる。

【0176】

形質転換体により製造されたペプチドを単離精製するためには、通常のタンパク質の単離精製法を用いることができる。

【0177】

例えば、本発明のD c R 3 改変体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から該D c R 3 改変体を回収することができる。すなわち、該培養物を遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（D E A E）-セファロース、又はD I A I O N H P A - 7 5（三菱ケミカル社）等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S - S e p h a r o s e F F（G Eヘルスケア社）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、又は等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製品を得ることができる。

【0178】

例えば、本発明のD c R 3 改変体が、プロテインG又はプロテインAに結合可能な免疫グロブリンのF cを有する場合には、プロテインG又はプロテインAをアフィニティリガンドとして担体に結合した、プロテインGクロマトグラフィー法又はプロテインAクロマトグラフィー法をアフィニティークロマトグラフィー法として用いることができる。[M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s - P r i n c i p l e s a n d p r a c t i c e , T h i r d e d i t i o n , A c a d e m i c P r e s s ( 1 9 9 6 ) , A n t i b o d i e s - A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y ( 1 9 8 8 ) ]。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等のタンパク質の精製で用いられる方法を組み合わせることもできる。

【0179】

また、上述の方法で取得できたD c R 3 改変体から、常法の化学的修飾法を用いることにより、更にペプチド、糖鎖、又はP E G等が化学的に修飾されたD c R 3 改変体を得ることもできる。

【0180】

6 . D c R 3 改変体の生物活性、物性、及び動態評価の方法

本発明のD c R 3 改変体としては、好ましくはL I G H T、T L 1 A及びF a s Lのうちの少なくとも一つ以上に対して中和活性を有するD c R 3 改変体、L I G H T、T L 1 A及びF a s Lの全てに対して中和活性を有するD c R 3 改変体、F a s Lに対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T及びT L 1 Aのいずれか一つに対して中和活性を有するD c R 3 改変体、F a s Lに対して中和活性を有さず、且つ、L I G H T及びT L 1 Aに対して中和活性を有するD c R 3 改変体等が挙げられる。

【0181】

本発明のD c R 3 改変体は以下の方法を用いることで、中和活性等の生物活性、物性及び体内動態を測定することができる。

10

20

30

40

50

## 【0182】

## (1) リガンドの調製

本発明にて用いられるL I G H T、T L 1 A及びF a s Lは、その由来が限定されるものではないが、真核生物由来のL I G H T、T L 1 A及びF a s Lが挙げられる。真核生物由来のL I G H T、T L 1 A及びF a s Lとしては、例えば、酵母、昆虫又は哺乳動物が挙げられる。好ましくは、ヒトを含む霊長類、又はマウスを含むげっ歯類等由来のL I G H T、T L 1 A及びF a s Lが挙げられる。

## 【0183】

L I G H T、T L 1 AあるいはF a s L又は該リガンドを発現した細胞は、L I G H T、T L 1 AあるいはF a s Lの全長又はその部分長をコードするc D N Aを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、又は動物細胞等の適当な宿主細胞に導入することにより、得ることができる。また、L I G H T、T L 1 AあるいはF a s Lを多量に発現している各種ヒト培養細胞又はヒト組織等から該リガンドを精製することによっても、得ることができる。また、該培養細胞又は該組織等を、そのままリガンドとして用いることもできる。さらに、F m o c法又はt B o c法等の化学合成法によりL I G H T、T L 1 A又はF a s Lの部分配列を有する合成ペプチドを調製することもできる。

10

## 【0184】

また、L I G H T、T L 1 A及びF a s Lは、M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s ( 1 9 8 9 ) 等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、L I G H T、T L 1 A又はF a s LをコードするD N Aを宿主細胞に導入、発現させ、製造することができる。

20

## 【0185】

可溶性L I G H T、T L 1 A及びF a s Lは、それぞれ膜型L I G H T、膜型T L 1 A、膜型F a s Lとして細胞膜上に発現した後、プロテアーゼによって細胞外領域がシェディングされることで生成される。切断部位は各リガンドで同定されているが、可溶性リガンドの組換え体を作製する際には、切断部位近傍の任意の配列を含むことができる。例えば、可溶性L I G H T組換え体は、膜型L I G H Tのアミノ酸配列においてN末端から66～240番目の領域、74～240番目の領域、83～240番目の領域等から作製することができる。可溶性T L 1 A組換え体は、膜型T L 1 Aのアミノ酸配列においてN末端から72～251番目の領域等から作製することができる。可溶性F a s Lは、膜型F a s Lのアミノ酸配列においてN末端から130～281番目の領域、134～281番目の領域等から作製することができる。

30

## 【0186】

可溶性リガンドの組換え体は、上記領域のN末端にH i s タグやF L A G タグ等を付加して作製し、アフィニティ精製により取得することができる。L I G H T、T L 1 A及びF a s Lの可溶性組み換え体のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号114、116、118、120、122、124、126、128、130及び306に記載のアミノ酸配列が挙げられる。L I G H T、T L 1 A及びF a s Lの可溶性組み換え体のアミノ酸配列をコードするD N Aの塩基配列としては、例えば、配列番号113、115、117、119、121、123、125、127、129及び305に記載の塩基配列が挙げられる。

40

## 【0187】

機能的なL I G H T、T L 1 A又はF a s Lは、ホモ三量体を形成することができる。上述のいずれかの方法で調製した可溶性L I G H T、T L 1 A又はF a s Lを、S E C - M A L S分析し、分子量を求めることができる。S E C - M A L Sとは、S E C ( S i z e E x c l u s i o n c h r o m a t o g r a p h y ) - H P L Cで分離された波長215nmで検出される各ピークについて、多角度光散乱検出器(M u l t i A n g l e L i g h t S c a t t e r i n g ; M A L S)によって検出される散乱強度の最大値を用いて分子量を算出する分析方法である。H P L Cシステムとしては、例えば、島津製作

50

所の Prominence、SECカラムとしては、例えば、東ソー社の TSK gel、MAL S の検出器としては、例えば、Wyatt Technology 社の miniDAWN TREOS 等が挙げられる。また、ホモ三量体を、三量体以外を形成する粗精製物から単離する方法としては、例えば SEC 精製等が挙げられる。SEC 精製の方法としては、例えば、HPLC システムとしては、GEヘルスケア社製の AKTA purifier、SECカラムとしては、GEヘルスケア社製の Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いて粗精製物を分子量サイズによって分画し、ホモ三量体の分子量分画のみを回収する方法等が挙げられる。

【0188】

(2) ヒトFc領域を含むDcR3 変体の結合活性評価

10

可溶性 LIGHT、可溶性 TL1A 又は可溶性 FasL に対する DcR3 変体の結合活性を測定する方法としては、例えば、酵素免疫測定法 (ELISA) による結合アッセイ及び Biacore による kinetics 解析等が挙げられる。リガンドとしては、LIGHT、TL1A 又は FasL の各リガンドの細胞外ドメインをコードする DNA 配列を含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、又は動物細胞等に導入して得られた遺伝子導入細胞あるいはリコンビナントタンパク質、並びに、ヒト組織又はヒト細胞から得られたリガンドを含む血清、血漿あるいは培養上清等を用いる。

【0189】

ELISA の場合、例えば、抗ヒト IgG 抗体を 96 ウェル等のプレートに固相化し、DcR3 変体を反応させた後、各リガンドを分注して結合させる。洗浄後、未標識の抗リガンド抗体又は各リガンドの受容体 - Fc 融合体等を反応させた後に、ビオチン、酵素又は化学発光物質等で標識した抗 Fc 抗体等を反応させるか、あるいは、標識した抗リガンド抗体又は各リガンドの受容体 - Fc 融合体等を反応させ、標識物質に応じた検出を行い、DcR3 変体のリガンドへの結合を測定することができる。また、Biacore の場合、例えば、Biacore T100 又は Biacore T200 を用い、各リガンドと DcR3 変体の結合における kinetics を測定し、その結果を機器付属の解析ソフトウェアで解析をする。具体的には、抗ヒト IgG 抗体をセンサーチップ CM5 にアミンカップリング法により固定化した後、DcR3 変体を流して該センサーチップ上に適量結合させ、さらに複数の濃度既知のリガンドを流すことにより、結合、解離を測定する。得られたデータを、機器付属のソフトウェアを用いて 1:1 バインディングモデルにより kinetics 解析を行い、各種パラメーターを取得する。又は、各リガンドをセンサーチップ上に、例えばアミンカップリング法により固定した後、複数の濃度既知の DcR3 変体を流すことにより、結合、解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウェアを用い、バイバレントバインディングモデルにより kinetics 解析を行い、各種パラメーターを取得する。あるいは、ProteinA の IgG 結合ドメイン変体タンパク質である Mab Select Sure リガンドをセンサーチップ上に固定化したセンサーチップ ProteinA に、DcR3 変体を流してセンサーチップ上に適量結合させ、さらに複数の濃度既知のリガンドを流すことにより、結合、解離を測定する。得られたデータを、機器付属のソフトウェアを用いて 1:1 バインディングモデルにより kinetics 解析を行い、各種パラメーターを取得する。

20

30

40

【0190】

膜型 LIGHT、膜型 TL1A 又は膜型 FasL に対する DcR3 変体の結合活性は、例えば、LIGHT、TL1A 並びに FasL の各リガンドの全長をコードする DNA 配列を含む発現ベクターを動物細胞等に導入して得られた遺伝子導入細胞、又は、PBM C 又は HUV E C 等のヒト細胞に PHA-L、PMA、又は Ionomy cin 等の mitogen 刺激、あるいは、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体刺激、サイトカイン、IgG 又は免疫複合体刺激等の適切な刺激を加えて膜型リガンドの発現を誘導した細胞を用いて、フローサイトメトリーにより測定することができる。具体的には、膜型リガンドを発現している細胞に DcR3 変体を反応させ、蛍光標識した抗 Fc 抗体等を反応させることにより、あるいは、ビオチン又は蛍光色素等で標識した DcR3 変体を反応させ、洗

50

浄後、フローサイトメーターを用いて標識物質に応じた蛍光強度を検出することにより、測定することができる。

【0191】

上述の方法にて測定される、本発明のDcR3改変体としては、例えば、LIGHT、TL1A及びFasLのうちの少なくとも一つ以上に対して結合活性を有するDcR3改変体、LIGHT、TL1A及びFasLの全てに対して結合活性を有するDcR3改変体、FasLに対して結合活性を有さず、且つ、LIGHT及びTL1Aのいずれか一つに対して結合活性を有するDcR3改変体、又は、FasLに対して結合活性を有さず且つLIGHT及びTL1Aに対して結合活性を有するDcR3改変体が挙げられる。

【0192】

(3) DcR3改変体の中和活性評価

DcR3改変体の中和活性を測定する方法としては、例えば、DcR3改変体を添加した溶液中において、LIGHT、TL1AあるいはFasLと対応する受容体との結合を測定する方法、又は、DcR3改変体を添加した培地中において、LIGHT、TL1AあるいはFasLの受容体発現細胞に、対応するリガンドを添加し、サイトカイン産生や細胞増殖等の細胞機能を測定する方法が挙げられる。

【0193】

ヒトLIGHTと対応する受容体との結合に対する阻害活性は、例えば、米国特許US 8,974,787 B2に記載された方法等を用い、以下の方法により測定することができる。DcR3改変体を添加した反応液中において、ビオチン、蛍光色素等で標識したHVEM又はLTRを、膜型LIGHTを発現する細胞に反応させ、洗浄後、フローサイトメーターを用いて標識物質に応じた蛍光強度を検出することにより、測定する。あるいは、DcR3改変体を添加した反応液中において、ビオチン、蛍光色素等で標識したLIGHTを、HVEM又はLTRを発現する細胞に反応させ、洗浄後、フローサイトメーターを用いて標識物質に応じた蛍光強度を検出することにより、測定する。LIGHTと対応する受容体との結合に対する、DcR3改変体の阻害活性は、DcR3改変体を添加しなかった場合との比較において、当該蛍光強度の減少により確認される。

【0194】

上記と同様の方法を用いて、TL1A又はFasLと対応する受容体との結合に対する阻害活性も、測定することができる。

【0195】

本発明のDcR3改変体としては、LIGHT、TL1A及びFasLと対応する受容体との結合の少なくとも一つ以上の結合に対して阻害活性を有するDcR3改変体、LIGHT、TL1A及びFasLと対応する受容体との結合の全てに対して阻害活性を有するDcR3改変体、FasLと対応する受容体との結合に対して阻害活性を有さず且つLIGHT及びTL1Aと対応する受容体との結合のいずれか一つに対して阻害活性を有するDcR3改変体、又は、FasLと対応する受容体との結合に対して阻害活性を有さず且つLIGHT及びTL1Aと対応する受容体との結合に対して阻害活性を有するDcR3改変体が好ましい。本発明において、「あるリガンドと対応する受容体との結合に対して阻害活性を有さない」という表現は、野生型DcR3よりも阻害活性が有意に低下していることを含む意味で用いられる。

【0196】

LIGHTの添加により惹起される細胞機能に対する阻害活性は、例えば、米国特許US 8,974,787 B2に記載された方法等を用い、以下のように測定することができる。DcR3改変体を添加した培地中において、LIGHT受容体であるHVEMやLTRの発現が確認されたHT-29(ATCC番号:HTB-38)等の細胞を用い、LIGHT依存的なIL-8、CCL5又はCCL20等のケモカイン産生を、培養上清を用いたELISA法、alphaLISA(Perkin Elmer社)、又はCBAアッセイ(BDバイオサイエンス社)等により測定する。あるいは、IFN- $\gamma$ で刺激した腸筋線維芽細胞(Lonza社)等の細胞を用いて、可溶性又は膜型LIGHT依存的

10

20

30

40

50

なCXCL-10等のケモカイン産生も同様の方法を用いて測定する。あるいは、可溶型又は膜型LIGHTの代わりに、抗CD3抗体及び抗CD28抗体、又はPMA及びIonomycin等で刺激したPBMCあるいはT細胞から発現誘導したLIGHTを用いて同様の方法で測定することもできる。可溶型又は膜型LIGHTの添加により惹起される細胞機能に対するDcR3改変体の阻害活性は、DcR3改変体を添加しなかった場合との比較において、当該ケモカインの産生量の減少により確認される。また、*in vivo*においては、例えば、米国特許US8,974,787B2に記載された方法等を用い、ヒトPBMCを免疫不全マウスに他家移植した急性GVHD(Graft versus host disease)モデルにおいて、DcR3改変体投与による生存、体重、病態、病理、ヒト細胞の生着等の改善を評価することができる。

10

## 【0197】

TL1Aの添加により惹起される細胞機能に対する阻害活性は、例えば、*Mucosal Immunology*, 2015, 8: p. 545-558に記載された方法等を用い、以下のように測定することができる。DcR3改変体を添加した培地中において、ヒト等の霊長類あるいはマウス等のげっ歯類由来の血液、PBMC、pan T細胞、CD4陽性T細胞、又はメモリーCD4陽性T細胞等を用い、IL-12、IL-18、及びTL1A、又は、IL-12、IL-18、IL-15、及びTL1Aの各サイトカインカクテルで該細胞を刺激し、TL1A依存的なIFN- $\gamma$ 、IL-6、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-5、IL-13、IL-17又はIL-22等のサイトカイン産生を、培養上清を用いたELISA法、alphaLISA、又はCBAアッセイ等により測定する。あるいは、例えば、*Immunity*, 2002, 16: p. 479-492に記載された方法等を用い、DcR3改変体を添加した培地中において、ヒト等の霊長類あるいはマウス等のげっ歯類由来のpan T細胞、CD4陽性T細胞、又はメモリーCD4陽性T細胞等を、抗CD3抗体及び抗CD28抗体により刺激し、TL1A依存的なIFN- $\gamma$ 及びIL-2産生を上述と同様の方法により、測定する。あるいは、可溶型TL1Aの代わりに膜型TL1Aの強制発現株を用いて同様の方法で測定することもできる。あるいは、IgGや免疫複合体等で刺激したPBMCあるいは単球から発現誘導したTL1Aを用いて同様の方法で測定することもできる。TL1Aの添加により惹起される細胞機能に対するDcR3改変体の阻害活性は、DcR3改変体を添加しなかった場合との比較において、当該サイトカインの減少や細胞増殖の阻害により、確認される。さらに、*in vivo*においては、例えば、*Mucosal Immunology*, 2011, 4: p. 172-185に記載されたTNBS(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)誘発大腸炎モデル、あるいは、*Mucosal Immunology*, 2014, 7: p. 1492-1503に記載されたDSS(dextran sodium sulfate)誘発大腸炎モデルにおいて、DcR3改変体投与による生存、体重、病態、及び病理等の改善を評価することができる。その他、マウス等のげっ歯類のTL1A依存的な炎症、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患モデルにおける、病態改善効果を評価することができる。

20

30

## 【0198】

FasLの添加により惹起される細胞機能に対する阻害活性は、例えば、*J. Rheumatol.*, 2013, 40: p. 1316-1326に記載された方法等を用い、以下のように測定することができる。DcR3改変体を添加した培地中において、Jurkat細胞(DSMZ番号: ACC 282)を用い、可溶型FasL又は抗体で架橋した可溶型FasL依存的なアポトーシスを、Annexin V/Propidium Iodide染色あるいは生細胞のBrdU取り込みやATP量等により測定する。あるいは、可溶型FasLの代わりに膜型FasL強制発現株を用いて同様の方法で測定することもできる。又は、刺激したPBMCあるいはT細胞から誘導したFasLを用いて同様の方法で測定することもできる。FasLの添加により惹起される細胞機能に対するDcR3改変体の阻害活性は、DcR3改変体を添加しなかった場合との比較において、当該アポトーシスの減少により確認される。

40

50

## 【0199】

上述の方法にて測定される、本発明のDcR3改変体としては、例えばLIGHT、TL1A及びFasLの添加により惹起される細胞機能の少なくとも一つ以上に対して阻害活性を有するDcR3改変体、LIGHT、TL1A及びFasLの添加により惹起される細胞機能の全てに対して阻害活性を有するDcR3改変体、FasLの添加により惹起される細胞機能への阻害活性を有さず且つLIGHT及びTL1Aの添加により惹起される細胞機能のいずれか一つ以上に対して阻害活性を有するDcR3改変体、又はFasLの添加により惹起される細胞機能への阻害活性を有さず且つLIGHT及びTL1Aの添加により惹起される細胞機能への阻害活性を有するDcR3改変体が挙げられる。本発明において、「あるリガンド添加により惹起される細胞機能に対して阻害活性を有さない」という表現は、野生型DcR3よりも阻害活性が有意に低下していることを含む意味で用いられる。

10

## 【0200】

## (4) DcR3改変体のOPGリガンド反応性評価

本発明のDcR3改変体は、リガンド結合に関与しない、CRD1、CRD4、CRD3の一部のいずれか又は全てがOPG由来の配列となっていることを一つの特徴とする。

## 【0201】

DcR3改変体がOPGリガンドであるRANKL及びTRAILに対して結合活性を有さないことは、例えば、上述した、LIGHT、TL1A及びFasLに対する結合活性を測定する方法と同様の方法等により評価することができる。

20

## 【0202】

本発明のDcR3改変体は、さらにRANKL及びTRAILに対しても中和活性を有さないことを一つの特徴とする。

## 【0203】

RANKLに対するDcR3改変体の中和活性は、例えば、J. Immunol., 2012, 189: p. 245 - 252に記載の、RANKL刺激による破骨前駆細胞の分化アッセイであるTRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 活性測定等を用い、評価することができる。

## 【0204】

また、TRAILに対するDcR3改変体の中和活性は、例えば、DR4あるいはDR5を発現するヒトがん細胞株において、可溶性TRAIL又は架橋した可溶性TRAILによるアポトーシス誘導を、上述したFasLに対する中和活性を測定する方法と同様の方法等により評価することができる。

30

## 【0205】

## (5) DcR3改変体の動態評価

本発明のDcR3改変体としては、細胞膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)に含まれるヘパラン硫酸への結合が低下又は消失しているDcR3改変体が好ましく、ヘパラン硫酸結合ドメイン(HBD)を有さないものがより好ましい。

## 【0206】

HBDを介した細胞膜上のヘパラン硫酸に対する結合の有無は、例えば、J. Immunol., 2006, 176: p. 173 - 180に記載された方法等を用い、以下のように測定することができる。任意の細胞、例えば、CHO細胞やヒト細胞株、血管内皮細胞、肝細胞、又は血球細胞等に対して、野生型DcR3又はDcR3改変体を反応させ、蛍光標識した検出抗体等を反応させるか、ビオチン、蛍光色素等で標識した野生型DcR3又はDcR3改変体を反応させ、洗浄後、フローサイトメーター(FCM)を用いて標識物質に応じた蛍光強度を検出することで測定することができる。DcR3のHBDを欠損したことによる細胞膜上への結合の低下又は消失は、FCMによる蛍光強度の低下により調べることができる。

40

## 【0207】

上記の細胞膜上への結合がDcR3のHBDを介した結合が否かを評価する方法として

50

は、例えば、*J. Immunol.*, 2006, 176: p. 173 - 180に記載された方法等を用い、野生型DcR3又はDcR3改変体の反応中に阻害物質として、ヘパリン、ヘパラン硫酸等のGAGを添加しておくか、あらかじめ細胞をヘパリナーゼ等の酵素やトリプシン等で処理し、野生型DcR3又はDcR3改変体を反応させる方法が例として挙げられる。

#### 【0208】

本発明のDcR3改変体は、*in vivo*においてヘパラン硫酸を介した消失が軽減されるため、野生型DcR3よりも体内動態が改善されることを1つの特徴とする。本発明において「体内動態が改善される」とは、野生型DcR3に比べて血中半減期が長い、若しくは無限時間までの血中濃度 - 時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve; AUC) 値が高いことを意味する。

10

#### 【0209】

なお、比較対象として、野生型DcR3の代わりに、野生型DcR3のCRDを含む分子を用いることもできる。具体的には、DcR3 FL-Fc (アミノ酸配列: 配列番号100、DNAの塩基配列: 配列番号99)、DcR3 FL-FLAG (アミノ酸配列: 配列番号104、DNAの塩基配列: 配列番号103)、野生型DcR3のCRDとFcを融合させたS195-Fc (アミノ酸配列: 配列番号102、DNAの塩基配列: 配列番号101)、及びHBD内に1アミノ酸変異を有する全長DcR3 (アミノ酸配列: 配列番号112、DNAの塩基配列: 配列番号111)のC末端にFcを融合したR128Q-Fc [米国特許US6,835,814 B1, US6,965,011 B1]等が挙げられる。これらの野生型DcR3のCRDを含む分子を比較対象として用いる場合、野生型DcR3コントロールとも記載する。

20

#### 【0210】

マウス等のげっ歯類、カニクイザル等の非ヒト霊長類における、DcR3改変体の血中濃度推移は、任意の用量を静脈又は皮下投与し、任意の時間に採血し、DcR3あるいはヒトFcの検出系を用いて測定することができる。血中半減期、AUC等の動態パラメータは、例えば、薬物動態、1999, 14: p. 286 - 293記載された方法等を用い、血中濃度推移より、モーメント解析等の手法を用いて算出することができる。

#### 【0211】

また、N型糖鎖の末端に付加されるシアル酸数が多いと体内動態が改善されることが知られていることから (*J. Pharm. Sci.*, 2015, 104: p. 1866 - 1884)、N型糖鎖を有する本発明のDcR3改変体も、シアル酸の付加数が多いことが好ましい。タンパク質1分子当たりのシアル酸の付加数は、例えば、シアル酸蛍光標識用試薬キット (タカラ社) 等を用いて標識したシアル酸を逆相HPLCにより分離し、シアル酸の標準曲線と比較することにより算出することができる。

30

#### 【0212】

##### (6) DcR3改変体の物性評価

本発明のDcR3改変体は、哺乳動物細胞を用いて発現、単離又は精製した場合、野生型DcR3に比べて凝集体の含量が低いことが1つの特徴である。

#### 【0213】

タンパク質の発現、分泌時に凝集体が生成されているかどうかは、例えば、DcR3改変体を搭載した組換えベクターを導入した宿主細胞及び/又は培養上清を回収し、抗DcR3抗体、あるいは、Fc融合体やHis、FLAG等のタグ付加体である場合には、それらに対する抗体によるイムノプロットにより、非還元条件下におけるおおよその分子量を調べることにより、判断することができる。タンパク質発現及び/又は分泌時にタンパク質が凝集している場合、予想分子量よりも大きいサイズのバンドが1本あるいは複数本検出される。

40

#### 【0214】

タンパク質の分子量は、アミノ酸配列から算出する方法が挙げられる。また、より正確な分子量を求める場合には、SEC-MALSによる分析方法が挙げられる。SEC(S

50

ize Exclusion chromatography) - HPLCで分離された波長215nmで検出される各ピークについて、多角度光散乱検出器(Multi Angle Light Scattering; MALS)によって検出される散乱強度の最大値を用いて分子量を算出することができる。HPLCシステムとしては、例えば、島津製作所のProminence、SECカラムとしては、例えば、東ソー社のTSK gel、MALSの検出器としては、例えば、Wyatt Technology社のminiDAWN TREOS等が挙げられる。

#### 【0215】

単離又は精製したタンパク質が凝集しているかどうかは、タンパク質を非還元条件下でSDS-PAGEし、CBB染色等で検出するか、上述と同様の方法でイムノプロットにより調べることができる。また、凝集体の含量は、HPLCを用いたゲルろ過クロマトグラフィー(SEC)で分離された波長215nmで検出される各ピークについて、その面積から各ピークの割合を算出することができる。SECカラムとしては、例えば、東ソー社のTSK gel G3000SW、又は、Waters社のACQUITY UPLC Protein BEH SEC等が挙げられる。なお、上述の方法で分析した場合の好ましい凝集体の含量は0~60%であり、より好ましい凝集体の含量は0~40%であり、さらに好ましい凝集体の含量は0~30%であり、さらにより好ましい凝集体の含量は0~20%であり、最も好ましい凝集体の含量は0~10%である。

10

#### 【0216】

また、本発明のDcR3改変体は、野生型DcR3よりも疎水性が低いことを特徴とする。

20

タンパク質の疎水性は、タンパク質の表面に存在する疎水性の領域と相互作用する疎水クロマトグラフィー(Hydrophobic interaction chromatography; HIC)カラムを用いて測定することができる。HICカラムとしては、例えば、東ソー社のTSK gel Butyl-NPR等が挙げられる。

#### 【0217】

また、本発明のDcR3改変体は、野生型DcR3よりも熱安定性が向上していることを特徴とする。タンパク質の熱安定性の測定方法としては、DSC(Differential scanning calorimetry)等の熱量測定法、熱変性あるいは化学変性時における、自家蛍光スペクトル又は円偏光二色性(circular dichroism; CD)スペクトルを得る分光法、温度上昇に伴うタンパク質の内側に存在する疎水性領域の露出を蛍光色素(Sypro Orange等)によって検出するDSF(Differential scanning fluorimetry)等が挙げられる[J Am Chem Soc, 2009, 131: p. 3794-3795]。

30

#### 【0218】

タンパク質の熱安定性を評価するDSFは、例えば、J. Pharm. Sci., 2013, 102: p. 2471-2483に記載された方法等を用い、各温度における蛍光量を測定することができる。また、BioRad社のCFX manager等のソフトウェアを用い、融解曲線を描き、Tm(thermal unfolding transition midpoints)値を算出することができる。同様に、タンパク質の熱安定性を評価するDSCは、例えば、J. Pharm. Sci., 2012, 101: p. 955-964に記載された方法等を用い、各温度における熱容量とTm値を算出することができる。

40

#### 【0219】

### 7. DcR3改変体組成物

本発明のDcR3改変体組成物としては、DcR3改変体分子からなる組成物が挙げられる。本発明のDcR3改変体組成物としては、DcR3改変体分子を構成する一次アミノ酸配列が同等であり、当該アミノ酸配列における酸化/還元反応、糖鎖付加反応、硫酸化付加反応等、翻訳後修飾によって生じ得る複数のDcR3改変体分子が含まれている組成物が挙げられる。本発明のDcR3改変体は、例えば、1以上のN-グリコシド結合複合

50

型糖鎖を有する D c R 3 変体と、N - グリコシド結合複合型糖鎖を有しない D c R 3 変体とを含んでいても良い。1 以上の N - グリコシド結合複合型糖鎖を有する D c R 3 変体の割合は、例えば、本発明の D c R 3 変体の総数に対して、好ましくは 70 ~ 100 % であり、より好ましくは 90 ~ 99 % であり、特に好ましくは 95 ~ 98 % である。

【0220】

#### 8. D c R 3 変体を含む医薬組成物

本発明の一実施形態は、有効量の本発明の D c R 3 変体を含む組成物である。本発明の D c R 3 変体を含む組成物は、粘膜性の疾患を含む、自己免疫疾患、炎症性疾患、又はアレルギー性疾患の予防又は治療薬の有効成分として用いることができる。すなわち、自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患の予防又は治療が必要な患者に、本発明の D c R 3 変体を含む医薬組成物を投与することにより、自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患を予防又は治療することができる。

10

【0221】

本発明の組成物が用いられる病態又は疾患としては、限定されるものではないが、例えば、炎症性腸疾患 ( I B D )、全身性エリテマトーデス、乾癬、慢性移植片対宿主病、急性移植片対宿主病、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、セリアック病、特発性血栓性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、シェーグレン症候群、強皮症、喘息、ブドウ膜炎、表皮過形成、円形脱毛症、ベーチェット病、高安動脈炎、軟骨炎症、骨分解、関節炎、若年性関節炎、若年性関節リウマチ、少関節型若年性関節リウマチ、多関節型若年性関節リウマチ、全身性発症若年性関節リウマチ、若年性強直性脊椎炎、若年性腸疾患性関節炎、若年性反応性関節炎、若年性ライター症候群、S E A 症候群 ( 血清陰性、腱附着部症、関節症候群 )、若年性皮膚筋炎、若年性乾癬性関節炎、若年性強皮症、若年性全身性エリテマトーデス、若年性脈管炎、少関節型関節リウマチ、多関節型関節リウマチ、全身性発症関節リウマチ、強直性脊椎炎、腸疾患性関節炎、反応性関節炎、ライター症候群、皮膚筋炎、乾癬性関節炎、脈管炎、筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、変形性関節症、結節性多発動脈炎、ウェゲナー肉芽腫、動脈炎、リウマチ性多発筋痛、サルコイドーシス、硬化症、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、アテローム性動脈硬化症、ステイル病、慢性閉塞性肺疾患、ギラン・バレー症候群、1 型糖尿病、グレーブス病、アジソン病、レイノー現象、自己免疫性肝炎、又はウィスコット・アルドリッチ症候群等の炎症性疾患、自己免疫疾患、又はアレルギー性疾患等が挙げられる。

20

30

【0222】

本発明の D c R 3 変体を含む組成物は、活性成分として該 D c R 3 変体、又は任意の他の治療のための有効成分との混合物を含むことができる。また、それら医薬製剤は、活性成分を薬理的に許容される一種もしくはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

【0223】

医薬組成物中の本発明の D c R 3 変体の含量は、剤形、本発明の D c R 3 変体の薬理的に許容される投与量等により異なるが、例えば約 0.01 ~ 100 重量 % である。また、医薬製剤中の薬理的に許容される担体の含有量は、剤形、本発明の D c R 3 変体の薬理的に許容される投与量等により異なるが、例えば 0 ~ 99.9 重量 % である。

40

【0224】

投与経路としては、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、例えば、経口投与、又は、静脈内、皮下、口腔内、気道内、直腸内、筋肉内、若しくは腹腔内等の非経口投与が挙げられる。

【0225】

投与形態としては、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、又は注射剤等がある。

【0226】

経口投与に適当な製剤としては、例えば、シロップ剤のような液体調製物は、水、蔗糖、ソルビット、又は果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、又はプロピレングリコール

50

等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、又は大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、又はペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造できる。また、錠剤、散剤及び顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、又はマンニト等の賦形剤、澱粉、又はアルギン酸ソーダ等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、又はタルク等の滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、又はゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。

【0227】

非経口投与に適切な製剤としては、好ましくは受容者の血液と等張である活性化合物を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液又は塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体等を用いて注射用の溶液を調製する。

10

【0228】

また、これら非経口剤においても、経口剤で例示した希釈剤、防腐剤、フレーバー類、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、及び可塑剤等から選択される1種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

【0229】

本発明のDcR3改変体を含む医薬は、哺乳動物(例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、又はサル等)に対して、安全に投与することができる。

【0230】

本発明のDcR3改変体の投与量及び投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、疾患、治療すべき症状の性質もしくは重篤度により異なるが、通常経口の場合、成人一人当たり0.01mg~1g、好ましくは0.05~50mgを一日一回ないし数回投与する。静脈内投与等の非経口投与の場合、成人一人当たり0.001~100mg、好ましくは0.01~10mgを一日一回ないし数回投与する。しかしながら、これら投与量及び投与回数に関しては、前述の種々の条件により変動する。

20

【実施例】

【0231】

以下に本発明の実施例を示す。ただし本発明はこれら実施例によって制限されるものではない。

30

【0232】

[実施例1] 哺乳動物細胞における野生型DcR3の凝集性評価

野生型DcR3(全長DcR3とも言う)(配列番号4)と、リンカー配列IEGRMD(配列番号106)と、ヒトIgG1Fc領域(g1S)(配列番号72)との融合タンパク質(DcR3FL-Fc)(図3A、配列番号100)、HBD領域を欠損したヒトDcR3(配列番号108)と、リンカー配列IEGRMD(配列番号106)と、ヒトIgG1Fc領域(配列番号72)との融合タンパク質(S195-Fc)(図3B、配列番号102)、及び全長DcR3(配列番号4)にFLAGタグ(配列番号110)を付加したタンパク質(DcR3FL-FLAG)(配列番号104)を以下の通り作製した。

40

【0233】

DcR3FL-Fcについては、シグナルペプチド配列のDNA断片、ヒトDcR3のDNA断片(配列番号3)、リンカー配列IEGRMDのDNA断片(配列番号105)、Fc(g1S)のDNA断片(配列番号71)を人工合成(GENEWIZ社あるいはシグマ社)し、制限酵素NheIとSalI(New England Biolabs社)で消化したpCIPuroベクター(Promega社pCIを一部改変)にIn-Fusion HD Cloning Kit(Clontech社)を用いて挿入し、大腸菌DH5コンピテントセル(TOYOBO社)を形質転換し、DcR3FL-FcDNA断片(配列番号99)が挿入された形質転換体を取得した。S195-Fcについても同様に、シグナルペプチド配列のDNA断片、HBDを除いたヒトDcR3のDNA

50

断片（配列番号107）、リンカー配列IEGRMDのDNA断片（配列番号105）、Fc（g1S）のDNA断片（配列番号71）を人工合成し、S195-Fc DNA断片（配列番号101）が挿入された形質転換体を取得した。DcR3 FL-FLAGについては、シグナルペプチド配列のDNA断片、ヒトDcR3のDNA断片（配列番号3）、FLAGタグのDNA断片（配列番号109）を人工合成し、DcR3 FL-FLAG DNA断片（配列番号103）が挿入された形質転換体を取得した。

#### 【0234】

各々の形質転換体から得られた各プラスミドを、それぞれ、Freestyle CHO-S細胞、Freestyle 293F細胞、Expi293細胞（いずれもThermo Scientific社）のいずれかの宿主細胞に導入し、一過性にタンパク質を発現させた。プラスミド導入には、Freestyle MAX Reagent、293 Fectin Transfection Reagent、ExpiFectamine 293（いずれもThermo Scientific社）のいずれかを用いた。

10

#### 【0235】

トランスフェクトした細胞を数日間培養した後、培養上清を回収し、MabSelect SuRe（GEヘルスケア社）を用いてDcR3 FL-Fc及びS195-Fcを、また、Anti-FLAG M2 affinity gel（Sigma社）を用いてDcR3 FL-FLAGを、それぞれアフィニティ精製した。DcR3 FL-Fc及びS195-Fcの培養上清をレジンの充填されたカラムに通液し、PBS（ナカライテスク社）で洗浄後、溶出用緩衝液（20 mM クエン酸、50 mM NaCl、pH 3.4）で溶出し、速やかに中和用緩衝液（1 M リン酸Na、pH 7.0）で中和した。DcR3 FL-FLAGの培養上清も同様にレジんにチャージし、PBSで洗浄後、溶出用緩衝液（100 mM グリシン-HCl、pH 3.5）で溶出し、速やかに中和用緩衝液（1 M トリス-HCl、pH 8.0）で中和した。それぞれの溶出フラクションの280 nmにおける吸光度（ $A_{280}$ ）を測定し、測定値の高い連続フラクションを回収した。回収した画分の緩衝液を、NAPカラム（GEヘルスケア社）を用いてPBSに置換し、0.22  $\mu$ mのフィルターを通したものを精製タンパク質とした。280 nmにおけるDcR3 FL-Fc、S195-Fc及びDcR3 FL-FLAGの吸光係数をそれぞれ、1.03、1.17、0.77として濃度を算出し、非還元及び100 mM DTTの還元条件下におけるSDS-PAGE後、ゲルをクマシー染色（ナカライテスク社）し、分子量を確認した。DcR3 FL-Fc、S195-Fc及びDcR3 FL-FLAGのアミノ酸配列から予測される推定分子量は、単量体ではそれぞれ約56.4 kDa、44.7 kDa、31.0 kDaである。非還元条件下では、Fc融合体であるDcR3 FL-Fc、S195-Fcは二量体として存在するので推定分子量がそれぞれ約112.8 kDa、89.4 kDaとなる。

20

30

#### 【0236】

非還元条件下におけるSDS-PAGEの結果、哺乳動物細胞において一過性発現したDcR3 FL-Fc、S195-Fc及びDcR3 FL-FLAGは、その大部分がサンプルウェルに残存し、また、泳動されたものもスミアあるいはラダー状となり、いずれの組換え体も高度に凝集していることが明らかになった（図1A）。

40

#### 【0237】

更に、HEK293細胞を宿主細胞として作製された市販品の全長DcR3-Fc（アブカム社）について、非還元条件下において、1次抗体にウサギ抗ヒトIgG Fcポリクローナル抗体、2次抗体にヤギ抗ウサギIgG抗体（Dako社）を用いてイムノプロットを行ったところ、上述した精製品と同様に、そのほとんどが凝集体として存在していた（図1B）。

#### 【0238】

一方で、昆虫細胞Sf21で発現させた市販品のDcR3 FL-Fc（R&D社）は、ほとんど凝集が認められず、野生型DcR3を産生させる宿主細胞の種類によって、凝集性に差が認められた（図1C）。また、以下の方法で昆虫細胞S2を宿主細胞として、

50

D c R 3 F L - F c (配列番号 1 0 0)、ヒト D c R 3 (配列番号 2) の 2 1 8 番目の A r g を G l n に置換した R 2 1 8 Q 変異を有した R 2 1 8 Q - F c (米国特許 U S 6 8 3 5 8 1 4 B 1、U S 6 9 6 5 0 1 2 B 1、配列番号 3 4 0)、及び、H B D を欠損した S 1 9 5 - F c (配列番号 1 0 2) を作製し、凝集性を評価した。ヒト D c R 3 の D N A 断片 (配列番号 3)、ヒト D c R 3 に R 2 1 8 Q 変異を導入した D N A 断片 (配列番号 1 1 1)、あるいは H B D を除いたヒト D c R 3 の D N A 断片 (配列番号 1 0 7) のいずれかと、リンカー配列 I E G R M D の D N A 断片 (配列番号 1 0 5) 及び F c (g 1 S) の D N A 断片 (配列番号 7 1) を人工合成し、p M T B i P V 5 - H i s A (T h e r m o S c i e n t i f i c 社)、D r o s o p h i l a E x p r e s s i o n S y s t e m (T h e r m o S c i e n t i f i c 社) を用いて、D c R 3 F L - F c、R 2 1 8 Q - F c 及び S 1 9 5 - F c を安定的に発現する S 2 細胞株を取得した。該安定発現株の培養上清より、上述と同様の方法で M a b S e l e c t S u R e によるアフィニティ精製を実施した。

10

【 0 2 3 9 】

その結果、S 2 細胞で産生させた D c R 3 F L - F c、R 2 1 8 Q - F c 及び S 1 9 5 - F c はほとんど凝集しなかった (図 1 C)。凝集体含有量の定量的な評価は、H P L C (島津製作所) を用いたゲルろ過クロマトグラフィー (S E C) (T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L 7 . 8 m m x 3 0 0 m m) (東ソー社) により実施した。E x p i 2 9 3 由来及び S 2 由来の S 1 9 5 - F c を分析し、ピーク面積から算出した単量体、凝集体及び分解物の割合 (%) を表 1 に示す。

20

【 0 2 4 0 】

【表 1】

表 1

宿主細胞	単量体	凝集体	分解物
E x p i 2 9 3	1 5 . 1 %	8 1 . 9 %	3 . 0 %
S 2	8 4 . 9 %	1 5 . 1 %	0 . 0 %

【 0 2 4 1 】

以上の結果から、野生型 D c R 3 は、哺乳動物細胞で発現させた場合、凝集体の生成量が増加することが明らかとなった。

30

【 0 2 4 2 】

[ 実施例 2 ] 哺乳動物細胞発現系において凝集しない D c R 3 変体の作製

哺乳動物細胞発現系において凝集しないヒト D c R 3 変体はこれまで知られていない。そこで、D c R 3 の活性を維持しながら、凝集体の生成量が低減する D c R 3 変体の作製を試みた。D c R 3 は 3 0 0 残基からなる可溶性分子であり、N 末端側にシグナルペプチド、次いで T N F 受容体スーパーファミリー (T N F R S F) に特徴的な 4 つの C y s t e i n e r i c h d o m a i n (C R D 1、C R D 2、C R D 3、C R D 4) を持ち、C 末端側はヘパラン硫酸結合モチーフを含む塩基性アミノ酸に富んだ H e p a r a n S u l f a t e B i n d i n g D o m a i n (H B D) からなる (図 2、3 A)。D c R 3 リガンドである L I G H T、T L 1 A、F a s L はいずれも D c R 3 の C R D 2 及び C R D 3 を介して結合する。そこで、D c R 3 の C R D 2 及び C R D 3 を含む領域を保持したまま、D c R 3 の C R D 1 及び / 又は C R D 4 を類縁の T N F R S F 分子である可溶性デコイ受容体 O s t e o p r o t e g e r i n (O P G) に置換し、D c R 3 変体を作製した。

40

【 0 2 4 3 】

ヒト D c R 3 において、C R D 1 及び C R D 4 をヒト O P G のアミノ酸配列とし、C R D 2 及び C R D 3 をヒト D c R 3 のアミノ酸配列とし、H B D のアミノ酸配列を除去したキメラ A (配列番号 5 4) と、F c 配列 (I E G R M D g 1 S (配列番号 3 3 9)、あ

50

るいは、EUインデックスで示されるヒトIgG4の重鎖の228番目のSerがProに、235番目のLeuがGluに、409番目のArgがLysに置換されているg4PEK(配列番号74)のいずれか)とを融合させたキメラA-Fc(図3C、配列番号80又は82)、ヒトDcR3において、CRD1をヒトOPGのアミノ酸配列とし、CRD2、CRD3及びCRD4をヒトDcR3のアミノ酸配列とし、HBDのアミノ酸配列を除去したキメラB(配列番号50)と、Fc配列(IEGRMD g1S)とを融合させたキメラB-Fc(図3G、配列番号76)、ヒトDcR3において、CRD1、CRD2及びCRD3をヒトDcR3のアミノ酸配列とし、CRD4をヒトOPGのアミノ酸配列とし、HBDのアミノ酸配列を除去したキメラC(配列番号52)と、Fc配列(IEGRMD g1S)とを融合させたキメラC-Fc(図3H、配列番号78)、キメラAのCRD3のうち、18番目~36番目の部分及びそのC末端側の2アミノ酸を含むアミノ酸配列をヒトOPGに置換した103-123OPG(配列番号56)と、Fc配列(g4PEK)とを融合させた103-123OPG-Fc(g4PEK)(図3D、配列番号84)の、各種構造を有する各種DcR3改変体を以下の方法で作製した。なお、CRD4がDcR3由来のDcR3改変体はCRD4のC末端に、DcR3(配列番号2)の194番目~195番目のアミノ酸配列であるTS配列を、CRD4がOPG由来のDcR3改変体は、CRD4のC末端に、OPG(配列番号14)の186番目~194番目のアミノ酸配列であるSGNSESTQK配列を付加している。

10

## 【0244】

シグナルペプチド配列のDNA断片、キメラA、キメラB、キメラC又は103-123OPGをコードし、HBD配列を除去したDNA断片(キメラA:配列番号53、キメラB:配列番号49、キメラC:配列番号51、103-123OPG:配列番号55)を人工合成し、Fc配列(IEGRMD g1Sあるいはg4PEK)をコードするDNA断片(配列番号338、73)と連結させる形で、実施例1と同様の方法でpCIPuroベクターに挿入し、各種DcR3改変体をコードするDNA断片(キメラA-Fc:配列番号79又は81、キメラB-Fc:配列番号75、キメラC-Fc:配列番号77、103-123OPG-Fc:配列番号83)が挿入されたプラスミドを得た。得られたプラスミドを実施例1と同様に、Freestyle CHO-S細胞、Freestyle 293F細胞、Expi293細胞のいずれかの宿主細胞に導入し、一過性にタンパク質を発現させ、培養上清からMabSelect Sureによるアフィニティ精製を実施した。

20

30

## 【0245】

作製した各種DcR3改変体の単量体、凝集体及び分解物の割合(%)を実施例1と同様の方法でSEC-HPLCにより、あるいは、ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 4.6mm x 150mmを用いたSEC(Waters社)により算出した(表2)。

## 【0246】

## 【表2】

表2

DcR3改変体	Fc	宿主細胞	単量体	凝集体	分解物
キメラA-Fc	IEGRMD g1S	CHO-S	93.8%	4.6%	1.6%
キメラA-Fc	g4PEK	Expi293	96.6%	3.4%	0.0%
キメラB-Fc	IEGRMD g1S	Expi293	83.8%	15.4%	0.8%
キメラC-Fc	IEGRMD g1S	Expi293	70.0%	29.5%	0.5%
103-123OPG-Fc	g4PEK	Expi293	98.5%	1.5%	0.0%

40

## 【0247】

その結果、キメラA-Fc、キメラB-Fc、キメラC-Fc及び103-123OPG-FcのいずれのDcR3改変体も、野生型DcR3と比較して凝集体が減少した。凝

50

集体の低減効果はキメラA - Fcが最も高く、次いで、キメラB - Fc、キメラC - Fcの順であった。従って、OPG由来のCRD1及びCRD4への置換はそれぞれ凝集を減少させる効果があり、CRD1及びCRD4の両方を組み合わせて置換することにより、更に凝集を減少させる効果があることが示された。

【0248】

キメラA - Fc、キメラB - Fc、キメラC - Fc（いずれもIEGRMD g1S）を還元及び100mM DTTの還元条件下におけるSDS - PAGEに供した結果、哺乳動物細胞を宿主として作製した場合でも、キメラA - Fc、キメラB - Fcではスマアやラダーはほとんど認められなかった（図4）。

【0249】

絶対分子量を算出するため、キメラA - Fc（IEGRMD g1Sあるいはg4PEK）及び103 - 123OPG - Fc（g4PEK）について、HPLC（Prominence、島津製作所）を用いたSEC（TSK gel G3000 SWXL 7.8mm x 300mm）（東ソー社）による分析を行った。移動相には、50mmol/L リン酸緩衝液（pH7.0、500mmol/L NaCl）を使用し、流速0.75mL/minで分離後、波長215nmで検出される各ピークについて、多角度光散乱検出器（Multi Angle Light Scattering; MALS）（miniDAWN TREOS、Wyatt Technology社）によって検出される散乱光強度を用いて絶対分子量（%は不確かさ）を算出した。結果を表3に示す。

【0250】

【表3】

表3

DcR3改変体	Fc	分子量 (%)	kDa
キメラA-Fc	IEGRMD g1S	$8.858 \times 10^4$ (1%)	89
キメラA-Fc	g4PEK	$9.744 \times 10^4$ (0.8%)	97
103-123OPG-Fc	g4PEK	$1.052 \times 10^5$ (0.7%)	105

【0251】

キメラA - Fc（IEGRMD g1Sあるいはg4PEK）及び103 - 123OPG - Fcのアミノ酸配列から予測される二量体の分子量は、それぞれ、92.0kDa、90.1kDa、90.5kDaであることから、いずれのDcR3改変体も、二量体として存在することが確認された。

【0252】

[実施例3]キメラA - Fc（g4PEK）のN型糖鎖付加率分析及び凝集性に対する影響の評価

キメラA - Fc（g4PEK）（配列番号82）における、アミノ酸配列から予測されるN型糖鎖付加が予測されるAsnは、OPG由来のCRD4に3ヶ所（N131、N144、N157）、及びFc領域に1か所（N260）存在する。そこで、キメラA - Fc（g4PEK）のN型糖鎖付加の有無を以下の方法で評価した。サンプル調製は、還元及びアルキル化処理したキメラA - Fc（g4PEK）のN型糖鎖をPNGaseF処理により切断した後、トリプシン、エンドプロテイナーゼAsp - N、キモトリプシンの各プロテアーゼによりタンパク質を消化した。得られたペプチド混合物を5%（v/v）アセトニトリル/0.1%ギ酸に溶解し、液体クロマトグラフィー - エレクトロスプレーイオン化 - 質量分析計（LC - ESI - MS）により分析した。C18逆相カラム（0.2mm x 150mm）（GL Science社）を搭載したMAGIC2000 HPLC（Michrom Bioresources社）とLTQ Orbitrap XL イオントラップ - Orbitrap ハイブリッド質量分析計（Thermo Scientific社）を使用し、5 - 65%（v/v）アセトニトリル/0.1%ギ酸のグラジエ

ント溶出により分析を行った。得られたペプチド断片は、キメラA - Fc (g4PEK) のアミノ酸配列に対してMASCOT解析 (Matrix Science社) を行うことで同定した。N型糖鎖付加AsnはPNGaseF処理によりAspに変換され質量が0.984Da増加することを指標に、MSスペクトルのピークがシフトしたペプチド及び該ペプチドに含まれる糖鎖付加部位を同定した。その結果、N131、N144、N157及びN260のいずれのAsn残基についてもN型糖鎖が付加されていることが示された。このうちN157及びN260は、ほぼ全てのペプチド断片において糖鎖が付加されていたが、N131及びN144については、糖鎖付加断片と付加されていない断片のいずれも検出された。

#### 【0253】

次に、OPG由来のCRD4の3ヶ所のAsn (N131、N144、N157) に付加されているN型糖鎖の凝集性に対する影響を評価する目的で、N131及びN144の2ヶ所あるいはN131、N144及びN157の3ヶ所の糖鎖を除去するためのアミノ酸置換体を作製した。2ヶ所糖鎖除去体としては、N131及びN144をそれぞれSerに置換したN131S/N144S - Fc (g4PEK) (配列番号86) あるいはT133、S146をそれぞれAlaに置換したT133A/S146A - Fc (g4PEK) (配列番号88) を作製した。3ヶ所糖鎖除去体としては、N131、N144及びN157をそれぞれSerに置換したN131S/N144S/N157S - Fc (g4PEK) (配列番号90) あるいはT133、S146及びT159をそれぞれAlaに置換したT133A/S146A/T159A - Fc (g4PEK) (配列番号92) を作製した。シグナルペプチド配列のDNA断片、それぞれの糖鎖除去体をコードするDNA断片 (配列番号85、87、89、91) を人工合成し、実施例1と同様の方法でpCIPuroベクターに挿入し、Expi293細胞に導入した。各糖鎖除去体を一過性に発現させた後、培養上清からMabSelectSureによるアフィニティ精製を実施した。作製した各糖鎖除去体は、SEC-UPLC (装置: ACQUITY UPLC、カラム; ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200、1.7  $\mu$ m、4.6  $\times$  150mm) (Waters社) により分析した。ピーク面積から算出した単量体、凝集体及び分解物の割合 (%) を表4に示す。

#### 【0254】

##### 【表4】

表4

糖鎖除去体	Fc	単量体	凝集体	分解物
N131S/N144S - Fc	g4PEK	92.5%	7.5%	0.0%
T133A/S146A - Fc	g4PEK	91.2%	8.8%	0.0%
N131S/N144S/N157S - Fc	g4PEK	64.0%	36.0%	0.0%
T133A/S146A/T159A - Fc	g4PEK	62.3%	37.7%	0.0%

#### 【0255】

2ヶ所糖鎖除去体の凝集体含量は、キメラA - Fc (表2) と比較するといずれのアミノ酸置換体においても凝集体がやや増加しており、3ヶ所糖鎖除去体はいずれのアミノ酸置換体においても更なる凝集体の増加が認められた。このことから、OPG由来のCRD4に付加されている3ヶ所 (N131、N144、N157) のN型糖鎖のうち、特にN157に付加されている糖鎖がキメラAの凝集体を減少させることに寄与していることが示された。一方で、3ヶ所全てのN型糖鎖を除去しても、DcR3 FL - FcやS195 - Fc (表1) と比較すると凝集体の割合は低下していた。よって、N型糖鎖及びOPGの配列は、それぞれ野生型DcR3の凝集体を減少させる効果があり、両者を組み合わせることで更に凝集体を減少させる効果があることが示された。

#### 【0256】

[ 実施例 4 ] 各種 D c R 3 改変体の物性評価

実施例 2 及び 3 で作製した、各種 D c R 3 改変体の凝集減少効果の原因を解析するため、以下の理化学分析を行った。疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C ) は、タンパク質表面の疎水性が高くなるほどカラムからの溶出時間が長くなる分析方法である。疎水クロマトグラフィーカラム ( T S K g e l B u t y l - N P R 4 . 6 m m × 3 5 m m ) ( 東ソー社 ) を用いて、バッファー A ( 2 m m o l / L 硫酸アンモニウム、2 0 m m o l / L トリス緩衝液、p H 7 . 0 ) 及びバッファー B ( 2 0 m m o l / L トリス緩衝液、p H 7 . 0 ) のグラジエントを移動相として、8 μ g のサンプルを流速 0 . 5 m L / m i n で分離後、波長 2 1 5 n m で検出された溶出時間 ( 分 ) について、表 5 に示す。

【 0 2 5 7 】

【表 5】

表 5

		F c	宿主細胞	溶出時間 (分)
野生型 D c R 3 コントロール	R 2 1 8 Q - F c	I E G R M D g 1 S	S 2	3 9 . 8
	S 1 9 5 - F c	I E G R M D g 1 S	S 2	3 6 . 7
D c R 3 改変体	キメラ A - F c	I E G R M D g 1 S	CHO - S	3 7 . 8
	キメラ A - F c	g 4 P E K	Exp i 2 9 3	3 8 . 7
	キメラ C - F c	I E G R M D g 1 S	Exp i 2 9 3	3 9 . 7
	1 0 3 - 1 2 3 O P G - F c	g 4 P E K	Exp i 2 9 3	3 7 . 8
	N 1 3 1 S / N 1 4 4 S - F c	g 4 P E K	Exp i 2 9 3	3 9 . 2
	T 1 3 3 A / S 1 4 6 A - F c	g 4 P E K	Exp i 2 9 3	3 9 . 3
	N 1 3 1 S / N 1 4 4 S / N 1 5 7 S - F c	g 4 P E K	Exp i 2 9 3	4 0 . 6
	T 1 3 3 A / S 1 4 6 A / T 1 5 9 A - F c	g 4 P E K	Exp i 2 9 3	4 0 . 9

【 0 2 5 8 】

昆虫細胞 S 2 で作製した全長 D c R 3 の 1 アミノ酸変異体 R 2 1 8 Q - F c と比較して、S 2 由来 S 1 9 5 - F c、哺乳動物細胞由来キメラ A - F c ( I E G R M D g 1 S、g 4 P E K )、1 0 3 - 1 2 3 O P G - F c ( g 4 P E K ) 及び 2 ケ所糖鎖除去体はいずれも溶出時間が短くなっており、疎水性の低下により物性が改善し、凝集体が減少したと考えられる。また、凝集体低減効果がやや減弱していたキメラ C 及び 3 ケ所糖鎖除去体では、R 2 1 8 Q - F c と同等以上の疎水性であり、凝集体の割合とタンパク質の疎水性に相関があることが示された。

【 0 2 5 9 】

続いて、D i f f e r e n t i a l S c a n n i n g F l u o r i m e t r y ( D S F ) 法により、タンパク質の熱安定性を評価した。9 6 ウェル白色マイクロプレート ( B i o R a d 社 ) に、各種 D c R 3 改変体 9 . 5 μ g と、水で 5 0 倍に希釈した S Y P R O O r a n g e P r o t e i n G e l S t a i n ( i n v i t r o g e n 社 ) 1 μ L を 2 0 μ L の系で混合し、C 1 0 0 0 サーマルサイクラー ( B i o R a d 社 ) を用いて 2 0 から 9 5 まで 0 . 5 ずつ、1 0 秒間ずつ温度を上昇させた。各温度での蛍光を F R E T チャンネルで検出し、C F X M a n a g e r ソフトウェア ( B i o R a d 社 ) を用いて融解曲線 ( 図 5 ) 及び融解温度 ( T m 値 ) ( ) ( 表 6 ) を算出した。

【 0 2 6 0 】

10

20

30

40

50

## 【表 6】

表 6

		Fc	宿主細胞	Tm1	Tm2
野生型DcR3 コントロール	R218Q-Fc	IEGRMD g1S	S2	47.5	60.5
	S195-Fc	IEGRMD g1S	S2	62.0	81.0
DcR3改変体	キメラA-Fc	IEGRMD g1S	CHO-S	66.5	82.5
	キメラA-Fc	g4PEK	Exp i 293	61.0	82.5
	キメラC-Fc	IEGRMD g1S	Exp i 293	67.5	82.0
	103-123OPG -Fc	g4PEK	Exp i 293	61.0	82.5
	N131S/N144 S-Fc	g4PEK	Exp i 293	60.0	82.5
	T133A/S146 A-Fc	g4PEK	Exp i 293	60.0	82.5
	N131S/N144 S/N157S-Fc	g4PEK	Exp i 293	61.0	83.0
	T133A/S146 A/T159A-Fc	g4PEK	Exp i 293	61.0	83.5

## 【0261】

昆虫細胞S2で作製した全長DcR3の1アミノ酸変異体R218Q-Fcと比較して、S2由来S195-FcではTm値が大幅に上昇し熱安定性が向上したことから、HBD領域が熱不安定性に寄与していることが示唆された。また、哺乳動物細胞由来のキメラA-Fc (IEGRMD g1S)ではS195-Fcよりも更にTm値が上昇していたことから、DcR3のCRDの一部をOPGのCRDの一部に置換したDcR3改変体は、凝集性が低下するのみならず、タンパク質の熱安定性も向上していることが明らかになった(表6、図5)。

## 【0262】

[実施例5]ヘパラン硫酸結合ドメイン(HBD)を除去したDcR3改変体のヒト正常細胞及びCHO細胞への反応性評価

野生型DcR3及びその変異体FLINT(R218Q変異)のマウス及びカニクイザルにおける体内動態は極めて悪いことが報告されている(Drug Metabolism and Disposition, 2003, 31: p. 502-507)。この要因のひとつは、野生型DcR3に存在するヘパラン硫酸結合ドメイン(HBD)により、DcR3が細胞膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカンに対して直接結合することによると考えられている(J. Immunol., 2006, 176: 173-180)。

## 【0263】

そこで、HBDを除去したDcR3改変体S195-Fc、キメラA-Fc (IEGRMD g1S、g4PEK)、103-123OPG-Fc (g4PEK)のヒトプライマリー細胞及び生産細胞であるCHO細胞への反応性をフローサイトメトリー(FCM)により解析した。陽性対照としてHBD領域を含むDcR3 FL-Fc、陰性対照としてK194-Fc、抗DNP抗体(g4PEK)を用いた。K194-Fc(アミノ酸配列: 配列番号152、DNAの塩基配列: 配列番号151)は、OPG(配列番号14)の1番目のMetから194番目のLysのアミノ酸配列にIEGRMDリンカー(配列番号106)及びFc(g1S)のアミノ酸配列(配列番号72)を融合させたタンパク質であり、実施例1に記載の方法で、Exp i 293細胞を用いて一過性に発現させ、Mabselect SuRe(GEヘルスケア社)を用いて培養上清から精製した。抗DNP抗体(g4PEK)はClin. Cancer Res., 2005, 11(8), p. 3126-3135記載の抗2,4-dinitrophenol(DNP)抗体の可変領域を、Fc配列(g4PEK)をコードするベクターに挿入し、CHO細胞に導入して発現させ、培養上清からProteinA精製した抗体を用いた。ヒトプライマリー細胞としては、HUV EC(Lonza社)及びMale Human Hepatocytes(Bioreclamation IVT社)を用いた。ヒトプライマリー細胞の培

養は、添付文書に従って各細胞毎に指定の培地を用い、コラーゲンコート接着プレート（I W A K I社）を用いて培養した。CHO細胞はEX-CELL 325 PF CHO Serum-Free Medium（Sigma-Aldrich社）を用いて浮遊培養した。

【0264】

HUVEC、Hepatocyteを0.02% EDTA溶液及びセルスクレーパーを用いて剥離し、セルストレーナー（40 $\mu$ m）を通した。剥離したHUVEC、Hepatocyte及び浮遊培養液から分取したCHO細胞をFCM用緩衝液（1% BSA、1mmol/L EDTA、0.05% NaN<sub>3</sub>を含むPBS）で洗浄した後、FCM用緩衝液で懸濁した。

10

【0265】

次に、 $1 \times 10^5$  cells/wellとなるように96ウェルU底プレート（Falcon社）に播種し、作製した各Fc融合タンパク質を10 $\mu$ g/mLとなるように加え、氷上で1時間反応させた。細胞をFCM用緩衝液で洗浄した後、LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit（Molecular Probes社）及び0.1 $\mu$ g/mLのGoat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgG R-phycoerythrin Conjugate（Southern Biotech社）で懸濁し、氷上で1時間染色した。HUVEC及びHepatocyteの染色時には、Human FcR Blocking Reagent（Miltenyiバイオテック社）を添加した。細胞をFCM用緩衝液で洗浄した後、蛍光強度をフローサイトメーターFACS Fortessa（BDバイオサイエンス社）で解析した。

20

【0266】

LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit陰性の生細胞画分についてPE染色強度を解析した結果、DcR3 FL-Fc（IgG1）（R&D社）はHUVEC、Hepatocyte及びCHO細胞のいずれに対しても顕著な結合を示した。一方、HBDを除去したDcR3改変体はいずれも結合しなかった（図6）。

【0267】

[実施例6] DcR3改変体のマウス体内動態の評価

【0268】

30

【表7】

表7

		Fc	宿主細胞
野生型DcR3コントロール	S195-Fc	IEGRMD g1S	S2
DcR3改変体	キメラA-Fc	IEGRMD g1S	CHO-S
	キメラA-Fc	g4PEK	CHO-S
	キメラA-Fc	g4PEK	CHO
	103-123OPG-Fc	g4PEK	CHO
	T133A/S146A-Fc	g4PEK	CHO-S

40

【0269】

表7に示したS195-Fc及び各DcR3改変体のマウス動態試験を実施した。キメラA-Fc（g4PEK）及び103-123OPG-Fc（g4PEK）については、以下に示す方法で、CHO細胞の安定発現により各DcR3改変体を作製した。シグナルペプチド配列のDNA断片、各DcR3改変体をコードするDNA断片（配列番号81、83）を人工合成し、実施例1と同様の方法で国際公開第2012/081628号記載の手法により作製した組換え体ベクターに挿入し、該ベクターをCHO細胞にエレクトロポレーションにより導入した。培養、薬剤選抜は一般的な方法で行い、生細胞の割合が9

50

8%程度に回復したものを安定発現株とした。この安定発現株をEX-CELL 325 PF CHO Serum-Free Medium (Sigma-Aldrich社)等の培地で一定期間培養後、培養上清を回収し、実施例1に記載の方法で各DcR3改変体を精製した。

【0270】

5~6週齢のBALB/cマウス( )にS195-Fc及び各DcR3改変体10mg/kgを単回i.v.投与し(n=2又は3)、投与後任意の時間に尾静脈から採血し、血中のS195-Fc及び各DcR3改変体の濃度を以下の方法で測定した。ストレプトアビジン固相化ビーズにビオチン化標識したサル抗ヒトIgGポリクローナル抗体を反応させ、結合した血清中のS195-Fc及び各DcR3改変体をAlexa Fluor 647標識サル抗ヒトIgGポリクローナル抗体により検出した。測定は、Gyrolab xP workstation (Gyros AB社)を用いて実施し、各動態パラメーターはモーメント解析法により算出した。検量線を作成するための標準物質は動物に投与した被験物質と同一のものを使用した。S2細胞で産生したS195-Fcと、CHO-S細胞で産生したキメラA-Fc (IEGRMD g1S)の血中濃度の推移を図7に、また、表7に示すS195-Fc及び各DcR3改変体について、単回投与後の消失相の血中半減期(h)及び無限時間までの血中濃度-時間曲線下面積(area under the concentration-time curve)であるAUC0-(µg\*h/mL)を表8に、それぞれ示す。

10

【0271】

20

【表8】

表8

		Fc	宿主細胞	血中半減期 (h)	AUC0-∞ (µg*h/mL)
野生型DcR3 コントロール	S195-Fc	IEGRMD g1S	S2	84.1	354
DcR3改変体	キメラA-Fc	IEGRMD g1S	CHO-S	87.9	7140
	キメラA-Fc	g4PEK	CHO-S	114	5680
	キメラA-Fc	g4PEK	CHO	89.5	4530
	103-123OPG-Fc	g4PEK	CHO	79.3	2400
	T133A/S146A-Fc	g4PEK	CHO-S	114	5810

30

【0272】

野生型DcR3コントロールであるS195-Fcと比較すると、DcR3改変体の血中濃度推移は大幅に改善していた(図7)。半減期はほぼ同等であったが、AUC0-は10倍以上に改善していた(表8)。

【0273】

CD-1マウスに野生型DcR3及びFLINT(R218Q変異)を0.5mg/kg単回でi.v.投与した際の血中半減期は、それぞれ1.2時間及び3.1時間、また、AUC0-(µg\*h/mL)は、それぞれ0.48及び0.36と報告されている(Drug Metabolism and Disposition, 2003.31:p.502-507.)。線形を仮定して用量比で乗じた濃度推移を比較すると、DcR3改変体は野生型DcR3及びFLINTに対して高い暴露を示した。

40

【0274】

[実施例7] DcR3リガンドへの結合活性評価

(1) DcR3リガンドの作製

ヒト、カニクイザル、又はマウスのDcR3リガンド(LIGHT、TL1A、FasL)の可溶性組換え体を作製した(アミノ酸配列:配列番号114、116、118、120、122、124、126、128、130、DNAの塩基配列:配列番号113、115、117、119、121、123、125、127、129)。

50

## 【0275】

ヒト、カニクイザル、又はマウスの可溶性組換えLIGHTは、N末端にHisタグ(His10)とGSリンカー(GGGSGGGSGGGSEGR)を付加し、その下流にLIGHTの細胞外領域(ヒトLIGHT: Asp74 - Val240(配列番号132)、カニクイザルLIGHT: Asp74 - Val240(配列番号134)、マウスLIGHT: Asp72 - Val239(配列番号136))を連結した配列を用いた。

## 【0276】

ヒト、カニクイザル、又はマウスの可溶性組換えTL1Aは、N末端にHisタグ(His6)とGSリンカー(GGGSGGGSGGGSS)を付加し、その下流にTL1Aの細胞外領域(ヒトTL1A: Leu72 - Leu251(配列番号138)、カニクイザルTL1A: Leu72 - Leu251(配列番号140)、マウスTL1A: Ile94 - Leu270(配列番号142))を連結した配列を用いた。

10

## 【0277】

ヒト、カニクイザル、又はマウスの可溶性組換えFasLは、N末端にHisタグ(His6)を付加し、その下流にFasLの細胞外領域(ヒトFasL: Pro134 - Leu281(配列番号144)、カニクイザルFasL: Pro133 - Leu280(配列番号146)、マウスFasL: Pro132 - Leu279(配列番号148))を連結した配列を用いた。

## 【0278】

シグナルペプチド配列のDNA断片及びタグを付加した可溶性DcR3リガンドのDNA配列を人工合成(GENEWIZ社)し、In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech社)を用いて、pCI-Hygro2.01ベクター(Promega社pCIを一部改変)のCMVプロモーター下流に挿入し、大腸菌DH5コンピテントセル(TOYOBO社)を形質転換した。

20

## 【0279】

得られたプラスミドを、Expi293細胞(Thermo Scientific社)に導入し、一過性にタンパク質を発現させた。ExpiFectamine 293(Thermo Scientific社)を用いてプラスミドを導入し、3日間培養後、培養上清を回収した。

## 【0280】

ヒトFasL及びカニクイザルFasLは、Freestyle CHO-S細胞(Thermo Scientific社)の宿主細胞に導入し、一過性にタンパク質を発現させた。Freestyle MAX Reagent(Thermo Scientific社)を用いてプラスミドを導入し、3日間培養後、培養上清を回収した。

30

## 【0281】

Expi293細胞の培養上清からのタンパク質精製は、Ni Sepharose Fast Flowレジン及びHis Buffer Kit(いずれもGEヘルスケア社)を用いて行った。培養上清をレジンの充填されたカラムに通液し、洗浄用緩衝液(60 mmol/L イミダゾール, 20 mmol/L リン酸ナトリウム, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4)で洗浄後、溶出用緩衝液(250 mmol/L イミダゾール, 20 mmol/L リン酸ナトリウム, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4)で溶出した。

40

## 【0282】

Freestyle CHO-S細胞の培養上清からのタンパク質精製は、Complete His-Tag Purification Resin(Roche社)及びHis Buffer Kit(GEヘルスケア社)を用いて行った。培養上清をレジンの充填されたカラムに通液し、洗浄用緩衝液(2 mmol/L イミダゾール, 20 mmol/L リン酸ナトリウム, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4)で洗浄後、溶出用緩衝液(250 mmol/L イミダゾール, 20 mmol/L リン酸ナトリウム, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4)で溶出した。

50

## 【0283】

それぞれの溶出画分を、NAPカラム（GEヘルスケア社）を用いてPBSに置換し、 $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターを通し滅菌した。得られた精製タンパク質は、SDS-PAGEにより純度を確認した。SEC-UPLC（装置：ACQUITY UPLC、カラム；ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200,  $1.7\ \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 150\text{mm}$ ）（Waters社）により、多量体形成を解析したところ、ほぼ全てのリコンビナント可溶性DcR3リガンドで三量体に相当する分子量のピークが確認されたが、マウスLIGHTのみは、三量体のピークは検出されず、単量体であった。

## 【0284】

## (2) BIAcoreを用いた結合活性測定

表9に示した各種野生型DcR3コントロール及びDcR3改変体について、DcR3リガンド（LIGHT、TL1A、FasL）に対する結合活性を、BIAcore T-100（GEヘルスケア社）を用いてSPR法により解析した。緩衝液にはHBS-E P+Bufferを用いた。

## 【0285】

Series S Sensor Chip CM5にHuman Antibody Capture Kit（GEヘルスケア社）を用いて抗ヒト抗体を10000RU固相化した後、各種野生型DcR3及びDcR3改変体を $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ で30秒間流し、キャプチャーさせた。一方、リファレンス用フローセルにはタンパク質を含まない緩衝液を流した。その後、アナライトとして、 $0.08 - 80\ \text{nmol}/\text{L}$ に希釈したヒト、カニクイザル、又はマウスのDcR3リガンドを $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ で2分間流して結合をモニターし、続いて緩衝液を3分間流して解離をモニターした。次いで、 $3\ \text{mol}/\text{L}$ 塩化マグネシウムを $20\ \mu\text{L}/\text{分}$ で1分間流し、再生反応を行った。BIAcore T-100 evaluation software、1:1 Binding modelを用い、各DcR3リガンドは単量体として（ヒトLIGHT単量体： $20.8\ \text{kDa}$ 、ヒトTL1A単量体： $22.1\ \text{kDa}$ 、ヒトFasL単量体： $17.7\ \text{kDa}$ 、カニクイザルLIGHT単量体： $20.8\ \text{kDa}$ 、カニクイザルTL1A単量体： $22.0\ \text{kDa}$ 、カニクイザルFasL単量体： $17.7\ \text{kDa}$ 、マウスLIGHT単量体： $20.9\ \text{kDa}$ 、マウスTL1A単量体： $21.5\ \text{kDa}$ 、マウスFasL単量体： $17.7\ \text{kDa}$ ）、各速度論定数（ $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$ ）を算出した（表10-12）。測定の結果、三量体を作製できなかったマウスLIGHTを除き、各種野生型DcR3及びDcR3改変体が、ヒト、カニクイザル、マウスの各DcR3リガンドに結合することを確認した。

## 【0286】

## 【表9】

表9

		リンカー	Fc	宿主細胞
1	DcR3 FL-Fc (R&D社)	IEGRMD	IgG1	Sf9
2	S195-Fc	IEGRMD	g1S	S2
3	キメラA-Fc	IEGRMD	g1S	CHO-S
4	キメラA-Fc	なし	g4PEK	Exp i 293
5	103-123OPG-Fc	なし	g4PEK	Exp i 293
6	T133A/S146A-Fc	なし	g4PEK	Exp i 293
7	N131S/N144S-Fc	なし	g4PEK	Exp i 293

## 【0287】

10

20

30

40

50

## 【表 1 0】

表 1 0

LIGHTに対する結合親和性									
	ヒトLIGHT			カニクイザルLIGHT			マウスLIGHT		
	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)
1	3.8	4.0	1.1	3.1	3.8	1.2	N.D.	N.D.	N.D.
2	2.8	6.1	2.2	3.4	5.9	1.7	N.D.	N.D.	N.D.
3	3.9	2.5	0.63	5.4	2.4	0.44	N.D.	N.D.	N.D.
4	5.4	3.3	0.62	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
5	4.5	3.0	0.66	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
6	3.8	3.1	0.83	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
7	3.8	3.3	0.87	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

N. D. : 未検出、N. T. : 未実施

## 【0288】

【表 1 1】

表 1 1

TL1Aに対する結合親和性									
	ヒトTL1A			カニクイザルTL1A			マウスTL1A		
	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)
1	3.9	3.5	0.89	3.8	3.5	0.92	8.4	4.9	0.58
2	8.4	9.1	1.1	7.9	8.8	1.1	17	20	1.2
3	8.3	3.0	0.36	7.6	2.9	0.38	31	23	0.73
4	8.7	3.6	0.42	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
5	7.1	3.3	0.47	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
6	6.3	3.3	0.53	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
7	6.1	3.1	0.51	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

N. T. : 未実施

## 【0289】

10

20

30

40

50

## 【表 1 2】

表 1 2

F a s Lに対する結合親和性									
	ヒトF a s L			カニクイザルF a s L			マウスF a s L		
	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)	$k_a$ (1/Ms) 1xE+05	$k_d$ (1/s) 1xE-04	$K_D$ (nM)
1	3. 1	4. 0	1. 3	3. 0	3. 3	1. 1	1. 5	97	65
2	8. 6	15	1. 7	7. 5	8. 4	1. 1	5. 8	56	96
3	10	7. 8	0. 76	8. 4	4. 0	0. 47	12	587	47
4	10	10	1. 0	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
5	8. 5	12	1. 4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
6	5. 6	13	2. 3	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
7	5. 7	15	2. 5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

N. T. : 未実施

## 【0290】

[実施例8] OPGリガンド(RANKL、TRAIL)への結合活性評価

RANKLはRANKに結合し骨吸収に、TRAILはTRAIL受容体に結合し細胞死に関与することが知られている。作製した各種ヒトDcR3組換え体を用いて、RANKL及びTRAILに対する結合活性をELISAにより解析した。OPGリガンドに結合する陽性対照として、実施例5で作製したOPGのC末端領域欠損体K194-Fc、RANK-Fc(Enzo Life Science社)、TRAIL R1-Fc(R&D systems社)を用いた。陰性対照として抗DNP抗体(IgG1)[Clin. Cancer Res., 2005, 11(8), p. 3126-3135記載の抗2,4-dinitrophenol(DNP)抗体の可変領域をIgG1のFcをコードするベクターに挿入し、CHO細胞に導入して発現させ、ProteinA精製した抗体を用いた。

## 【0291】

96ウェルプレート(MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE、Thermo Scientific社)に、PBSで10µg/mLに調製した抗ヒトIgG1(American Qualex社)を50µL/ウェルずつ分注し、4にて一晩静置して吸着させた。固相化液を取り除いた後、1gのBlock Ace粉末(DSファーマバイオメディカル社)を100mLの水に溶解して作製した1% Block Aceを100µL/ウェルずつ分注し、室温で1時間静置してブロッキングし、0.1% Tweenを含むPBS(以下、PBSTと記す)で3回洗浄した。次に、プレートNo. 1には1% BSA-PBSで1µg/mLになるように希釈した各種ヒトDcR3組換え体又は各種DcR3改変体とRANK-Fcを、プレートNo. 2には1% BSA-PBSで1µg/mLになるように希釈した各種野生型DcR3又は各種DcR3改変体とTRAIL R1-Fcを50µL/ウェルずつ分注し、室温で1時間静置した。

## 【0292】

各プレートをPBSTで3回洗浄した後、プレートNo. 1には1% BSA-PBSで0.64-50000pg/mLに希釈したRANKL(Peprotech社)を、プレートNo. 2には1% BSA-PBSで0.64-50000pg/mLに希釈したTRAIL(Peprotech社)を50µL/ウェルずつ分注し、室温で1時間静置した。

## 【0293】

プレートにPBSTで3回洗浄した後、プレートNo. 1には1% BSA-PBSで0.4 µg/mLに希釈したビオチン化抗RANKL抗体 (Peprtech社) を、プレートNo. 2には1% BSA-PBSで0.4 µg/mLに希釈したビオチン化抗TRAIL抗体 (R&D社) を50 µL/ウェルずつ分注し、室温で1時間静置した。

【0294】

各プレートをPBSTで3回洗浄した後、0.1% Block Aceで1万倍に希釈したストレプトアビジン-HRP (PIERCE社) を50 µL/ウェルずつ分注し、室温で1時間静置した。

【0295】

各プレートをPBSTで3回洗浄した後、TMB+Substrate Chromogen (Dako社) を50 µL/ウェルずつ分注し、室温で1分間静置した。0.5 mol/L 硫酸溶液を50 µL/ウェルずつ分注して発色反応を止め、サンプル波長450 nm、リファレンス波長570 nmにおける吸光度を、プレートリーダーを用いて測定した。

10

【0296】

その結果、K194-FcはOPGリガンドであるRANKL及びTRAILに結合し、RANK-Fc、TRAIL R1-FcはそれぞれRANKL及びTRAILへの結合を示したが、DcR3 FL-Fc (R&D社)、S195-Fc、キメラA-Fc (IEGRMD g1S) 及びキメラB-Fc (IEGRMD g1S) はいずれのリガンドにも結合しなかった (図8)。実施例7の結果と併せて、DcR3のCRDの一部をOPGのCRDの一部と置換して作製したDcR3改変体は、DcR3のリガンドには野生型DcR3と同等の結合活性を示すが、OPGのリガンドには結合しないことが確認された。

20

【0297】

[実施例9] DcR3リガンド中和活性測定

以下に示した方法により、各種野生型DcR3コントロール及びDcR3改変体のLIGHT、TL1A、FasLに対する中和活性を測定した。DNP抗体は実施例5及び8に記載の方法で作製した。

【0298】

(1) LIGHT中和活性測定

ヒト大腸癌細胞HT-29細胞株 (ATCC番号: HTB-38) を用い、LIGHT添加によるIL-8産生を指標に、各種野生型DcR3及び各種DcR3改変体の中和活性を測定した。細胞培養及び中和活性評価には、10% FBS (Gibco社) 及びペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク社) を添加したMcCoy's 5A培地 (Gibco社) を用いた。

30

【0299】

HT-29細胞株を、96ウェル接着培養プレート (住友ベークライト社) に $2 \times 10^4$  cells/wellで播種した後、終濃度0.1、1、又は10 µg/mLとなるように各種野生型DcR3又は各種DcR3改変体を添加した。その後、終濃度0.1 µg/mLとなるように、N末端にFLAGタグ (DYKDDDDK) を付加したヒトLIGHT (Gly66-Val240) (JP2013153749記載) を添加し、培養液の総量が200 µL/wellとなるように調製した。5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で、37 °Cにて3日間培養した後、培養上清を回収し、AlphaLISA IL-8 Immunoassay Research Kit (Perkin Elmer社) を用いて、培養上清中のIL-8濃度を測定した。

40

【0300】

測定の結果、各種ヒトDcR3改変体では濃度依存的にIL-8産生量が低下し、LIGHT中和活性を示すことが確認された (図9)。

【0301】

(2) TL1A中和活性測定

ヒトT細胞を用い、TL1A添加によるIFN-γ産生を指標に、各種野生型DcR3

50

及び各種DcR3改変体の中和活性を測定した。細胞培養及び中和活性評価にはX-VIVO15培地(Lonza社)を用いた。

【0302】

凍結健常人PBMC(AllCells社)を37℃の水浴で融解し、37℃に温めたDNaseI(STEMCELL社)を含む培地に懸濁した。37℃にて2時間、低速で振盪させた後、EasySep Human T cell Enrichment Kit(STEMCELL社)を使用してT細胞を単離した。単離したT細胞を、96ウェル浮遊培養プレート(住友ベークライト社)に $1 \times 10^5$  cells/wellで播種した後、終濃度0.1、1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように各種野生型DcR3コントロール又は各種DcR3改変体を添加した。その後、終濃度0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように実施例6  
10  
で作製した、組み換えHis10ヒトTL1Aを添加した。終濃度2 ng/mLのHuman IL-12(Miltenyiバイオテック社)、終濃度50 ng/mLのRecombinant Human IL-18(MBL社)を添加し、培養液の総量が200  $\mu\text{L}/\text{well}$ となるように調製した。5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で、37℃にて3日間培養した後、培養上清を回収し、AlphaLISA IFN- $\gamma$  Immunoassay Research Kit(Perkin Elmer社)を用いて、培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度を測定した。

【0303】

測定の結果、各種DcR3改変体では濃度依存的にIFN- $\gamma$ 産生量が低下し、TL1A中和活性を示すことが確認された(図10)。  
20

【0304】

(3) FasL中和活性測定

T細胞白血病Jurkat細胞株(DSMZ番号:ACC 282)を用い、FasL添加によるアポトーシスを指標に、各種野生型DcR3コントロール及び各種DcR3改変体の中和活性を測定した。細胞培養及び中和活性評価には、10% FBS及びペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI 1640培地(ナカライテスク社)を用いた。

【0305】

Jurkat細胞株を、96ウェル浮遊培養プレートに $5 \times 10^4$  cells/wellで播種した後、終濃度0.01、0.1、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各濃度になるように各種野生型DcR3又はDcR3改変体を添加した。その後、終濃度0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように組み換えヒトHis6 Fas Ligand(CSTジャパン社)を添加し、培養液の総量が100  $\mu\text{L}/\text{well}$ となるように調製した。5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で、37℃にて一晩培養した後、CellTiter-Glo(Promega社)を100  $\mu\text{L}/\text{well}$ でJurkat培養プレートに添加し、ルミノメーター(Veritas、Promega社)を用いて、ATP産生量を指標とした生細胞数を測定した。  
30

【0306】

測定の結果、各種DcR3改変体では濃度依存的に生細胞由来のATP産生量が増加し、FasL中和活性を示すことが確認された(図11)。

【0307】

[実施例10] FasL結合性低下改変体のリガンド中和活性及び結合活性  
40

キメラA-Fc(g4PEK)を基に、DcR3リガンドのうち、TL1A及びLIGHTに対する結合及び中和活性は有するが、FasLに対する結合及び中和活性が低下する1アミノ酸置換体の作製及び評価を行った。表13に示すCRD2、CRD3の任意のアミノ酸をAla、又はAla以外のアミノ酸に置換した改変体を作製し、実施例9と同様の手法で、DcR3リガンドに対する中和活性を測定した。その結果、キメラA-Fc(g4PEK)のN末端から57番目のGluをLysあるいはLeuに置換したキメラA-E57K-Fc(g4PEK)(アミノ酸配列:配列番号94、DNAの塩基配列:配列番号93)、キメラA-E57L-Fc(g4PEK)(アミノ酸配列:配列番号96、DNAの塩基配列:配列番号95)、及び、60番目のArgをLysに置換したキメラA-R60K-Fc(g4PEK)(アミノ酸配列:配列番号98、DNAの塩基配  
50

列：配列番号97)の1アミノ酸置換体では、F a s L 選択的に中和活性が低下していた(表13)。

【0308】

F a s L 選択的に中和活性の低下したキメラA - E 5 7 K - F c ( g 4 P E K ) (配列番号94)、キメラA - E 5 7 L - F c ( g 4 P E K ) (配列番号96)、キメラA - R 6 0 K - F c ( g 4 P E K ) (配列番号98)の改変体について、実施例7と同様の手法で、D c R 3 リガンドに対する結合活性を測定した。その結果、キメラA - E 5 7 K - F c ( g 4 P E K )、キメラA - E 5 7 L - F c ( g 4 P E K ) 及びキメラA - R 6 0 K - F c ( g 4 P E K ) の改変体で、いずれもF a s L のみ顕著に結合が低下し、T L 1 A 及びL I G H T との結合は維持されていた(図12A、B、C)。

10

【0309】

【表13】

表13

FasL結合性低下改変体の中和活性

キメラA		hLIGHT	hTL1A	hFasL	
キメラA		+++	+++	+++	
FasL改変体	P45 A	++	++	++	
	P46 A	+++	+++	+++	
	R47 A	++	++	+++	
	H48	A	-	+	-
		K	-	+	-
		Y	+	+	++
	Y49 A	-	++	-	
	T50 A	+	++	++	
	Q51 A	+++	+++	+++	
	F52	A	-	-	+
		K	+	-	-
		Y	+++	+++	+++
	W53 A	+	+	+	
	N54 A※	-	-	-	
	Y55	A	-	+	++
		F	++	+++	++
		K	-	++	+
	L	+	++	++	
		L56 A	+	+++	++
		E57	A	+++	+++
	D		+++	+++	+++
	K		+++	+++	+
	L		+++	+++	+
	R58 A	+++	+++	+++	
	R60	A	-	-	-
		K	-	++	-
		D	-	-	-
		L	+++	+++	+++
		W	+	+	++
	Y61	A	-	-	-
F		++	+++	++	
K		-	-	-	
L		+	-	-	

FasL改変体		hLIGHT	hTL1A	hFasL
N63	A	++	+	+
	Q	+	++	++
	K	-	-	+
	D	-	-	-
	L	-	+	+
	M	+	+	+
V64	A	+	+	++
	D	-	-	-
L65 A	+	++	+++	
G67 A	+++	+++	+++	
E68 A	++	+++	+++	
R69	A	+++	+++	+++
	W	+++	+++	+++
K	+++	+++	+++	
	E70	A	+	++
D	-	++	+	
	E71	A	+	+
D	++	+++	+++	
	F90 A	+	+	+
F91 A	+	+	+	
A92 S	+++	+++	+++	
H93 A	++	+++	+++	
H94 S	+++	+++	+++	
G95	A	+	++	++
	L	+	+++	+
F96	A	+	++	+
	S	-	++	+
	L	++	++	++
	Y	+	+++	++
M	+++	+++	++	
	L98	A	+	++
S	+	++	++	
	F	+	+++	+++
	M	++	+++	+++
E99 A	+++	+++	+++	
H100 A	+++	+++	+++	
A101 S	+++	+++	+++	

20

30

40

※：凝集

- +++ リガンドの10倍の質量濃度(μg/mL)を添加すれば完全に中和
- ++ リガンドの100倍の質量濃度(μg/mL)を添加すれば完全に中和
- +
- リガンドの100倍の質量濃度(μg/mL)を添加しても完全に中和しない
- 中和活性なし

【0310】

[実施例11] 哺乳動物細胞における市販野生型D c R 3 の凝集性評価

実施例1と同様の方法で、H E K 2 9 3 細胞を宿主細胞として作製された市販品の全長D c R 3 - F c (アプカム社)、C H O 細胞を宿主細胞として作製された市販品の全長D

50

c R 3 - F c ( A d i p o G e n 社 )、 H E K 2 9 3 細胞を宿主細胞として作製された市販品の H B D の C 末端側 約半分が欠損した D c R 3 分子の F c 融合体 ( E n z o 社 ) について、還元及び非還元条件下において電気泳動した。還元条件下の泳動度から予想される単量体の分子量は、およそ 5 0 k D a から 6 0 k D a であったが、非還元条件下における泳動度は予想される二量体分子量よりも大幅に大きく、いずれの市販品もそのほとんどが凝集体として存在していた ( 図 1 3 )。

【 0 3 1 1 】

[ 実施例 1 2 ] F a s L 結合性低下改変体の作製

D c R 3 リガンドのうち、 T L 1 A 及び L I G H T には結合し、 F a s L 選択的に結合性が低下している改変体を選抜するために、キメラ A - F c ( g 4 P E K ) ( 配列番号 8 2 ) の N 末端から 5 7 番目の G l u ( E 5 7 ) を G l u 以外のアミノ酸に置換した 1 アミノ酸置換体 ( E 5 7 X ; X は G l u 以外の任意のアミノ酸 ) を作製した。また、 E 5 7 を L y s、 L e u、 A r g、 V a l のいずれかに置換した E 5 7 K、 E 5 7 L、 E 5 7 R、 E 5 7 V については、近傍のアミノ酸である、キメラ A - F c ( g 4 P E K ) ( 配列番号 8 2 ) の N 末端から 5 3 番目の T r p ( W 5 3 )、 5 4 番目の A s n ( N 5 4 )、 5 5 番目の T y r ( Y 5 5 )、 5 6 番目の L e u ( L 5 6 )、 5 8 番目の A r g ( R 5 8 )、 のいずれかを更に特定の アミノ酸 Z ( Z は A s p、 G l u、 A s n、 G l n、 P r o、 T h r、 G l y のいずれか ) に置換した 2 アミノ酸置換体 ( E 5 7 X \_ W 5 3 Z、 E 5 7 X \_ N 5 4 Z、 E 5 7 X \_ Y 5 5 Z、 E 5 7 X \_ L 5 6 Z、 E 5 7 X \_ R 5 8 Z ; 各 2 アミノ酸置換体には図 1 4 A で示す改変体番号を付与 ) と F c ( g 4 P E K ) との融合体を作製した。

【 0 3 1 2 】

これらのうち、キメラ A - E 5 7 K ( アミノ酸配列 : 配列番号 6 6、 D N A の塩基配列 : 配列番号 6 5 )、キメラ A - E 5 7 R ( アミノ酸配列 : 配列番号 1 8 0、 D N A の塩基配列 : 配列番号 1 7 9 )、キメラ A - E 5 7 V ( アミノ酸配列 : 配列番号 1 8 2、 D N A の塩基配列 : 配列番号 1 8 1 )、キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 D ( 改変体番号 : 4 5 - 1 0、アミノ酸配列 : 配列番号 1 8 4、 D N A の塩基配列 : 配列番号 1 8 3 )、キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E ( 改変体番号 : 4 5 - 1 8、アミノ酸配列 : 配列番号 1 8 6、 D N A の塩基配列 : 配列番号 1 8 5 ) 及びキメラ A については、表 1 4 に示す各種変異導入 F c 配列の一部との融合体を作製した ( 塩基配列 : 配列番号 2 1 3、 2 1 7、 2 1 9、 2 2 1、 2 2 3、 2 2 7、 2 3 1、 2 3 3、 2 3 5、 2 3 7、 2 5 5、 2 5 9、 2 6 1、 2 6 3、 2 6 5、 1 4 9、 1 6 7、 1 6 9、 1 7 1、 1 7 3、 1 7 5、 1 7 7、 アミノ酸配列 : 配列番号 2 1 4、 2 1 8、 2 2 0、 2 2 2、 2 2 4、 2 2 8、 2 3 2、 2 3 4、 2 3 6、 2 3 8、 2 5 6、 2 6 0、 2 6 2、 2 6 4、 2 6 6、 3 1 7、 3 1 9、 3 2 0、 3 2 1、 3 2 2、 3 2 4、 3 2 6、 3 2 7、 3 2 8、 3 2 9、 3 3 1、 3 3 3、 3 3 4、 3 3 5、 3 3 6、 1 5 0、 1 6 8、 1 7 0、 1 7 2、 1 7 4、 1 7 6、 1 7 8 )。表 1 4 において、 E 2 1 6 は E U インデックスで示されるヒト I g G 1 重鎖の 2 1 6 番目の G l u を示す。変異導入部位の C 2 2 0 S、 M 2 5 2 Y、 S 2 5 4 T、 T 2 5 6 E、 N 4 3 4 A、 L 2 3 4 A、 L 2 3 5 A、 G 2 3 7 A はそれぞれ、 E U インデックスで示されるヒト I g G 1 重鎖の 2 2 0 番目の C y s を S e r に、 2 5 2 番目の M e t を T y r に、 2 5 4 番目の S e r を T h r に、 2 5 6 番目の T h r を G l u に、 4 3 4 番目の A s n を A l a に、 2 3 4 番目の L e u を A l a に、 2 3 5 番目の L e u を A l a に、 2 3 7 番目の G l y を A l a に置換したことを示す。

【 0 3 1 3 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 4】

表 1 4

F c 名称	E 2 1 6	変異導入部位	配列番号
E g 1 S	含む	C 2 2 0 S	1 5 6
E g 1 S Y T E	含む	C 2 2 0 S、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、 T 2 5 6 E	1 5 8
E g 1 S N 4 3 4 A	含む	C 2 2 0 S、N 4 3 4 A	1 6 0
E g 1 S L A L A G A N A	含む	C 2 2 0 S、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、 G 2 3 7 A、N 4 3 4 A	1 6 6
E g 1 S L A L A G A	含む	C 2 2 0 S、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、 G 2 3 7 A	1 6 4
g 1 S	含まない	C 2 2 0 S	7 2
g 1 S Y T E	含まない	C 2 2 0 S、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、 T 2 5 6 E	3 1 1
g 1 S N 4 3 4 A	含まない	C 2 2 0 S、N 4 3 4 A	3 1 2
g 1 S L A L A G A N A	含まない	C 2 2 0 S、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、 G 2 3 7 A、N 4 3 4 A	3 1 3
g 1 S L A L A G A	含まない	C 2 2 0 S、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、 G 2 3 7 A	1 6 2

10

## 【 0 3 1 4】

キメラ A - F c ( g 1 S ) ( 塩基配列：配列番号 1 4 9、アミノ酸配列：配列番号 1 5 0 ) は、実施例 2 で作製した、リンカー配列 I E G R M D ( 配列番号 1 0 6 ) を含むキメラ A - F c ( I E G R M D g 1 S ) ( 配列番号 8 0 ) から I E G R M D 配列を削除したものを、実施例 6 に記載した方法で CHO 細胞の安定発現により作製した。キメラ A - F c ( E g 1 S ) ( 塩基配列：配列番号 1 6 7、アミノ酸配列：配列番号 1 6 8 ) は、キメラ A ( 配列番号 5 4 ) と E g 1 S とを連結した配列を、実施例 6 に記載した方法で CHO 細胞の安定発現により作製した。

20

## 【 0 3 1 5】

キメラ A - F c ( E g 1 S Y T E、E g 1 S N 4 3 4 A、E g 1 S L A L A G A、E g 1 S L A L A G A N A ) ( 塩基配列：配列番号 1 6 9、1 7 1、1 7 5、1 7 7、アミノ酸配列：配列番号 1 7 0、1 7 2、1 7 6、1 7 8 ) は、キメラ A ( 配列番号 5 4 ) の C 末端に各 F c をそれぞれ融合させた配列を、CHO - S 細胞の一過性発現により取得した。

## 【 0 3 1 6】

キメラ A - F c ( g 1 S Y T E、g 1 S N 4 3 4 A、g 1 S L A L A G A、g 1 S L A L A G A N A ) ( アミノ酸配列：配列番号 3 1 4、3 1 5、1 7 4、3 1 6 ) は、キメラ A ( 配列番号 5 4 ) の C 末端に各 F c をそれぞれ融合させた配列を、E x p i 2 9 3 細胞の一過性発現により取得した。

30

## 【 0 3 1 7】

各アミノ酸置換体と F c ( g 4 P E K ) との融合体を発現するプラスミドは、キメラ A - F c ( g 4 P E K ) 又は E 5 7 X - F c ( g 4 P E K ; X は K、R 又は V ) のいずれかの DNA 配列を鋳型とし、変異箇所を含むよう設計した PCR プライマーを用いて、N h e I サイトからアミノ酸置換を導入した部位まで、及び、アミノ酸置換を導入した部位から S a l I サイトまでの 2 領域をそれぞれ PCR 増幅したものを、実施例 1 と同様の方法で p C I p u r o ベクターの C M V プロモーター下に挿入して作製した。

40

## 【 0 3 1 8】

各アミノ酸置換体と E g 1 S Y T E、E g 1 S N 4 3 4 A、又は E g 1 S L A L A G A N A の各 F c との融合体は、それぞれの変異 F c 配列を有するキメラ A - F c のいずれかの DNA 配列を鋳型とし、変異箇所を含むよう設計した PCR プライマーを用いて、E c o R I サイトからアミノ酸置換を導入した部位まで、及び、アミノ酸置換を導入した部位から B s u 3 6 I サイトまでの 2 領域をそれぞれ PCR 増幅したものを、鋳型としたキメラ A - 各種変異 F c ベクターの E c o R I と B s u 3 6 I サイトに挿入してプラスミドを作製した。

## 【 0 3 1 9】

50

各アミノ酸置換体とg1SYTE、g1SN434A、又はg1SLALAGANAの各Fcとの融合体は、上述の各アミノ酸置換体-FcのいずれかのDNA配列を鋳型とし、E216を除くよう設計したPCRプライマーを用いて、EcoRIサイトから削除するGluの部位まで、及び、削除するGluの部位からBsu36Iサイトまでの2領域をそれぞれPCR増幅したものを、鋳型とした各アミノ酸置換体-FcベクターのEcoRIとBsu36Iサイトに挿入してプラスミドを作製した。

#### 【0320】

Expi293細胞に各プラスミドを導入し一過性発現させ、培養上清からMabSelect Sureによるアフィニティ精製を実施した。作製したキメラA-Fc、各1又は2アミノ酸置換体-Fcの単量体、凝集体、分解物の各含有率は、実施例2と同様の方法でSEC-UPLC(ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 4.6mm×150mm)(Waters社)又はSEC-HPLC(TSKgel SuperSW3000 4.0µm、4.6mm×300mm)(東ソー社)により分析したピーク面積から算出した。

10

#### 【0321】

その結果、作製した各種変異Fcを有するキメラA-Fc、1及び2アミノ酸置換体-Fcの多くはS195-Fcよりも低い凝集体含有率を維持していた(図14A、B、C)。

#### 【0322】

[実施例13] DcR3可溶性三量体リガンドへの結合活性評価

20

DcR3-Fc、S195-Fc、Fc配列の異なる各種キメラA-Fc及び実施例12で作製した各種FasL結合性低下改変体について、可溶性ヒトLIGHT三量体、可溶性ヒトTL1A三量体、及び可溶性ヒトFasL三量体に対する結合活性評価を、実施例7に記載した方法を一部変更して実施した。

#### 【0323】

(1) DcR3可溶性三量体リガンドの作製

ヒトの可溶性組換えLIGHTは、N末端にFLAGタグ(DYKDDDDK)を付加し、その下流にLIGHTの細胞外領域(Asp74-Val240)(配列番号132)を連結した配列(FLAG-LIGHT)を用いた(塩基配列:配列番号305、アミノ酸配列:配列番号306)。ヒトの可溶性組換えTL1Aは、N末端にHisタグ(His6)とGSリンカー(GGGSGGGSGGG)を付加し、その下流にTL1Aの細胞外領域(Leu72-Leu251)(配列番号138)を連結した配列(His6-TL1A)を用いた(塩基配列:配列番号115、アミノ酸配列:配列番号116)。実施例7と同様の方法で各プラスミドを作製し、Expi293細胞による一過性発現を行った。

30

#### 【0324】

FLAG-LIGHTはANTI-FLAG M2 Affinity Gel(Sigma社)を用いて精製した。培養上清をレジンの充填されたカラムに通液し、洗浄用緩衝液(50mM Tris HCl、150mM NaCl、pH 7.4)で洗浄後、溶出液(0.1M 塩酸グリシン、pH 3.5)で溶出した。

40

#### 【0325】

His6-TL1Aの精製は以下の方法で行った。培養上清をComplete His-Tag Purification Resin(Roche社)の充填されたカラムに通液し、洗浄用緩衝液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH8.0、300mM NaCl)で洗浄後、溶出液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH8.0、300mM NaCl、250mM Imidazole)で溶出した。NAPカラム(GEヘルスケア社)を用いてPBSに置換した溶出液をNi Sepharose Fast Flowレジン(GEヘルスケア社)の充填されたカラムに通液し、His Buffer Kit(GEヘルスケア社)を用いて調製した洗浄用緩衝液(60mM イミダゾール、20mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH7.4)で洗浄後、溶出用緩衝液(250mM イミ

50

ダゾール、20 mM リン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、pH 7.4) で溶出した。

【0326】

FLAG-LIGHT及びHis6-TL1Aそれぞれの溶出画分を、NAPカラム(GEヘルスケア社)を用いてPBSに置換し、0.22 μmのフィルターを通し滅菌した。得られた精製タンパク質は、HPLC(島津製作所)を用いたゲルろ過クロマトグラフィー(SEC)(TSK gel G3000 SWXL 7.8 mm x 300 mm)(東ソー社)により、三量体画分を分取した。

【0327】

ヒトの可溶性組換えFasLは、N末端にHisタグ(His6)が付加され、その下流にFasLの細胞外領域(Pro134-Leu281)(配列番号144)が連結されたHuman His6 Fas Ligand/TNFSF6(Cell Signaling TECHNOLOGY社)を用いた。実施例2と同様の方法でSEC-MALSを実施し、三量体であることを確認した。

10

【0328】

(2) BIAcoreを用いた結合活性測定

DcR3-Fc(R&D社)、S195-Fcはいずれも実施例7に記載したものを評価した。キメラA-g4PEK(配列番号82)は実施例6で作製した。キメラA-Fc(g1S、Eg1S)は、実施例12で作製した。各種FasL結合性低下改変体としては、実施例9又は実施例12で作製したFc(g4PEK)融合体を評価した。

【0329】

ヒトDcR3三量体リガンドに対する結合活性は、SPR法により解析した。ヒトLIGHT及びヒトTL1Aに対する結合活性測定にはBIAcore T-100(GEヘルスケア社)を、ヒトFasLに対する結合活性測定にはBIAcore T-100(GEヘルスケア社)又はBIAcore T-200(GEヘルスケア社)をそれぞれ用いた。緩衝液にはHBS-EP+Bufferを用いた。

20

【0330】

Series S Sensor Chip CM5にHuman Antibody Capture Kit(いずれもGEヘルスケア社)を用いて抗ヒト抗体を10000RU固相化した後、各種野生型DcR3及びDcR3改変体を10 μL/分で30秒間流し、キャプチャーさせた。一方、リファレンス用フローセルにはタンパク質を含まない緩衝液を流した。その後、アナライトとして、0.02-80 nmol/Lに希釈した各ヒトDcR3三量体リガンドを30 μL/分で2分間流して結合をモニターし、続いて緩衝液を3分間流して解離をモニターした。次いで、3 mol/L塩化マグネシウムを30 μL/分で1分間流し、再生反応を行った。ヒトLIGHT及びヒトTL1Aに対する結合活性測定にはBIAcore T-100 evaluation software、1:1 Binding modelを用い、リガンドは三量体として(ヒトLIGHT三量体:62.4 kDa、ヒトTL1A三量体:66.2 kDa)、各速度論定数( $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$ )を算出した。ヒトFasLに対する結合活性測定にはBIAcore T-100 evaluation software、1:1 Binding model又はBIAcore T-200 evaluation software、1:1 Binding modelを用い、リガンドは単量体として(ヒトFasL単量体:19.8 kDa)、各速度論定数( $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$ )を算出した。

30

40

【0331】

その結果、キメラA-Fc(g1S)、キメラA-Fc(Eg1S)、キメラA-Fc(g4PEK)はいずれも各DcR3三量体リガンドに結合することを確認した(図15A)。

【0332】

実施例12で作製したFasL結合性低下改変体(g4PEK)のうち、1アミノ酸置換体キメラA-E57K-Fc(g4PEK)(アミノ酸配列:配列番号94、DNAの塩基配列:配列番号93)(以下「E57K-Fc」という場合がある。)、キメラA-

50

E 5 7 L - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 9 6、DNA の塩基配列：配列番号 9 5 ) ( 以下「E 5 7 L - F c」という場合がある。)、キメラ A - E 5 7 R - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 1 9 0、DNA の塩基配列：配列番号 1 8 9 ) ( 以下「E 5 7 R - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 V - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 1 9 2、DNA の塩基配列：配列番号 1 9 1 ) ( 以下「E 5 7 V - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 A - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 2 8 8、DNA の塩基配列：配列番号 2 8 7 ) ( 以下「E 5 7 A - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 F - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 2 9 0、DNA の塩基配列：配列番号 2 8 9 ) ( 以下「E 5 7 F - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 H - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 2 9 2、DNA の塩基配列：配列番号 2 9 1 ) ( 以下「E 5 7 H - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 I - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 2 9 4、DNA の塩基配列：配列番号 2 9 3 ) ( 以下「E 5 7 I - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 M - F c ( g 4 P E K ) ( アミノ酸配列：配列番号 2 9 6、DNA の塩基配列：配列番号 2 9 5 ) ( 以下「E 5 7 M - F c」という場合がある)、及び 2 アミノ酸置換体キメラ A - E 5 7 K\_\_R 5 8 D - F c ( g 4 P E K ) ( 改変体番号：4 5 - 1 0、アミノ酸配列：配列番号 1 9 4、DNA の塩基配列：配列番号 1 9 3 ) ( 以下「4 5 - 1 0 - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 K\_\_R 5 8 T - F c ( g 4 P E K ) ( 改変体番号：4 5 - 1 1、アミノ酸配列：配列番号 2 9 8、DNA の塩基配列：配列番号 2 9 7 ) ( 以下「4 5 - 1 1 - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 K\_\_R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) ( 改変体番号：4 5 - 1 8、アミノ酸配列：配列番号 1 9 6、DNA の塩基配列：配列番号 1 9 5 ) ( 以下「4 5 - 1 8 - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 L\_\_R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) ( 改変体番号：4 6 - 4、アミノ酸配列：配列番号 3 0 0、DNA の塩基配列：配列番号 2 9 9 ) ( 以下「4 6 - 4 - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 R\_\_R 5 8 D - F c ( g 4 P E K ) ( 改変体番号：8 2 - 5、アミノ酸配列：配列番号 1 9 8、DNA の塩基配列：配列番号 1 9 7 ) ( 以下「8 2 - 5 - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 V\_\_R 5 8 T - F c ( g 4 P E K ) ( 改変体番号：8 5 - 6、アミノ酸配列：配列番号 3 0 2、DNA の塩基配列：配列番号 3 0 1 ) ( 以下「8 5 - 6 - F c」という場合がある)、キメラ A - E 5 7 V\_\_R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) ( 改変体番号：8 5 - 8、アミノ酸配列：配列番号 3 0 4、DNA の塩基配列：配列番号 3 0 3 ) ( 以下「8 5 - 8 - F c」という場合がある) は、いずれもキメラ A - F c ( g 4 P E K ) と比較して、L I G H T 三量体及び T L 1 A 三量体に対する  $K_D$  値は 3 倍未満、かつ、F a s L 三量体に対する  $K_D$  値が 3 倍より大きいあるいは R m a x 値が 5 未満に低下しており、F a s L 選択的に結合性が低下していることが確認された ( 図 1 6 A、B )。

### 【0333】

このうち、E 5 7 K - F c、E 5 7 L - F c、E 5 7 R - F c、E 5 7 V - F c、4 5 - 1 0 - F c、4 5 - 1 8 - F c、8 2 - 5 - F c ( いずれも F c は g 4 P E K ) を S E C - H P L C ( カラム；T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L 7 . 8 m m x 3 0 0 m m、東ソー社、H P L C；島津製作所) により単量体 9 5 % 以上に精製し、B I A c o r e 測定に供した際の各速度論定数を図 1 5 B に示した。

### 【0334】

[ 実施例 1 4 ] D c R 3 可溶性リガンドの中和活性評価

各種 D c R 3 改変体の可溶性ヒト L I G H T、可溶性ヒト T L 1 A、及び可溶性ヒト F a s L に対する中和活性評価を、実施例 9 に記載した方法を一部変更して実施した。

### 【0335】

( 1 ) F c 配列の異なる各種キメラ A - F c の作製

キメラ A - F c ( g 1 S、E g 1 S ) は実施例 1 2 で作製したものをを用いた。実施例 1 2 で作製した、キメラ A の C 末端側に表 1 4 で示す E g 1 S Y T E、E g 1 S N 4 3 4 A、E g 1 S L A L A G A 又は E g 1 S L A L A G A N A の各 F c をそれぞれ融合させ

10

20

30

40

50

た各キメラ A - Fc は、いずれも CHO - S 細胞の一過性発現により作製し、AKTApurifier (GEヘルスケア社)を用いたSEC (Superdex 200 Increase 10/300 GL) (GEヘルスケア社)により単量体95%以上に精製したものをを用いた。

#### 【0336】

##### (2) 可溶性ヒトLIGHT中和活性

キメラ A - Fc (g1S、Eg1S、Eg1S YTE、Eg1S N434A、Eg1S LALAGA、Eg1S LALAGANA、g4PEK)については、IFN- 刺激した腸筋線維芽細胞 (Lonza社)からの、LIGHT 依存的CXCL10 産生に対する阻害活性を評価した。腸筋線維芽細胞はSmGM-2 Bullet Kit (Lonza社)培地を用いてコラーゲンコートフラスコ (BD社)で培養した。コラーゲンコート96ウェルプレート (BD社)に $1 \times 10^4$  cells/wellで細胞を播種した後、IFN- の終濃度が10 ng/mL、実施例13で作製した三量体FLAG-LIGHTの終濃度が20 ng/mL、各種DcR3 改変体の各終濃度が19.5、78.1、313、1250、5000、20000 ng/mL、又は、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 ng/mLとなるようそれぞれに添加し、3日間培養した。培養上清を回収し、CXCL10/IP-10 (human) AlphaLISA Detection Kit (Perkin Elmer社)を用いて培養上清中のCXCL10 濃度を測定した。その結果、いずれのFc 配列を有するキメラ A - Fcについても、濃度依存的にCXCL10 産生を阻害し、可溶性LIGHT に対する中和活性を有することが確認された (図17A、B)。

#### 【0337】

FasL 結合性低下改変体E57K - Fc、E57L - Fc、E57R - Fc、E57V - Fc (いずれもFc はg4PEK)については、実施例9と同様の方法で、HT-29 細胞からのLIGHT 依存的IL-8 産生に対する阻害活性を評価した。その結果、いずれの改変体についても、濃度依存的にIL-8 産生を阻害し、可溶性LIGHT に対する中和活性を有することが確認された (図17C)。

#### 【0338】

FasL 結合性低下改変体45-10 - Fc、45-18 - Fc、82-5 - Fc (いずれもFc はg4PEK)については、キメラ A - Fc と同様に、IFN- 刺激腸筋線維芽細胞からのLIGHT 依存的CXCL10 産生に対する阻害活性を、1ウェルあたりの腸筋線維芽細胞数が $2 \times 10^4$ 、被験物質の各終濃度が19.5、78.1、313、1250、5000、20000 ng/mLの条件にて評価した。その結果、いずれの改変体についても、濃度依存的にCXCL10 産生を阻害し、可溶性LIGHT に対する中和活性を有することが確認された (図17D)。

#### 【0339】

##### (3) 可溶性ヒトTL1A 中和活性

実施例9と同様の方法で、IL-12 及びIL-18 刺激ヒトT細胞からの、TL1A 依存的IFN- 産生に対する、各種DcR3 改変体の阻害活性を評価した。その結果、いずれのFc 配列を有するキメラ A - Fc も、濃度依存的にIFN- 産生量を阻害し、可溶性TL1A に対する中和活性を有することが確認された (図18A、B)。更に、FasL 結合性低下改変体E57K - Fc、E57L - Fc、E57R - Fc、E57V - Fc、45-10 - Fc、45-18 - Fc、82-5 - Fc (いずれもFc はg4PEK)についても、同様に可溶性TL1A に対する中和活性を有することが確認された (図18C、D)。

#### 【0340】

##### (4) 可溶性ヒトFasL 中和活性

実施例9と同様の方法で、Jurkat 細胞又はJurkat サブクローンであるA3 細胞のFasL 依存的細胞死に対する、各種DcR3 改変体の阻害活性を評価した。その結果、いずれのFc 配列を有するキメラ A - Fc も、濃度依存的にA3 細胞の細胞死を阻

10

20

30

40

50

害し、可溶性 FasL に対する中和活性を有することが確認された (図 19 A、B)。一方で、FasL 結合性低下改変体 E57K-Fc、E57L-Fc、E57R-Fc、E57V-Fc、45-10-Fc、45-18-Fc、82-5-Fc (いずれも Fc は g4PEK) については、いずれも Jurkat 細胞死に対する阻害活性が著減しており、可溶性 FasL に対する中和活性が選択的に低下していることが確認された (図 19 C、D)。

#### 【0341】

##### [実施例 15] DcR3 膜型リガンドへの結合活性評価

各種 DcR3 改変体の膜型ヒト LIGHT、膜型ヒト TL1A、及び膜型ヒト FasL に対する結合活性を、膜型リガンドの強制発現株を用いたフローサイトメトリーにより評価した。膜型ヒト LIGHT 強制発現 HEK293 細胞は US8974787 に記載のものを用いた。膜型 TL1A 及び膜型 FasL は、それぞれの市販 ORF クローン (Origene 社) を鋳型に、N 末端に Met 残基及び FLAG タグ (DYKDDDDK) を付加して PCR 増幅し (塩基配列: 配列番号 307、309、アミノ酸配列: 配列番号 308、310)、pCIPuro ベクターの CMV プロモーター下流に In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech 社) を用いて挿入し、大腸菌 DH5 コンピテントセル (TOYOBO 社) を形質転換した。

#### 【0342】

得られたプラスミドを、Nucleofector 及び Cell Line Nucleofector Kit T (いずれも Lonza 社) を用いて CHO-K1 細胞 (ECCC) に導入し、10 µg/mL Puromycin (Thermo Fisher Scientific 社) による薬剤選択に供した。得られた薬剤耐性細胞を、DyLight 488 標識抗ヒト TL1A 抗体 (Novus Biologicals 社) あるいは APC 標識抗ヒト FasL 抗体 (BD Pharmingen 社) で染色し、セルソーター (Sony 社) を用いて高発現画分をソーティングした。拡大培養後、PE 標識抗ヒト TL1A 抗体 (Novus Biologicals 社) あるいは PE 標識抗ヒト FasL 抗体 (BioLegend 社) で染色後、再度ソーティングし、膜型ヒト TL1A あるいは膜型ヒト FasL 高発現細胞株を取得した。

#### 【0343】

膜型リガンド強制発現株及び宿主細胞に対する各種 DcR3 改変体の結合活性を、実施例 5 と同様の方法で、以下の条件を変更して評価した。HEK293 及び膜型 LIGHT 強制発現株は、各タンパク質を 1 µg/mL、二次抗体 Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgG R-phycoerythrin Conjugate (Southern Biotech 社) を 10 ng/mL 反応させた。膜型 TL1A 及び膜型 FasL 強制発現株については、各タンパク質を 1 あるいは 10 µg/mL、二次抗体を 0.1 あるいは 1 µg/mL の条件でそれぞれ反応させた。

#### 【0344】

その結果、キメラ A-Fc (g1S、Eg1S、g4PEK) は、いずれも宿主細胞である 293 あるいは CHO-K1 細胞には反応せず、各膜型リガンド強制発現株特異的に反応した。よって、Fc 配列の異なる各種キメラ A はいずれも膜型 DcR3 リガンドに対する結合活性を有することが確認された (図 20 A、B)。更に、FasL 結合性低下改変体 E57K-Fc、E57L-Fc、E57R-Fc、E57V-Fc、45-10-Fc、45-18-Fc、82-5-Fc (いずれも Fc は g4PEK) についてリガンドへの結合活性を同様に評価した結果、膜型ヒト LIGHT 及び膜型ヒト TL1A に対する結合活性は保持している一方、膜型ヒト FasL に対する結合活性は、E57L を除き、著減していることが確認された (図 21 A、B、C)。

#### 【0345】

##### [実施例 16] DcR3 プライマリーリガンドへの結合活性評価

各種 DcR3 改変体の、プライマリー細胞由来の各 DcR3 リガンドに対する結合活性評価を以下の方法で実施した。

10

20

30

40

50

## 【0346】

## (1) プライマリーLIGHT結合活性

活性化したヒトT細胞において膜型LIGHTの発現が誘導されることは知られている(The Journal of Immunology, 2004, 173: p. 502 - 507.)。凍結健常人PBMC(AllCells社)を融解し、終濃度50ng/mLのPMA(Sigma社)及び1µg/mLのIonomycin(Sigma社)で一晩刺激した後、CD3陽性T細胞において発現が誘導された膜型LIGHTに対するキメラA-Fc(Eg1S)の結合を以下の方法で評価した。陰性対照として実施例8に記載の抗DNP抗体(IgG1)を用いた。刺激したPBMCを回収し、Human FcR Blocking Reagent(Miltenyi Biotech社)で反応後、BV421標識CD3抗体(BD Pharmingen社)、7-AAD Staining Solution(BD Pharmingen社)とAlexa Fluor 488 Antibody Labeling Kit(Thermo Scientific社)で標識した終濃度0.4µg/mLのキメラA-Fc又は抗DNP抗体をそれぞれ添加した。反応後、洗浄し、フローサイトメーターで生細胞画分のCD3陽性T細胞中におけるAlexa Fluor 488の蛍光強度を解析した。誘導刺激したPBMCにおける膜型LIGHTの発現の確認には、誘導刺激したPBMCをHuman FcR Blocking Reagent(Miltenyi Biotech社)で反応させた後、BV510標識CD3抗体(BioLegend社)、7-AAD Staining Solution(BD Pharmingen社)とPE標識LIGHT抗体(LS Bio社)又はPE標識マウスIgG1 アイソタイプコントロール抗体(BioLegend社)をそれぞれ添加し、反応後、洗浄し、フローサイトメーターで生細胞画分のCD3陽性T細胞中におけるPEの蛍光強度を解析した。

10

20

## 【0347】

その結果、誘導刺激したPBMCのCD3陽性ヒトT細胞上にLIGHTの発現が誘導されることが確認され、Alexa Fluor 488標識キメラA-Fcは活性化されたCD3陽性ヒトT細胞上の膜型LIGHTに結合していることが確認された(図22A、B)。

## 【0348】

## (2) プライマリーTL1A結合活性

実施例5と同様の方法で培養したHUV EC細胞(Lonza社)を、終濃度10ng/mLのRecombinant Human IL-1 alpha(R&D社)及び、終濃度20µMのTACE阻害剤TAPI-1(Calbiochem社)で24時間処理し、発現が誘導された膜型TL1Aに対するキメラA-Fc(IEGRMD g1S)の結合を、TL1A抗体1D1 1.31(US2015/0132311)との競合実験により評価した。TL1A抗体1D1 1.31は、US2015/0132311に記載のVL及びVHのアミノ酸配列をヒトIgG1の定常領域に連結させ、実施例1に記載の方法で、Exp1293細胞を用いて一過性に発現させ、培養上清からMabselect Sure(GEヘルスケア社)を用いて精製したものをを用いた。陰性対照として実施例8に記載の抗DNP抗体(IgG1)を用いた。回収した細胞をHuman FcR Blocking Reagent(Miltenyi Biotech社)で反応後、Zenon Alexa Fluor 647 Human IgG Labeling Kit(Molecular Probes社)で標識した、抗DNP抗体、キメラA-Fc、TL1A抗体のいずれかを終濃度8.3µg/mLとなるように添加した。反応後、洗浄し、フローサイトメーターでAlexa Fluor 647の蛍光強度を解析した。競合条件においては、あらかじめ終濃度50µg/mLの未標識のDNP抗体、TL1A抗体、キメラA-Fcのいずれかを反応させた。

30

40

## 【0349】

その結果、標識キメラA-Fcの結合は未標識TL1A抗体と競合し、標識TL1A抗体の結合は未標識キメラA-Fcと競合したことから、キメラAは刺激したHUV EC細

50

胞上の膜型 T L 1 A に結合していることが確認された ( 図 2 3 ) 。

【 0 3 5 0 】

( 3 ) プライマリー F a s L 結合活性

A c t i v a t i o n - i n d u c e d c e l l d e a t h ( A I C D ) を誘導したヒト T 細胞から産生された、プライマリー可溶型 F a s L に対するキメラ A - F c ( I E G R M D g 1 S ) の結合を以下の方法で評価した。プライマリー可溶型 F a s L は、以下の方法で調整した。すなわち、実施例 9 と同様の方法で凍結健常人 P B M C より単離したヒト T 細胞を 9 6 ウェル U 底プレート ( B D 社 ) に  $2 \times 10^4$  c e l l s / w e l l で播種し、終濃度  $1 \mu g / m L$  の P H A - L ( e B i o s c i e n c e 社 ) で 2 4 時間培養後、終濃度  $1 \mu g / m L$  の I L - 2 ( P e p t r o t e c h 社 ) を添加して 5 日間培養した。5 日後に細胞を回収し、 $5 \mu g / m L$  の抗 C D 3 抗体 O K T 3 ( B i o L e g e n d 社 ) を固相化した 9 6 ウェル U 底プレートに播種し、A I C D を誘導して一晩培養後、培養上清を回収し、滅菌水でプレリンスした分画分子量  $10 k D a$  のアミコンウルトラ - 1 5 ( M i l l i p o r e 社 ) を用い、溶液量を 1 0 分の 1 になるように濃縮した。

10

【 0 3 5 1 】

$10 \mu g / m L$  の抗ヒト I g G 抗体 ( A m e r i c a n Q u a l e x 社 ) を固相化した 9 6 ウェル U 底プレート ( T h e r m o S c i e n t i f i c 社 ) を 1 % B l o c k A c e ( D S ファーマバイオメディカル社 ) でブロッキング後、 $20 \mu g / m L$  のキメラ A - F c ( I E G R M D g 1 S ) 又は F a s - F c ( R & D 社 ) を捕捉させた。洗浄後、スタンダードとして用いたリコンビナント F a s L ( a b c a m 社 ) 又は 1 0 倍濃縮した A I C D 培養上清を反応させ、洗浄後、ビオチン化抗 F a s L 抗体 ( a b c a m 社 ) を反応させた。洗浄後、ストレプトアビジン - H R P ( P I E R C E 社 ) を反応させ、再び洗浄を行った後、T M B 溶液 ( a b c a m 社 ) を加えて発色させ、2 N 硫酸溶液で発色反応を停止し、 $450 n m$  における吸光度を測定した。

20

【 0 3 5 2 】

キメラ A - F c ( I E G R M D g 1 S ) を捕捉させたプレートの結果を図 2 4 A に、F a s - F c を捕捉させたプレートの結果を図 2 4 B に示す。1 0 x A I C D s u p . の C D 3 は、抗 C D 3 抗体 O K T 3 刺激条件下で A I C D を誘導した T 細胞の培養上清を用いたことを、n o n e は A I C D を誘導していない T 細胞の培養上清を用いたことを指す。キメラ A - F c 又は F a s - F c のいずれを捕捉させたプレートについても、A I C D を誘導した T 細胞の培養上清中においてのみ、F a s L が検出された。このことから、キメラ A - F c は A I C D 誘導 T 細胞から産生された可溶型 F a s L に結合することが確認された ( 図 2 4 A 、 B ) 。

30

【 0 3 5 3 】

[ 実施例 1 7 ] D c R 3 変異体の物性評価

各種キメラ A - F c ( g 1 S 、 E g 1 S 、 E g 1 S Y T E 、 E g 1 S N 4 3 4 A 、 E g 1 S L A L A G A N A 、 E g 1 S L A L A G A 、 g 4 P E K ) 及び F a s L 結合性低下変異体 E 5 7 K - F c 、 E 5 7 L - F c 、 E 5 7 R - F c 、 E 5 7 V - F c 、 4 5 - 1 0 - F c 、 4 5 - 1 8 - F c 、 8 2 - 5 - F c ( いずれも g 4 P E K ) について、実施例 4 と同様の方法で、疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C ) による溶出時間 ( 分 ) の算出及び D i f f e r e n t i a l S c a n n i n g F l u o r i m e t r y ( D S F ) 法による T m 値 ( ) の算出を行った。

40

【 0 3 5 4 】

その結果、I g G 1 F c 配列への複数のアミノ酸変異導入による顕著な疎水性への影響はないことが確認された。F a s L 結合性低下変異体の溶出時間はいずれも、キメラ A - g 4 P E K と顕著な差はなかったことから、1 又は 2 アミノ酸置換による疎水性への影響はないことが確認された ( 図 2 5 ) 。

【 0 3 5 5 】

D S F による T m 値については、I g G 1 F c 配列のアミノ酸置換あるいは挿入のうち、Y T E 変異導入による熱安定性への影響が認められた。F a s L 結合性低下変異体の

50

T<sub>m</sub>値はいずれも、キメラA-g4PEKと顕著な差はなかったことから、DcR3のCRD部分への1又は2アミノ酸置換導入による熱安定性への影響はないことが確認された(図26)。

#### 【0356】

##### [実施例18] DcR3 改変体のマウス体内動態の評価

キメラA-Fc(Eg1S)及びFasL結合性低下改変体E57K-Fc、E57L-Fc、E57R-Fc、E57V-Fc、45-10-Fc、45-18-Fc、82-5-Fc(いずれもFcはg4PEK)について、実施例6に記載した方法と同様の方法でマウスにおける体内動態を評価した。キメラA-Fc(Eg1S)はCHO-K1細胞の安定発現、各FasL結合性低下改変体はCHO-S細胞の一過性発現によりそれぞれ作製し、AKTApurifier(GEヘルスケア社)を用いたSEC(Superdex 200 Increase 10/300 GL)(GEヘルスケア社)により単量体95%以上に精製したものをを用いた。

10

#### 【0357】

5~6週齢のBALB/cマウス( )に各DcR3改変体10mg/kgを単回i.v.投与した(n=2あるいは3)際の単回投与後の消失相の血中半減期(h)及び無限時間までの血中濃度-時間曲線下面積(area under the concentration-time curve)であるAUC<sub>0-</sub>(μg\*h/mL)を算出した(図27)。E57K-Fc、E57R-Fc、E57V-Fcを投与したマウスの血清中DcR3改変体濃度を測定する際の標準物質には、Exp1293細胞の一過性発現により作製した各DcR3改変体を用いた。

20

#### 【0358】

その結果、実施例6に記載した野生型DcR3であるS195-Fc(IEGRMDg1S)と比較して、いずれのDcR3改変体もAUCが大幅に改善していた。

#### 【0359】

##### [実施例19] DcR3 改変体のin vivo薬効評価

キメラA-Fc(g4PEK)のin vivo薬効評価を、マウス急性異種間移植片対宿主病(graft versus host disease; GVHD)モデルを用いて実施した。

#### 【0360】

##### (1) マウス急性異種間GVHDモデルの作製

マウス急性異種間GVHDモデルは、JP5209625に記載と同様の方法で作製した。6週齢の重症複合免疫不全(SCID)雌マウスを用いて、-2日目及び5日目に100μgのラット抗マウスIL2受容体-(IL2R)鎖抗体TM1(BioXCell社)を腹腔内注射し、内因性マウスナチュラルキラー細胞を枯渇させた。-1日目に、CellRad型X線照射装置(Faxitron社)を使用してマウスに1.7Gyの致死量以下の照射処置を施した。0日目に、3×10<sup>6</sup>個のヒトPBMC(AllCells社)を腹腔内に移入し、続けて、100μLのPBSで調整した300μgのキメラA-FcあるいはDNP抗体(いずれもg4PEK)を腹腔内注射した。キメラA-Fc投与群については4日目、8日目に300μgのキメラA-Fcを追加投与した。12日後、GVHD反応による肉眼的病態スコアを決定するとともに、殺したマウスから脾臓を採取し、脾臓中のヒト細胞数を評価した。

30

40

#### 【0361】

##### (2) GVHD病態スコアの評価

12日目に観察された肉眼的病態は、毛並み、腸管における発赤、活動状態、並びに体重減少の4種の指標によって、スコア化した(図28A)。各々の指標は、無し、軽度、重度をそれぞれ0、1、2のスコアとし、全指標のスコアを合計してGVHD病態スコアを決定した。

#### 【0362】

その結果、ヒトPBMCの移入によるGVHD病態スコアの上昇及び、DNP抗体投与

50

群と比較してキメラA - Fc投与による病態スコアの減少がそれぞれ確認され、キメラA - Fcによる薬効が認められた(図28B)。

#### 【0363】

##### (3) 脾臓中のヒト細胞数の測定

マウスの脾臓を採取し、gentleMACS Dissociators (Miltenyi社)を使用して脾臓を破碎し脾細胞懸濁液を調製した。Lysing buffer (BD Biosciences社)による溶血処理後、PE/Cy7標識抗ヒトCD45抗体、FITC標識抗ヒトCD3抗体、APC標識抗ヒトCD4抗体、PE標識抗ヒトCD8抗体(いずれもBioLegend社)で染色し、フローサイトメリー解析によって各ヒト細胞サブセットを解析した。細胞数の測定にはCountBright Absolute Counting Beads, for flow cytometry (Thermo Fisher Scientific社)を用い、フローサイトメリーで検出された蛍光ビーズカウントと各細胞サブセット数の存在比率を既知の添加ビーズ量によって補正し、脾臓中の総細胞数を算出した。

10

#### 【0364】

その結果、ヒトPBMCの移入によってマウス脾臓中にヒト細胞が検出され、DNP抗体投与群と比較してキメラA - Fc投与によるマウス脾臓中ヒト細胞数の減少が確認された(図29)。

#### 【0365】

##### [実施例20] 可溶性DcR3リガンド三量体への結合活性評価

実施例12で作製した各種変異Fcを有するキメラA - Fc及びFasL結合性低下改変体について、可溶性ヒトLIGHT三量体、可溶性カニクイザルLIGHT三量体、可溶性ヒトTL1A三量体、可溶性カニクイザルTL1A三量体、可溶性ヒトFasL三量体、又は可溶性カニクイザルFasL三量体に対する結合活性評価を、実施例7及び実施例13に記載した方法を一部変更して以下の通り実施した。

20

#### 【0366】

##### (1) 可溶性DcR3リガンド三量体の作製

ヒトの可溶性DcR3リガンド三量体は実施例13で作製したものをを用いた。カニクイザルの可溶性組換えLIGHTは、N末端にFLAGタグ(DYKDDDDK)を付加し、その下流にカニクイザルLIGHTの細胞外領域(Asp74 - Val240)(配列番号134)を連結した配列(FLAG - cynoLIGHT)を用いた(塩基配列: 配列番号341、アミノ酸配列: 配列番号342)。カニクイザルの可溶性組換えTL1A(His6 - cynoTL1A)及びカニクイザル可溶性FasL(His6 - cynoFasL)(アミノ酸配列はそれぞれ配列番号122、124)は、実施例7と同じ配列を用いた。LIGHT及びTL1AはExp1293、FasLはCHO-Sによる一過性発現を行った。

30

#### 【0367】

FLAG - cynoLIGHT及びHis6 - cynoTL1Aは実施例13に記載の方法で精製した。His6 - cynoFasLは、培養上清をNi Sepharose Fast Flowレジン(GEヘルスケア社)の充填されたカラムに通液し、His Buffer Kit(GEヘルスケア社)を用いて調製した洗浄用緩衝液(60mM イミダゾール、20mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH7.4)で洗浄後、溶出用緩衝液(250mM イミダゾール、20mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH7.4)で溶出し、PBSへバッファー置換した。

40

#### 【0368】

精製FLAG - cynoLIGHT及びHis6 - cynoTL1Aは、AKTApurifier(GEヘルスケア社)を用いたゲルろ過クロマトグラフィー(SEC)(Superdex 200 Increase 10/300 GL)(GEヘルスケア社)により、三量体画分を分取した。精製His6 - cynoFasLはSEC - UHPLC(装置: Nexera X2(島津製作所)、カラム: ACQUITY UPLC Pro

50

tein BEH SEC 200、 $1.7\ \mu\text{m}$ 、 $4.6 \times 150\ \text{mm}$  (Waters社))により分析し、85%以上が三量体であることを確認した。

【0369】

(2) BIAcoreを用いた結合活性測定

各種変異Fcを有するキメラA-Fc及びFasL結合性低下改変体としては、いずれも実施例12に記載した改変体を、AKTApurifier (GEヘルスケア社)を用いたSEC (Superdex 200 Increase 10/300 GL) (GEヘルスケア社)又はAKTApure 25 (GEヘルスケア社)を用いたSEC (HiLoad 26/600 Superdex 200 pg) (GEヘルスケア社)により単量体95%以上に精製したものをを用いた。

10

【0370】

ヒト又はカニクイザルDcR3リガンド三量体に対する結合活性はSPR法により解析した。ヒトLIGHT、カニクイザルLIGHT、ヒトTL1A、カニクイザルTL1Aに対する結合活性測定にはBIAcore T-100 (GEヘルスケア社)を、ヒトFasL、カニクイザルFasLに対する結合活性測定にはBIAcore T-200 (GEヘルスケア社)をそれぞれ用いた。緩衝液にはHBS-EP+Bufferを用いた。

【0371】

Series S Sensor Chip Protein A (GEヘルスケア社)に各種DcR3改変体を $10\ \mu\text{L}$ /分で30秒間流し、キャプチャーさせた。一方、リファレンス用フローセルにはタンパク質を含まない緩衝液を流した。その後、アナライトとして、 $0.08 - 20\ \text{nmol/L}$ に希釈した各ヒトDcR3リガンド三量体又は各カニクイザルDcR3リガンド三量体を流した。ヒトLIGHT三量体、ヒトTL1A三量体又は各カニクイザルDcR3リガンド三量体を $30\ \mu\text{L}$ /分で2分間流して結合をモニターし、続いて緩衝液を5分間流して解離をモニターした。ヒトFasL三量体は $30\ \mu\text{L}$ /分で1分間流して結合をモニターし、続いて緩衝液を3分間流して解離をモニターした。次いで、 $3\ \text{mol/L}$ 塩化マグネシウムを $30\ \mu\text{L}$ /分で1分間流し、再生反応を行った。ヒトLIGHT、カニクイザルLIGHT、ヒトTL1A、カニクイザルTL1Aに対する結合活性測定にはBIAcore T-100 evaluation software、1:1 Binding model、ヒトFasL、カニクイザルFasLに対する結合活性測定にはBIAcore T-200 evaluation software、1:1 Binding modelを用い、各DcR3リガンドは三量体として(ヒトLIGHT三量体: $62.4\ \text{kDa}$ 、カニクイザルLIGHT三量体: $57.9\ \text{kDa}$ 、ヒトTL1A三量体: $66.2\ \text{kDa}$ 、カニクイザルTL1A三量体: $66.1\ \text{kDa}$ 、ヒトFasL三量体: $53.1\ \text{kDa}$ 、カニクイザルFasL三量体: $53.1\ \text{kDa}$ )、各速度論定数( $k_a$ 、 $k_d$ 、 $K_D$ )を算出した。

20

30

【0372】

その結果、各種変異Fcを有するキメラA-Fc (Eg1S、Eg1S YTE、Eg1S N434A、Eg1S LALAGA、Eg1S LALAGANA) (それぞれのアミノ酸配列: 配列番号168、170、172、176、178) はいずれもヒト及びカニクイザルの各DcR3三量体リガンドに結合することを確認した(図30A、B)。

40

【0373】

各種変異Fcを有するFasL結合性低下改変体E57K-Fc、E57R-Fc、E57V-Fc、45-10-Fc、45-18-Fc (いずれもFcはEg1S YTE、Eg1S N434A又はEg1S LALAGANA) では、いずれもキメラA-Eg1Sと比較してヒトLIGHT三量体及びヒトTL1A三量体に対する $K_D$ 値に顕著な差はなかった。しかし、これらのFasL結合性低下改変体では、いずれもヒトFasL三量体に対する $K_D$ 値がキメラA-Eg1Sと比較して大幅に増加しており、ヒトFasL選択的に結合性が低下していることが確認された(図30A)。

【0374】

各種変異Fcを有するFasL結合性低下改変体ではいずれも、カニクイザルLIGH

50

T三量体又はカニクイザルTL1A三量体に対する $K_D$ 値はキメラA-Eg1Sと同程度であったが、E57R-Fc (Eg1S YTE、Eg1S N434A)では、カニクイザルTL1A三量体に対する結合活性が減弱する傾向が見られた。一方、いずれのFasL結合性低下改変体においても、カニクイザルFasL三量体に対する $K_D$ 値はキメラA-Eg1Sと比べて大幅に増加し、FasL選択的に結合性が低下していることが確認された(図30B)。

#### 【0375】

##### [実施例21] DcR3可溶性リガンドの中和活性評価

各種変異Fcを有するFasL結合性低下改変体の可溶性ヒトLIGHT、可溶性ヒトTL1A、及び可溶性ヒトFasLに対する中和活性評価を、実施例9又は実施例14と同様の方法で実施した。各種DcR3改変体としては、実施例12で作製したキメラA-Fc、又は、CHO-S細胞の一過性発現により作製したFasL結合性低下改変体E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)を、実施例14(1)に記載の方法又はAKTApurifier(GEヘルスケア社)を用いたSEC(HiLoad 16/600 Superdex 200 pg)(GEヘルスケア社)により単量体95%以上に精製したものをを用いた。

#### 【0376】

##### (1)可溶性ヒトLIGHT中和活性

実施例14に記載した方法で、IFN-刺激した腸筋線維芽細胞によるLIGHT依存的なCXCL10産生に対する各種DcR3改変体の阻害活性を評価した。その結果、キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)は、いずれも濃度依存的にCXCL10産生を阻害し、可溶性LIGHTに対する中和活性を有することが確認された。結果を図31に示す。

#### 【0377】

##### (2)可溶性ヒトTL1A中和活性

実施例9に記載した方法で、IL-12及びIL-18刺激ヒトT細胞によるTL1A依存的なIFN-産生に対する各種DcR3改変体の阻害活性を評価した。その結果、キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)は、いずれも濃度依存的にIFN-産生を阻害し、可溶性TL1Aに対する中和活性を有することが確認された。結果を図32に示す。

#### 【0378】

##### (3)可溶性ヒトFasL中和活性

実施例9に記載した方法で、Jurkat細胞のFasL依存的な細胞死に対する各種DcR3改変体の阻害活性を評価した。その結果、キメラA-Fc(Eg1S YTE、Eg1S LALAGANA)は濃度依存的にJurkat細胞の細胞死を阻害し、可溶性FasLに対する中和活性を有することが確認された。一方、E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)は、いずれもJurkat細胞死に対する阻害活性が著減しており、可溶性FasLに対する中和活性が選択的に低下していることが確認された。結果を図33に示す。

#### 【0379】

なお、図31~図33において、実線及びX(x)はネガティブコントロールである抗DNP抗体、実線及び黒丸(●)はキメラA-Fc(Eg1S YTE)、実線及び白三角(▲)はE57K-Fc(Eg1S YTE)、実線及び白丸(○)は45-18-Fc(Eg1S YTE)、点線及び黒丸(●)はキメラA-Fc(Eg1S LALAGANA)、点線及び白三角(▲)はE57K-Fc(Eg1S LALAGANA)、点線及び白丸(○)は45-18-Fc(Eg1S LALAGANA)を表す。

#### 【0380】

##### [実施例22] DcR3膜型リガンドへの結合活性評価

各種変異Fcを有するキメラA及びFasL結合性低下改変体について、膜型ヒトLI

10

20

30

40

50

GHT、膜型ヒトTL1A、及び膜型ヒトFasLに対する結合活性評価を、実施例15と同様の方法で実施した。

【0381】

キメラA-Fc(Eg1S)はCHO細胞の安定発現株より作製し、SECにより単量体95%以上に精製したものをを用いた。キメラA-Fc(Eg1S YTE、Eg1S N434A、Eg1S LALAGA、Eg1S LALAGANA)はいずれもCHO-S細胞の一過性発現により作製し、SECにより単量体95%以上に精製したものをを用いた。FasL結合性低下改変体E57K-Fc、E57R-Fc、E57V-Fc、45-10-Fc及び45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)はいずれもExp1293F細胞の一過性発現により作製し、SECにより単量体95%以上に精製したものをを用いた。SECはいずれも実施例21と同様の方法で実施した。

10

【0382】

実施例15に記載した、ヒトLIGHT、ヒトTL1A、又はヒトFasLの膜型分子をそれぞれ強制発現する細胞株(それぞれLIGHT/HEK293、TL1A/CHO、又はFasL/CHOとも表記する)、及びその宿主細胞であるHEK293、CHO-K1細胞に上記サンプルを終濃度10µg/mL、二次抗体Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgG R-phycoerythrin Conjugate(Southern Biotech社)を終濃度100ng/mLの条件で反応させ、フローサイトメーターによりPEの蛍光強度を解析した。結果を図34A、図34B、及び図34Cに示す。図34Aの黒いバーはLIGHT/HEK293への反応性を、白いバーはHEK293細胞への反応性を表す。図34Bの黒いバーはTL1A/CHOへの反応性を、白いバーはCHO-K1細胞への反応性を表す。図34Cの黒いバーはFasL/CHOへの反応性を、白いバーはCHO-K1細胞への反応性を表す。

20

【0383】

その結果、図34A及び図34Bに示すように、膜型ヒトLIGHT及び膜型TL1Aに対しては、キメラA-Fc(Eg1S、Eg1S YTE、Eg1S N434A、Eg1S LALAGA、Eg1S LALAGANA)、E57K-Fc、E57R-Fc、E57V-Fc、45-10-Fc及び45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)はいずれも結合することが確認された。一方、図34Cに示すように、膜型FasLに対しては、各種変異Fcを有するキメラAと比較して、いずれのFasL結合性低下改変体も結合活性が著減していることが確認された。

30

【0384】

[実施例23] DcR3膜型リガンドの中和活性評価

以下に示した方法により、各種変異Fcを有するキメラA及びFasL結合性低下改変体の膜型ヒトLIGHT、膜型ヒトTL1A、及び膜型ヒトFasLに対する中和活性を評価した。キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)はいずれもCHO-Sの一過性発現により作製し、実施例21と同様にSECにより単量体95%以上に精製したものをを用いた。

【0385】

(1) 膜型ヒトLIGHT中和活性

ヒト腸筋線維芽細胞(Lonza社)を用い、実施例22で使用した膜型LIGHT強制発現HEK293細胞株(LIGHT/HEK293)との共培養によるCXCL10産生を指標に、キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)の膜型ヒトLIGHT中和活性を評価した。

【0386】

ヒト腸筋線維芽細胞をCollagen I coat 96 well プレート(Corning社)に1×10<sup>4</sup> cells/wellで播種し、37℃で一晩培養した。Fixation Buffer(BDバイオサイエンス社)で固定後、PBS及び培地

40

50

で洗浄した LIGHT / HEK 293 を  $1 \times 10^4$  cells / well、リコンビナントヒト IFN- $\gamma$ （富士フイルム和光純薬）を終濃度 10 ng / mL、キメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc（いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA）を終濃度 4.88、19.5、78.1、313、1250、又は 5000 ng / mL となるようにそれぞれ添加し、培養液の総量が 200  $\mu$ L / well となるように調製した。4 日間培養後の培養上清を回収し、CXCL10 / IP - 10 (human) AlphaLISA Detection Kit (Perkin Elmer 社) を用いて培養上清中の CXCL10 濃度を測定した。結果を図 35 に示す。図 35 において、実線及び X ( x ) はネガティブコントロールである抗 DNP 抗体、実線及び黒丸 ( ) はキメラ A - Fc ( Eg1S YTE )、実線及び白三角 ( ) は E57K - Fc ( Eg1S YTE )、実線及び白丸 ( ) は 45 - 18 - Fc ( Eg1S YTE )、点線及び黒丸 ( -- -- ) はキメラ A - Fc ( Eg1S LALAGANA )、点線及び白三角 ( -- -- ) は E57K - Fc ( Eg1S LALAGANA )、点線及び白丸 ( -- -- ) は 45 - 18 - Fc ( Eg1S LALAGANA ) を表す。

【0387】

図 35 に示すように、キメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc ( Fc はいずれも Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA ) のいずれについても濃度依存的に膜型 LIGHT による CXCL10 産生を阻害しており、キメラ A 及び FasL 結合性低下改変体 E57K - Fc、45 - 18 - Fc はいずれも膜型 LIGHT 中和活性を有していることが確認された。

【0388】

#### (2) 膜型ヒト T L 1 A 中和活性

ヒト CD4 陽性 T 細胞を用い、実施例 22 で使用した膜型 T L 1 A 強制発現 CHO - K1 細胞株 ( T L 1 A / CHO ) との共培養による IFN- $\gamma$  産生を指標に、キメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc (いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA) の膜型ヒト T L 1 A 中和活性を評価した。

【0389】

凍結健常人 PBMC ( All Cells 社 ) より、EasySep Human CD4 + T cell Isolation Kit ( STEMCELL Technologies 社 ) を使用して CD4 陽性 T 細胞を単離した。単離した CD4 陽性 T 細胞を、96 ウェル浮遊培養プレートに  $2 \times 10^5$  cells / well で播種した後、Human IL - 12 ( Miltenyi バイオテック社 ) を終濃度 2 ng / mL、Recombinant Human IL - 18 ( MBL 社 ) を終濃度 50 ng / mL、Human IL - 15 ( Miltenyi バイオテック社 ) を終濃度 25 ng / mL となるように添加し、Fixation Buffer ( BD バイオサイエンス社 ) で固定した。その後、PBS 及び培地で洗浄した膜型 T L 1 A 発現 CHO - K1 細胞を  $3 \times 10^4$  cells / well、キメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc (いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA) を終濃度 20、50、100、250、500、又は 1000 ng / mL となるようにそれぞれ添加し、培養液の総量が 200  $\mu$ L / well となるように調製した。2 日間培養後の培養上清を回収し、AlphaLISA IFN- $\gamma$  Immunoassay Research Kit ( Perkin Elmer 社 ) を用いて、培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を測定した。結果を図 36 に示す。図 36 において、実線及び X ( x ) はネガティブコントロールである抗 DNP 抗体、実線及び黒丸 ( ) はキメラ A - Fc ( Eg1S YTE )、実線及び白三角 ( ) は E57K - Fc ( Eg1S YTE )、実線及び白丸 ( ) は 45 - 18 - Fc ( Eg1S YTE )、点線及び黒丸 ( -- -- ) はキメラ A - Fc ( Eg1S LALAGANA )、点線及び白三角 ( -- -- ) は E57K - Fc ( Eg1S LALAGANA )、点線及び白丸 ( -- -- ) は 45 - 18 - Fc ( Eg1S LALAGANA ) を表す。

【0390】

図 36 に示すように、キメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc ( Fc はい

ずれもEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)のいずれについても濃度依存的に膜型TL1AによるIFN- $\gamma$ 産生を阻害しており、FasL結合性低下改変体E57K-Fc、45-18-FcはいずれもキメラA-Fcと同様の膜型TL1A中和活性を維持していることが確認された。

#### 【0391】

##### (3) 膜型ヒトFasL中和活性

キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)の膜型ヒトFasLに対する中和活性を、可溶型として切断されない改変を導入した膜型FasLの強制発現株との共培養によるJurkat細胞のアポトーシスを指標に測定した。

#### 【0392】

N末端にFLAGタグ(DYKDDDDK)を付加し、FasL切断サイト(Glu128-Ile131)(Nat. Med., 1998, 4(1), p. 31-36)及び細胞内領域のプロリンリッチ領域(Pro8-Pro69)(Nat. Med., 1996, 2(3), p. 317-322)を除去した、膜型ヒトFasL改変体配列(塩基配列: 配列番号343、アミノ酸配列: 配列番号344)を発現するプラスミドを以下の方法で作製した。実施例15に記載の膜型FasL発現プラスミドを鋳型とし、目的配列を欠損させるよう設計したプライマーを用いて、PstIサイトからTyr7まで、Pro70からLeu127まで、及びGly132からNotIサイトまでの3領域をそれぞれPCR増幅したものを、実施例1と同様の方法でpCIPuroベクターのCMVプロモーター下に挿入した。得られたプラスミドを、実施例15と同様の方法でCHO-K1細胞に導入し、PE標識抗ヒトFasL抗体(BioLegend社)陽性画分のセルソーティングにより膜型ヒトFasL改変体高発現CHO-K1細胞株(FasLdel/CHO)を取得した。

#### 【0393】

FasLdel/CHOを、96ウェル接着培養プレート(住友ベークライト社)に $5 \times 10^3$  cells/wellで播種し、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37℃にて一晩培養した後、細胞を1回洗浄した。そこにJurkat細胞を $5 \times 10^4$  cells/wellで播種し、終濃度24.4、97.7、391、1563、6250、又は25000 ng/mLとなるようにキメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc(いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)を添加した。培養液の総量が100  $\mu$ L/wellとなるように調整し、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で、37℃にて4時間培養した後、Jurkat細胞のみを回収した。回収したJurkat細胞を96ウェルU底プレート(Falcon社)に播種し、PE annexin V apoptosis detection kit(BDバイオサイエンス社)を用いて室温で15分間染色した。細胞をFCM用緩衝液で洗浄した後、蛍光強度をフローサイトメーターFACS Fortessa(BDバイオサイエンス社)で解析し、Annexin V陽性細胞を死細胞分画として検出した。結果を図37に示す。図37において、実線及びX(x)はネガティブコントロールである抗DNP抗体、実線及び黒丸(●)はキメラA-Fc(Eg1S YTE)、実線及び白三角(▲)はE57K-Fc(Eg1S YTE)、実線及び白丸(○)は45-18-Fc(Eg1S YTE)、点線及び黒丸(●-●)はキメラA-Fc(Eg1S LALAGANA)、点線及び白三角(▲-▲)はE57K-Fc(Eg1S LALAGANA)、点線及び白丸(○-○)は45-18-Fc(Eg1S LALAGANA)を表す。

#### 【0394】

図37に示すように、キメラA-Fc(Eg1S YTE、Eg1S LALAGANA)は濃度依存的にJurkat細胞の細胞死を阻害し、膜型FasLに対する中和活性を有することが確認された。一方、E57K-Fc、45-18-Fc(FcはいずれもEg1S YTE又はEg1S LALAGANA)については、いずれも25000 ng/mLの高濃度添加群でもJurkat細胞死に対する阻害活性をほとんど示さず、膜型F

10

20

30

40

50

a s L に対する中和活性が著しく低下していることが確認された。

【 0 3 9 5 】

[ 実施例 2 4 ] ヒトプライマリー細胞由来の可溶型 D c R 3 リガンドへの結合活性評価  
キメラ A - F c 、 E 5 7 K - F c 、 4 5 - 1 8 - F c ( いずれも F c は E g 1 S Y T E 又は E g 1 S L A L A G A N A ) の各種可溶型 D c R リガンドに対する結合活性を、ヒトプライマリー細胞由来の可溶型 D c R 3 リガンドを用いて評価した。いずれの被験物質も、C H O - S の一過性発現により作製し、実施例 2 1 と同様に S E C により単量体 9 5 % 以上に精製したものをを用いた。

【 0 3 9 6 】

( 1 ) プライマリー L I G H T 結合活性

活性化したヒト T 細胞から産生された、プライマリー可溶型 L I G H T に対するキメラ A - F c 、 E 5 7 K - F c 、 4 5 - 1 8 - F c ( いずれも F c は E g 1 S Y T E 又は E g 1 S L A L A G A N A ) の結合を以下の方法で評価した。プライマリー可溶型 L I G H T は、以下の方法で調製した。1 0 μ g / m L の抗 C D 3 抗体 O K T 3 ( B i o L e g e n d 社 ) を固相化した 6 ウェル接着培養プレート ( 住友ベークライト社 ) に、融解した凍結健常人 P B M C ( A l l C e l l s 社 ) より単離したヒト T 細胞を 7 × 1 0 <sup>6</sup> c e l l s / w e l l で播種し、終濃度 1 μ g / m L の抗 C D 2 8 抗体 ( B i o L e g e n d 社 ) を添加して 5 % C O <sub>2</sub> インキュベーター中で 3 日間培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清中のプライマリー可溶型 L I G H T 濃度は H u m a n L I G H T / T N F S F 1 4 Q u a n t i k i n e E L I S A K i t ( R & D 社 ) を用いて測定し、未刺激のヒト T 細胞の培養上清中には 1 4 p g / m L 、抗 C D 3 抗体及び抗 C D 2 8 抗体で刺激したヒト T 細胞の培養上清中には 5 . 6 n g / m L の可溶型 L I G H T が存在することを確認した。

【 0 3 9 7 】

次に、9 6 ウェルイムノプレート ( T h e r m o S c i e n t i f i c 社 ) に 1 0 μ g / m L の抗ヒト I g G 抗体 ( A m e r i c a n Q u a l e x 社 ) を固相化し、2 % B l o c k A c e ( D S ファーマバイオメディカル社 ) でブロッキングした後、2 μ g / m L のキメラ A - F c 、 E 5 7 K - F c 、 4 5 - 1 8 - F c ( いずれも F c は E g 1 S Y T E 又は E g 1 S L A L A G A N A ) を捕捉させた。L I G H T 産生を誘導したヒト T 細胞の培養上清を、滅菌水でプレリンスした分画分子量 3 k D a のアミコンウルトラ - 1 5 ( M i l l i p o r e 社 ) を用いて 6 倍濃縮し、該プレートを洗浄後に 6 倍濃縮した培養上清を反応させた。L I G H T のスタンダードとしては、実施例 1 3 で作製した可溶型組換え F L A G - L I G H T 三量体を用いた。該プレートを洗浄後、ビオチン化抗 L I G H T 抗体 ( R & D 社 ) を反応させた。該プレートを洗浄後、ストレプトアビジン - H R P ( P I E R C E 社 ) を反応させ、再び洗浄を行った後、T M B 溶液 ( D a k o 社 ) を加えて発色させ、2 N 硫酸溶液で発色反応を停止し、4 5 0 n m ( レファレンス波長 5 7 0 n m ) における吸光度を測定した。

【 0 3 9 8 】

可溶型組換え F L A G - L I G H T 三量体の結果を図 3 8 A に、L I G H T 誘導ヒト T 細胞の培養上清の結果を図 3 8 B に示す。図 3 8 A において、実線及び X ( x ) はネガティブコントロールである抗 D N P 抗体、実線及び黒丸 ( ● ) はキメラ A - F c ( E g 1 S Y T E ) 、実線及び白四角 ( □ ) はキメラ A - F c ( E g 1 S ) 、実線及び白三角 ( ▲ ) は E 5 7 K - F c ( E g 1 S Y T E ) 、実線及び白丸 ( ○ ) は 4 5 - 1 8 - F c ( E g 1 S Y T E ) 、点線及び黒丸 ( ● ) はキメラ A - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) 、点線及び白三角 ( ▲ ) は E 5 7 K - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) 、点線及び白丸 ( ○ ) は 4 5 - 1 8 - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) を表す。図 3 8 B において、黒いバーで示される「 6 x s u p . C D 3 / 2 8 」は、抗 C D 3 抗体 O K T 3 及び抗 C D 2 8 抗体刺激条件下で L I G H T 発現を誘導したヒト T 細胞の 6 倍濃縮した培養上清を用いたことを、白いバーで示される「 6 x s u p . n o n e 」は、未刺激のヒト T 細胞の 6 倍濃縮した培養上清を用いたことを表す。

10

20

30

40

50

【0399】

図38Bに示すように、キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc（いずれもFcはEg1S、Eg1S YTE、又はEg1S LALAGANA）のいずれを捕捉させたウェルについても、LIGHT発現を誘導したヒトT細胞の培養上清においてのみLIGHTが検出された。このことから、キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc（いずれもFcはEg1S、Eg1S YTE、又はEg1S LALAGANA）は、抗CD3抗体及び抗CD28抗体で刺激したヒトT細胞から産生された可溶性LIGHTに結合することが確認された。

【0400】

(2) プライマリーTL1A結合活性

10

活性化したヒトPBMC由来のプライマリー可溶性TL1Aに対するキメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc（いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA）の結合を評価した。プライマリー可溶性TL1Aは、以下の方法で調製した。6ウェル接着培養プレート（住友ベークライト社）に250µg/mLのヒトIgG抗体（Jackson ImmunoResearch社）を固相化し、さらに抗ヒト軽鎖抗体（Bethyl Laboratories社）及び抗ヒト重鎖抗体（Bethyl Laboratories社）をいずれも終濃度100µg/mLとなるように添加して1時間処理し、免疫複合体を作製した。該プレートに、融解した凍結健常人PBMC（AllCells社）を6×10<sup>6</sup> cells/wellで播種し、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37℃にて培養した。3日後に培養上清を回収し、滅菌水でプレリンスした分画分子量3kDaのアミコンウルトラ-15（Millipore社）を用いて4倍濃縮した。

20

【0401】

(1)と同様の方法でサンドイッチELISAを実施した。96ウェルイムノプレートにキメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc（いずれもFcはEg1S YTE又はEg1S LALAGANA）、又は実施例16で作製した抗ヒトTL1A抗体を捕捉させた。次に該プレートにTL1A産生を誘導したPBMCの4倍濃縮した培養上清、又はスタンダードとして実施例13で作製した可溶性組換えHis6-TL1A三量体を反応させ、ビオチン化抗TL1A抗体（R&D社）で検出した。

【0402】

30

可溶性組換えHis6-TL1A三量体の結果を図38Cに、TL1A産生を誘導したPBMCの培養上清の結果を図38Dに示す。図38Cにおいて、実線及びX(×)はネガティブコントロールである抗DNP抗体、実線及び黒丸(●)はキメラA-Fc(Eg1S YTE)、実線の白四角(□)はキメラA-Fc(Eg1S)、実線及び白三角(△)はE57K-Fc(Eg1S YTE)、実線及び白丸(○)は45-18-Fc(Eg1S YTE)、点線及び黒丸(●)はキメラA-Fc(Eg1S LALAGANA)、点線及び白三角(△)はE57K-Fc(Eg1S LALAGANA)、点線及び白丸(○)は45-18-Fc(Eg1S LALAGANA)、実線の黒三角(▲)は抗TL1A抗体を表す。図38Dにおいて、黒いバーで示される「4xsup.I.C.」は、免疫複合体刺激条件下でTL1A発現を誘導したPBMCの培養上清を用いたことを、白いバーで示される「4xsup.none」は、未刺激のPBMCの培養上清を用いたことを表す。図38Dに示すように、キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc（いずれもFcはEg1S、Eg1S YTE、又はEg1S LALAGANA）のいずれを捕捉させたウェルについても、TL1A発現を誘導したPBMCの培養上清においてのみ、TL1Aが検出された。このことから、キメラA-Fc、E57K-Fc、45-18-Fc（いずれもFcはEg1S、Eg1S YTE、又はEg1S LALAGANA）は、免疫複合体で刺激したPBMCから産生された可溶性TL1Aに結合することが確認された。

40

【0403】

(3) プライマリーFasL結合活性

50

プライマリーの可溶型ヒト Fas L に対するキメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc (いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA) の結合を評価した。プライマリー可溶型 Fas L としては、Activation - induced cell death (AICD) を誘導したヒト T 細胞が産生した可溶型 Fas L を実施例 16 と同様の方法で調製して用いた。

#### 【0404】

(1) と同様の方法でサンドイッチ ELISA を実施した。96 ウェルイムノプレートにキメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc (いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA)、又は Fas - Fc (R&D 社) を捕捉させ、次に AICD を誘導したヒト T 細胞の 6 倍濃縮培養上清、又はスタンダードとして Human His6 Fas Ligand / TNFSF6 (Cell Signaling Technology 社) を反応させ、Human Fas Ligand ELISA Kit (Abcam 社) 付属品のビオチン化抗 Fas L 抗体で検出した。

10

#### 【0405】

可溶型組換え His6 - Fas L の結果を図 38E に、AICD 誘導ヒト T 細胞の培養上清の結果を図 38F に示す。図 38E において、実線及び X ( x ) はネガティブコントロールである抗 DNP 抗体、実線及び黒丸 ( ) はキメラ A - Fc (Eg1S YTE)、実線及び白四角 ( ) はキメラ A - Fc (Eg1S)、実線及び白三角 ( ) は E57K - Fc (Eg1S YTE)、実線及び白丸 ( ) は 45 - 18 - Fc (Eg1S YTE)、点線及び黒丸 ( -- ) はキメラ A - Fc (Eg1S LALAGANA)、点線及び白三角 ( -- ) は E57K - Fc (Eg1S LALAGANA)、点線及び白丸 ( -- ) は 45 - 18 - Fc (Eg1S LALAGANA)、実線及び黒三角 ( ) は Fas - Fc を表す。図 38F において、黒いバーで示される「6xsup.CD3」は、抗 CD3 抗体 OKT3 刺激条件下で AICD を誘導したヒト T 細胞の培養上清を用いたことを、白いバーで示される「6xsup.none」は、AICD を誘導していないヒト T 細胞の培養上清を用いたことをそれぞれ表す。図 38F に示すように、キメラ A - Fc (Eg1S、Eg1S YTE、Eg1S LALAGANA) を捕捉させたウェルでは、AICD を誘導したヒト T 細胞の培養上清においてのみ Fas L が検出された。一方、E57K - Fc、45 - 18 - Fc (いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA) を捕捉させたウェルでは、AICD を誘導したヒト T 細胞の培養上清において検出される Fas L が著減しており、これらの改変体は、ヒト T 細胞由来の可溶型 Fas L への結合活性が減弱していることが確認された。

20

30

#### 【0406】

##### [実施例 25] DcR3 改変体の物性評価

CHO - S の一過性発現により作製し、実施例 21 と同様に SEC により単量体 95% 以上に精製した E57K - Fc、45 - 18 - Fc (いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA) について、実施例 4 と同様の方法で、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) による溶出時間 (分) の算出及び Differential Scanning Fluorimetry (DSF) 法による Tm 値 ( ) の算出を行った。

40

#### 【0407】

その結果、いずれの値も実施例 17 と同等の値を示したことから、IgG1 Fc 配列への上記アミノ酸変異導入及びキメラ A 配列への上記アミノ酸置換を組み合わせた場合に、疎水性及び熱安定性への影響はないことが確認された。

#### 【0408】

##### [実施例 26] DcR3 改変体のマウス体内動態の評価

CHO - S の一過性発現により作製し、実施例 21 と同様に SEC により単量体 95% 以上に精製したキメラ A - Fc、E57K - Fc、45 - 18 - Fc (いずれも Fc は Eg1S YTE 又は Eg1S LALAGANA) について、実施例 6 に記載した方法と同様の方法でマウスにおける体内動態を評価した。結果を図 39 に示す。

50

## 【0409】

図39に示すように、実施例6に記載した野生型DcR3であるS195-Fc(IEGRMD g1S)のAUCの値354と比較して、いずれのDcR3改変体もAUCが大幅に改善していた。

## 【0410】

[実施例27] Fcを融合しないDcR3改変体の凝集性評価

HBD領域を欠損したヒト野生型DcR3(S195)のC末端にHis6タグを付加したタンパク質(S195-His6)(塩基配列:配列番号345、アミノ酸配列:配列番号346)、キメラAのC末端にHis6タグを付加したタンパク質(キメラA-His6)(塩基配列:配列番号347、アミノ酸配列:配列番号348)、キメラA-E57KのC末端にHis6タグを付加したタンパク質(キメラA-E57K-His6)(塩基配列:配列番号349、アミノ酸配列:配列番号350)、45-18のC末端にHis6タグを付加したタンパク質(45-18-His6)(塩基配列:配列番号351、アミノ酸配列:配列番号352)を以下の通り作製した。

## 【0411】

S195-His6は、HBDを除いたヒトDcR3のDNA断片(配列番号107)のN末端にシグナルペプチド配列のDNA断片、C末端にHis6タグ配列を付加した配列を人工合成(ファスマック社)した。キメラA-His6、キメラA-E57K-His6、45-18-His6はそれぞれ、キメラAのDNA断片(配列番号353)、キメラA-E57KのDNA断片(配列番号354)、又は45-18のDNA断片(配列番号355)のN末端にシグナルペプチド配列のDNA断片、C末端にHis6タグ配列を付加した配列を人工合成した。実施例1に記載の方法でpCIPuroベクターに各人工合成断片を導入し、Exp1293細胞による一過性発現を行った。滅菌水でプレリンスした分画分子量3kDaのアミコンウルトラ-0.5(Millipore社)を用いて、S195-His6を発現させた培養上清は30倍に濃縮し、キメラA-His6、キメラA-E57K-His6、45-18-His6を発現させた培養上清はそれぞれ6倍希釈した。

## 【0412】

これらの培養上清を用いて、非還元条件下又は100mM DTTの還元条件下においてSDS-PAGEを行い、次に、1次抗体にマウス抗6x-Hisタグモノクローナル抗体(Thermo Scientific社)、2次抗体にヤギ抗マウスIgG抗体(Southern Biotech社)を用いてイムノプロットを行った。

## 【0413】

結果を図40に示す。S195-His6を一過性発現させた培養上清では、レーン1の還元条件下においては予想分子量である20.9kDa付近にバンドが検出されたが、レーン5の非還元条件下においては単量体のバンドが検出されず、全体がスミアになっていた。このことから、S195-His6は培養上清中では全て凝集体として存在していることが確認された。一方、キメラA-His6、キメラA-E57K-His6及び45-18-His6を一過性に発現させた培養上清はいずれもレーン2~4非還元条件下において、レーン6~8の還元条件下と同様に予想分子量22.2kDa付近に単量体のバンドが検出された。このことから、本発明のDcR3改変体は、野生型DcR3と比較して凝集体含有率が大幅に減少していることが示された。つまり、DcR3のCRD1及びCRD4をそれぞれOPG由来のCRD1及びCRD4へ置換することで、野生型DcR3で見られる凝集を減少させる効果があり、この効果はFasLへの結合性が低下しているかどうかにかかわらず発揮されることが示された。

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0414】

配列番号1:ヒトDcR3cDNAの塩基配列(アクセッション番号:NM\_003823.3)

配列番号2:ヒトDcR3のアミノ酸配列(アクセッション番号:NP\_003814.)

1)

- 配列番号 3 : ヒト D c R 3 (シグナルペプチドなし) の塩基配列
- 配列番号 4 : ヒト D c R 3 (シグナルペプチドなし) のアミノ酸配列
- 配列番号 5 : ヒト D c R 3 の C R D 1 の塩基配列
- 配列番号 6 : ヒト D c R 3 の C R D 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 7 : ヒト D c R 3 の C R D 2 の塩基配列
- 配列番号 8 : ヒト D c R 3 の C R D 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 9 : ヒト D c R 3 の C R D 3 の塩基配列
- 配列番号 10 : ヒト D c R 3 の C R D 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 11 : ヒト D c R 3 の C R D 4 の塩基配列 10
- 配列番号 12 : ヒト D c R 3 の C R D 4 のアミノ酸配列
- 配列番号 13 : ヒト O P G c D N A の塩基配列 (アクセッション番号 : N M \_ 0 0 2 5 4 6 . 3 )
- 配列番号 14 : ヒト O P G のアミノ酸配列 (アクセッション番号 : N P \_ 0 0 2 5 3 7 . 3 )
- 配列番号 15 : ヒト O P G (シグナルペプチドなし) の塩基配列
- 配列番号 16 : ヒト O P G (シグナルペプチドなし) のアミノ酸配列
- 配列番号 17 : ヒト O P G の C R D 1 の塩基配列
- 配列番号 18 : ヒト O P G の C R D 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 19 : ヒト O P G の C R D 2 の塩基配列 20
- 配列番号 20 : ヒト O P G の C R D 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 21 : ヒト O P G の C R D 3 の塩基配列
- 配列番号 22 : ヒト O P G の C R D 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 23 : ヒト O P G の C R D 4 の塩基配列
- 配列番号 24 : ヒト O P G の C R D 4 のアミノ酸配列
- 配列番号 25 : キメラ B - H B D の塩基配列
- 配列番号 26 : キメラ B - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 27 : キメラ C - H B D の塩基配列
- 配列番号 28 : キメラ C - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 29 : キメラ A - H B D の塩基配列 30
- 配列番号 30 : キメラ A - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 31 : 1 0 3 - 1 2 3 O P G - H B D の塩基配列
- 配列番号 32 : 1 0 3 - 1 2 3 O P G - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 33 : N 1 3 1 S / N 1 4 4 S - H B D の塩基配列
- 配列番号 34 : N 1 3 1 S / N 1 4 4 S - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 35 : T 1 3 3 A / S 1 4 6 A - H B D の塩基配列
- 配列番号 36 : T 1 3 3 A / S 1 4 6 A - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 37 : N 1 3 1 S / N 1 4 4 S / N 1 5 7 S - H B D の塩基配列
- 配列番号 38 : N 1 3 1 S / N 1 4 4 S / N 1 5 7 S - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 39 : T 1 3 3 A / S 1 4 6 A / T 1 5 9 A - H B D の塩基配列 40
- 配列番号 40 : T 1 3 3 A / S 1 4 6 A / T 1 5 9 A - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 41 : キメラ A - E 5 7 K - H B D の塩基配列
- 配列番号 42 : キメラ A - E 5 7 K - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 43 : キメラ A - E 5 7 L - H B D の塩基配列
- 配列番号 44 : キメラ A - E 5 7 L - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 45 : キメラ A - R 6 0 K - H B D の塩基配列
- 配列番号 46 : キメラ A - R 6 0 K - H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 47 : 野生型 D c R 3 の H B D の塩基配列
- 配列番号 48 : 野生型 D c R 3 の H B D のアミノ酸配列
- 配列番号 49 : キメラ B の塩基配列 50

配列番号 50 : キメラ B のアミノ酸配列	
配列番号 51 : キメラ C の塩基配列	
配列番号 52 : キメラ C のアミノ酸配列	
配列番号 53 : キメラ A の塩基配列	
配列番号 54 : キメラ A のアミノ酸配列	
配列番号 55 : 103 - 123OPG の塩基配列	
配列番号 56 : 103 - 123OPG のアミノ酸配列	
配列番号 57 : N131S / N144S の塩基配列	
配列番号 58 : N131S / N144S のアミノ酸配列	
配列番号 59 : T133A / S146A の塩基配列	10
配列番号 60 : T133A / S146A のアミノ酸配列	
配列番号 61 : N131S / N144S / N157S の塩基配列	
配列番号 62 : N131S / N144S / N157S のアミノ酸配列	
配列番号 63 : T133A / S146A / T159A の塩基配列	
配列番号 64 : T133A / S146A / T159A のアミノ酸配列	
配列番号 65 : キメラ A - E57K の塩基配列	
配列番号 66 : キメラ A - E57K のアミノ酸配列	
配列番号 67 : キメラ A - E57L の塩基配列	
配列番号 68 : キメラ A - E57L のアミノ酸配列	
配列番号 69 : キメラ A - R60K の塩基配列	20
配列番号 70 : キメラ A - R60K のアミノ酸配列	
配列番号 71 : Fc ( g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 72 : Fc ( g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 73 : Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 74 : Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 75 : キメラ B - Fc ( I E G R M D g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 76 : キメラ B - Fc ( I E G R M D g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 77 : キメラ C - Fc ( I E G R M D g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 78 : キメラ C - Fc ( I E G R M D g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 79 : キメラ A - Fc ( I E G R M D g 1 S ) の塩基配列	30
配列番号 80 : キメラ A - Fc ( I E G R M D g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 81 : キメラ A - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 82 : キメラ A - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 83 : 103 - 123OPG - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 84 : 103 - 123OPG - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 85 : N131S / N144S - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 86 : N131S / N144S - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 87 : T133A / S146A - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 88 : T133A / S146A - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 89 : N131S / N144S / N157S - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	40
配列番号 90 : N131S / N144S / N157S - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 91 : T133A / S146A / T159A - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 92 : T133A / S146A / T159A - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 93 : キメラ A - E57K - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 94 : キメラ A - E57K - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 95 : キメラ A - E57L - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 96 : キメラ A - E57L - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 97 : キメラ A - R60K - Fc ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 98 : キメラ A - R60K - Fc ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 99 : DcR3 FL - Fc の塩基配列	50

配列番号 100 : D c R 3 F L - F c のアミノ酸配列	
配列番号 101 : S 1 9 5 - F c の塩基配列	
配列番号 102 : S 1 9 5 - F c のアミノ酸配列	
配列番号 103 : D c R 3 F L - F L A G の塩基配列	
配列番号 104 : D c R 3 F L - F L A G のアミノ酸配列	
配列番号 105 : リンカー I E G R M D の塩基配列	
配列番号 106 : リンカー I E G R M D のアミノ酸配列	
配列番号 107 : H B D が削除されている D c R 3 (シグナルペプチドなし) の塩基配列	
配列番号 108 : H B D が削除されている D c R 3 (シグナルペプチドなし) のアミノ酸配列	10
配列番号 109 : F L A G タグの塩基配列	
配列番号 110 : F L A G タグのアミノ酸配列	
配列番号 111 : R 2 1 8 Q D c R 3 の塩基配列	
配列番号 112 : R 2 1 8 Q D c R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 113 : ヒト L I G H T の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 114 : ヒト L I G H T の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	
配列番号 115 : ヒト T L 1 A の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 116 : ヒト T L 1 A の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	
配列番号 117 : ヒト F a s L の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 118 : ヒト F a s L の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	20
配列番号 119 : カニクイザル L I G H T の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 120 : カニクイザル L I G H T の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	
配列番号 121 : カニクイザル T L 1 A の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 122 : カニクイザル T L 1 A の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	
配列番号 123 : カニクイザル F a s L の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 124 : カニクイザル F a s L の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	
配列番号 125 : マウス L I G H T の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 126 : マウス L I G H T の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	
配列番号 127 : マウス T L 1 A の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 128 : マウス T L 1 A の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	30
配列番号 129 : マウス F a s L の可溶性組み換え体の塩基配列	
配列番号 130 : マウス F a s L の可溶性組み換え体のアミノ酸配列	
配列番号 131 : ヒト L I G H T の細胞外領域 ( A s p 7 4 - V a l 2 4 0 ) の塩基配列	
配列番号 132 : ヒト L I G H T の細胞外領域 ( A s p 7 4 - V a l 2 4 0 ) のアミノ酸配列	
配列番号 133 : カニクイザル L I G H T の細胞外領域 ( A s p 7 4 - V a l 2 4 0 ) の塩基配列	
配列番号 134 : カニクイザル L I G H T の細胞外領域 ( A s p 7 4 - V a l 2 4 0 ) のアミノ酸配列	
配列番号 135 : マウス L I G H T の細胞外領域 ( A s p 7 2 - V a l 2 3 9 ) の塩基配列	40
配列番号 136 : マウス L I G H T の細胞外領域 ( A s p 7 2 - V a l 2 3 9 ) のアミノ酸配列	
配列番号 137 : ヒト T L 1 A の細胞外領域 ( L e u 7 2 - L e u 2 5 1 ) の塩基配列	
配列番号 138 : ヒト T L 1 A の細胞外領域 ( L e u 7 2 - L e u 2 5 1 ) のアミノ酸配列	
配列番号 139 : カニクイザル T L 1 A の細胞外領域 ( L e u 7 2 - L e u 2 5 1 ) の塩基配列	
配列番号 140 : カニクイザル T L 1 A の細胞外領域 ( L e u 7 2 - L e u 2 5 1 ) のアミノ酸配列	
配列番号 141 : マウス T L 1 A の細胞外領域 ( I l e 9 4 - L e u 2 7 0 ) の塩基配列	
配列番号 142 : マウス T L 1 A の細胞外領域 ( I l e 9 4 - L e u 2 7 0 ) のアミノ酸配列	50

## 配列

配列番号 143 : ヒト FasL の細胞外領域 ( Pro 134 - Leu 281 ) の塩基配列

配列番号 144 : ヒト FasL の細胞外領域 ( Pro 134 - Leu 281 ) のアミノ酸配列

配列番号 145 : カニクイザル FasL の細胞外領域 ( Pro 133 - Leu 280 ) の塩基配列

配列番号 146 : カニクイザル FasL の細胞外領域 ( Pro 133 - Leu 280 ) のアミノ酸配列

配列番号 147 : マウス FasL の細胞外領域 ( Pro 132 - Leu 279 ) の塩基配列

配列番号 148 : マウス FasL の細胞外領域 ( Pro 132 - Leu 279 ) のアミノ酸配列

10

配列番号 149 : キメラ A - Fc ( g 1 S ) の塩基配列

配列番号 150 : キメラ A - Fc ( g 1 S ) のアミノ酸配列

配列番号 151 : OPG K194 - Fc の塩基配列

配列番号 152 : OPG K194 - Fc のアミノ酸配列

配列番号 153 : ヒト IgG1 重鎖の定常領域のアミノ酸配列

配列番号 154 : ヒト IgG4 重鎖の定常領域のアミノ酸配列

配列番号 155 : Fc ( E g 1 S ) の塩基配列

配列番号 156 : Fc ( E g 1 S ) のアミノ酸配列

配列番号 157 : Fc ( E g 1 S - Y T E ) の塩基配列

20

配列番号 158 : Fc ( E g 1 S - Y T E ) のアミノ酸配列

配列番号 159 : Fc ( E g 1 S - N 4 3 4 A ) の塩基配列

配列番号 160 : Fc ( E g 1 S - N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列

配列番号 161 : Fc ( g 1 S - L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 162 : Fc ( g 1 S - L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 163 : Fc ( E g 1 S - L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 164 : Fc ( E g 1 S - L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 165 : Fc ( E g 1 S - L A L A G A N A ) の塩基配列

配列番号 166 : Fc ( E g 1 S - L A L A G A N A ) のアミノ酸配列

配列番号 167 : キメラ A - Fc ( E g 1 S ) の塩基配列

30

配列番号 168 : キメラ A - Fc ( E g 1 S ) のアミノ酸配列

配列番号 169 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - Y T E ) の塩基配列

配列番号 170 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - Y T E ) のアミノ酸配列

配列番号 171 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - N 4 3 4 A ) の塩基配列

配列番号 172 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列

配列番号 173 : キメラ A - Fc ( g 1 S - L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 174 : キメラ A - Fc ( g 1 S - L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 175 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 176 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 177 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - L A L A G A N A ) の塩基配列

40

配列番号 178 : キメラ A - Fc ( E g 1 S - L A L A G A N A ) のアミノ酸配列

配列番号 179 : キメラ A - E 5 7 R の塩基配列

配列番号 180 : キメラ A - E 5 7 R のアミノ酸配列

配列番号 181 : キメラ A - E 5 7 V の塩基配列

配列番号 182 : キメラ A - E 5 7 V のアミノ酸配列

配列番号 183 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 D の塩基配列

配列番号 184 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 D のアミノ酸配列

配列番号 185 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E の塩基配列

配列番号 186 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E のアミノ酸配列

配列番号 187 : キメラ A - E 5 7 R \_ R 5 8 D の塩基配列

50

配列番号 188	: キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D のアミノ酸配列	
配列番号 189	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 190	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 191	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 192	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 193	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 D - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 194	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 D - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 195	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 196	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 197	: キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	10
配列番号 198	: キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 199	: キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 200	: キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 201	: キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 202	: キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 203	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 204	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 205	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 206	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 207	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S ) の塩基配列	20
配列番号 208	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 209	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 E - F c ( E g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 210	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 E - F c ( E g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 211	: キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S ) の塩基配列	
配列番号 212	: キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S ) のアミノ酸配列	
配列番号 213	: キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S Y T E ) の塩基配列	
配列番号 214	: キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 215	: キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S Y T E ) の塩基配列	
配列番号 216	: キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 217	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S Y T E ) の塩基配列	30
配列番号 218	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 219	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S Y T E ) の塩基配列	
配列番号 220	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 221	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S Y T E ) の塩基配列	
配列番号 222	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 223	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 E - F c ( E g 1 S Y T E ) の塩基配列	
配列番号 224	: キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 E - F c ( E g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 225	: キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S Y T E ) の塩基配列	40
配列番号 226	: キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 227	: キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) の塩基配列	
配列番号 228	: キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列	
配列番号 229	: キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) の塩基配列	
配列番号 230	: キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列	
配列番号 231	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) の塩基配列	
配列番号 232	: キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列	
配列番号 233	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) の塩基配列	
配列番号 234	: キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列	50

配列番号 235 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) の塩基配列

配列番号 236 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列

配列番号 237 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 E - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) の塩基配列

配列番号 238 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 E - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列

配列番号 239 : キメラ A - E 5 7 R \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) の塩基配列

配列番号 240 : キメラ A - E 5 7 R \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列

配列番号 241 : キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 242 : キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 243 : キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 244 : キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 245 : キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 246 : キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 247 : キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 248 : キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 249 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 250 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 251 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 E - F c ( E g 1 S L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 252 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 E - F c ( E g 1 S L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 253 : キメラ A - E 5 7 R \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A ) の塩基配列

配列番号 254 : キメラ A - E 5 7 R \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A ) のアミノ酸配列

配列番号 255 : キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) の塩基配列

配列番号 256 : キメラ A - E 5 7 K - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列

配列番号 257 : キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) の塩基配列

配列番号 258 : キメラ A - E 5 7 L - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列

配列番号 259 : キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) の塩基配列

配列番号 260 : キメラ A - E 5 7 R - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列

配列番号 261 : キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) の塩基配列

配列番号 262 : キメラ A - E 5 7 V - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列

配列番号 263 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) の塩基配列

配列番号 264 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列

配列番号 265 : キメラ A - E 5 7 K \_\_ R 5 8 E - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) の塩基配列

10

20

30

40

50

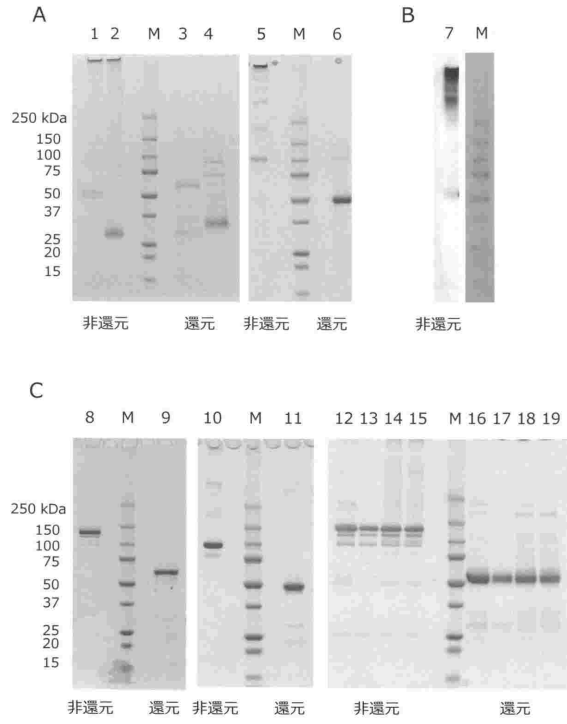
配列番号 266 : キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 E - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列	
配列番号 267 : キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) の塩基配列	
配列番号 268 : キメラ A - E 5 7 R __ R 5 8 D - F c ( E g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列	
配列番号 269 : キメラ A - E 5 7 A の塩基配列	
配列番号 270 : キメラ A - E 5 7 A のアミノ酸配列	
配列番号 271 : キメラ A - E 5 7 F の塩基配列	
配列番号 272 : キメラ A - E 5 7 F のアミノ酸配列	10
配列番号 273 : キメラ A - E 5 7 H の塩基配列	
配列番号 274 : キメラ A - E 5 7 H のアミノ酸配列	
配列番号 275 : キメラ A - E 5 7 I の塩基配列	
配列番号 276 : キメラ A - E 5 7 I のアミノ酸配列	
配列番号 277 : キメラ A - E 5 7 M の塩基配列	
配列番号 278 : キメラ A - E 5 7 M のアミノ酸配列	
配列番号 279 : キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 T の塩基配列	
配列番号 280 : キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 T のアミノ酸配列	
配列番号 281 : キメラ A - E 5 7 L __ R 5 8 E の塩基配列	
配列番号 282 : キメラ A - E 5 7 L __ R 5 8 E のアミノ酸配列	20
配列番号 283 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 T の塩基配列	
配列番号 284 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 T のアミノ酸配列	
配列番号 285 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 E の塩基配列	
配列番号 286 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 E のアミノ酸配列	
配列番号 287 : キメラ A - E 5 7 A - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 288 : キメラ A - E 5 7 A - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 289 : キメラ A - E 5 7 F - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 290 : キメラ A - E 5 7 F - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 291 : キメラ A - E 5 7 H - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 292 : キメラ A - E 5 7 H - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	30
配列番号 293 : キメラ A - E 5 7 I - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 294 : キメラ A - E 5 7 I - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 295 : キメラ A - E 5 7 M - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 296 : キメラ A - E 5 7 M - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 297 : キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 T - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 298 : キメラ A - E 5 7 K __ R 5 8 T - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 299 : キメラ A - E 5 7 L __ R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 300 : キメラ A - E 5 7 L __ R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 301 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 T - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 302 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 T - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	40
配列番号 303 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) の塩基配列	
配列番号 304 : キメラ A - E 5 7 V __ R 5 8 E - F c ( g 4 P E K ) のアミノ酸配列	
配列番号 305 : L I G H T の可溶型組み換え F L A G タグ付加体の塩基配列	
配列番号 306 : L I G H T の可溶型組み換え F L A G タグ付加体のアミノ酸配列	
配列番号 307 : T L 1 A の N 末端に F L A G タグが挿入された塩基配列	
配列番号 308 : T L 1 A の N 末端に F L A G タグが挿入されたアミノ酸配列	
配列番号 309 : F a s L の N 末端に F L A G タグが挿入された塩基配列	
配列番号 310 : F a s L の N 末端に F L A G タグが挿入されたアミノ酸配列	
配列番号 311 : F c ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列	
配列番号 312 : F c ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列	50

- 配列番号 313 : Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 314 : キメラ A - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列
- 配列番号 315 : キメラ A - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 316 : キメラ A - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 317 : キメラ A - E 5 7 K - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列
- 配列番号 318 : キメラ A - E 5 7 L - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列
- 配列番号 319 : キメラ A - E 5 7 R - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列
- 配列番号 320 : キメラ A - E 5 7 V - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列
- 配列番号 321 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 D - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列
- 配列番号 322 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列 10
- 配列番号 323 : キメラ A - E 5 7 R \_ R 5 8 D - Fc ( g 1 S Y T E ) のアミノ酸配列
- 配列番号 324 : キメラ A - E 5 7 K - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 325 : キメラ A - E 5 7 L - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 326 : キメラ A - E 5 7 R - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 327 : キメラ A - E 5 7 V - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 328 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 D - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 329 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 330 : キメラ A - E 5 7 R \_ R 5 8 D - Fc ( g 1 S N 4 3 4 A ) のアミノ酸配列 20
- 配列番号 331 : キメラ A - E 5 7 K - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 332 : キメラ A - E 5 7 L - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 333 : キメラ A - E 5 7 R - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 334 : キメラ A - E 5 7 V - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 335 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 D - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 336 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列
- 配列番号 337 : キメラ A - E 5 7 R \_ R 5 8 D - Fc ( g 1 S L A L A G A N A ) のアミノ酸配列 30
- 配列番号 338 : Fc ( I E G R M D g 1 S ) の塩基配列
- 配列番号 339 : Fc ( I E G R M D g 1 S ) のアミノ酸配列
- 配列番号 340 : R 2 1 8 Q - Fc のアミノ酸配列
- 配列番号 341 : F L A G - c y n o L I G H T の塩基配列
- 配列番号 342 : F L A G - c y n o L I G H T のアミノ酸配列
- 配列番号 343 : ヒト D c R 3 リガンドである F a s L から切断サイトと細胞内プロリンリッチ領域を削除し、N末端に F L A G タグが挿入された塩基配列
- 配列番号 344 : ヒト D c R 3 リガンドである F a s L から切断サイトと細胞内プロリンリッチ領域を削除し、N末端に F L A G タグが挿入されたアミノ酸配列 40
- 配列番号 345 : S 1 9 5 - H i s 6 の塩基配列
- 配列番号 346 : S 1 9 5 - H i s 6 のアミノ酸配列
- 配列番号 347 : キメラ A - H i s 6 の塩基配列
- 配列番号 348 : キメラ A - H i s 6 のアミノ酸配列
- 配列番号 349 : キメラ A - E 5 7 K - H i s 6 の塩基配列
- 配列番号 350 : キメラ A - E 5 7 K - H i s 6 のアミノ酸配列
- 配列番号 351 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E - H i s 6 の塩基配列
- 配列番号 352 : キメラ A - E 5 7 K \_ R 5 8 E - H i s 6 のアミノ酸配列
- 配列番号 353 : キメラ A の最適化塩基配列
- 配列番号 354 : キメラ A - E 5 7 K の最適化塩基配列 50

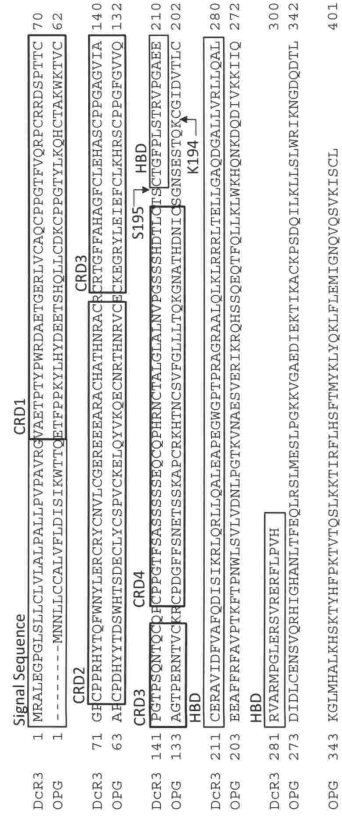
配列番号 355 : キメラ A - E 57K\_\_R58E の最適化塩基配列

【図面】

【図 1】



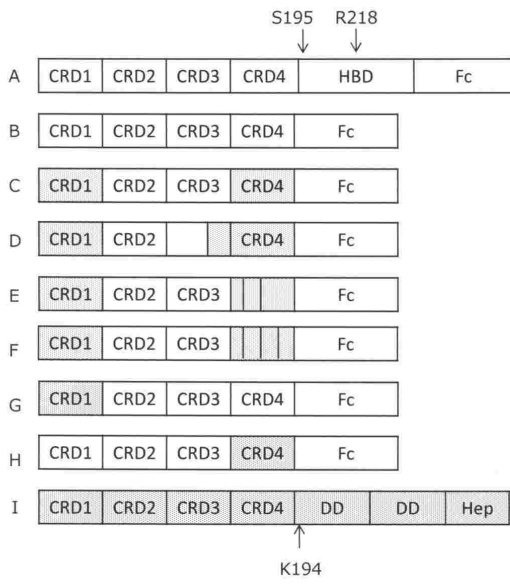
【図 2】



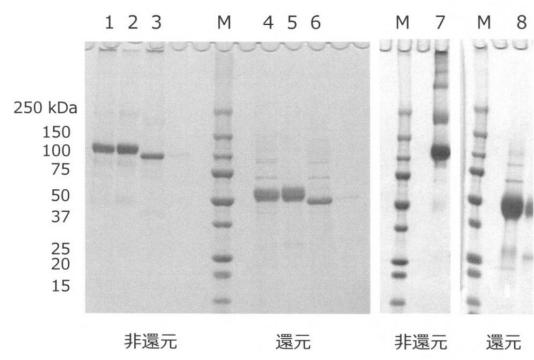
10

20

【図 3】



【図 4】

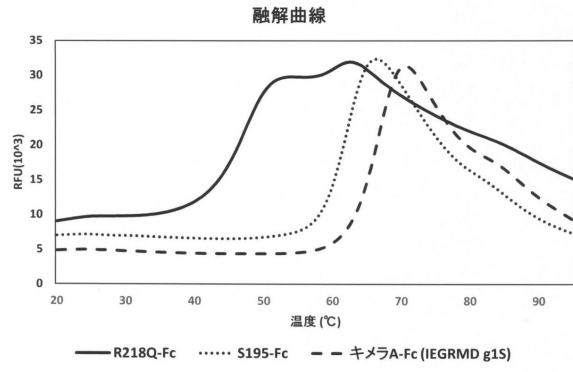


30

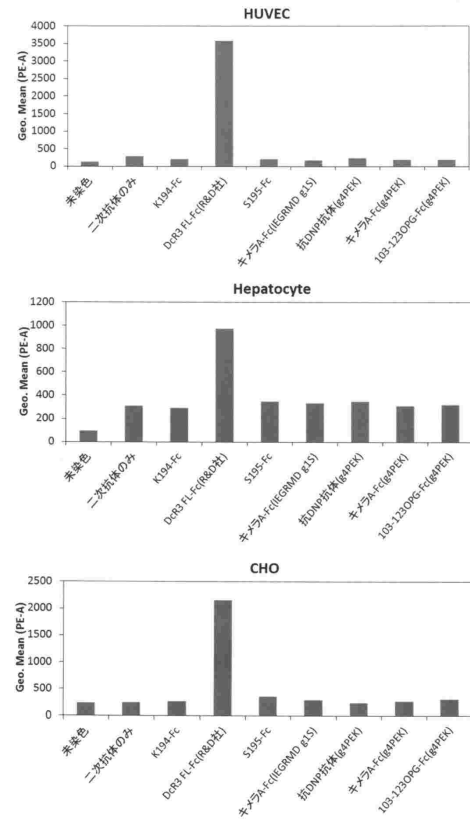
40

50

【図5】



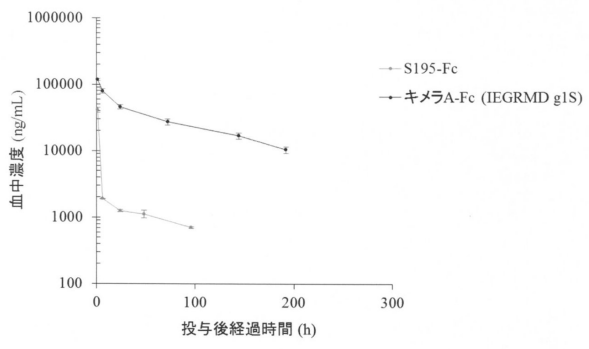
【図6】



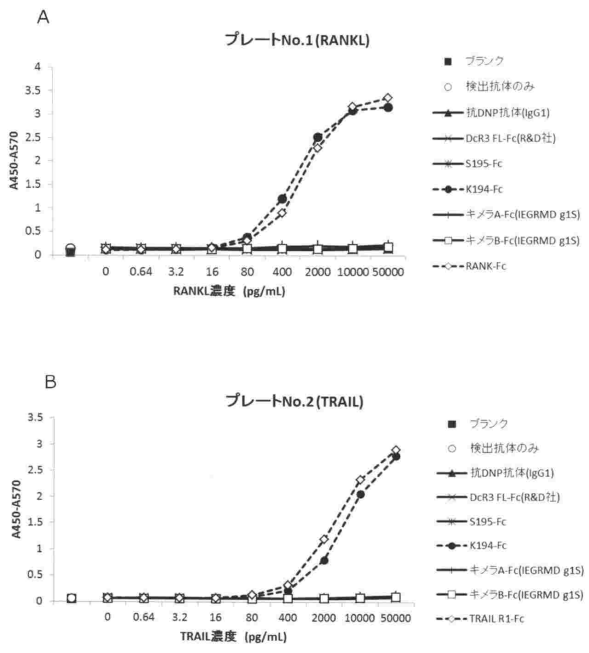
10

20

【図7】



【図8】

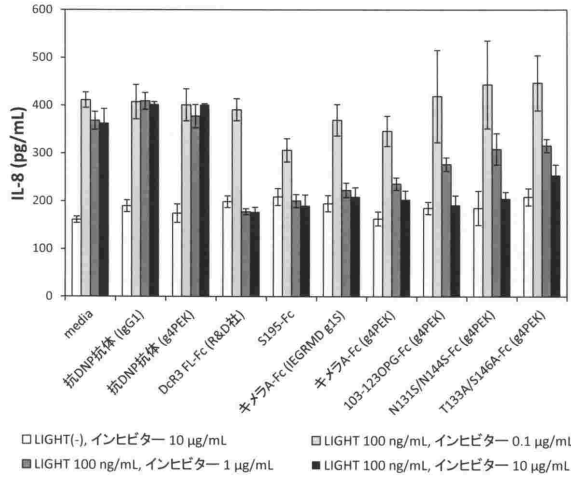


30

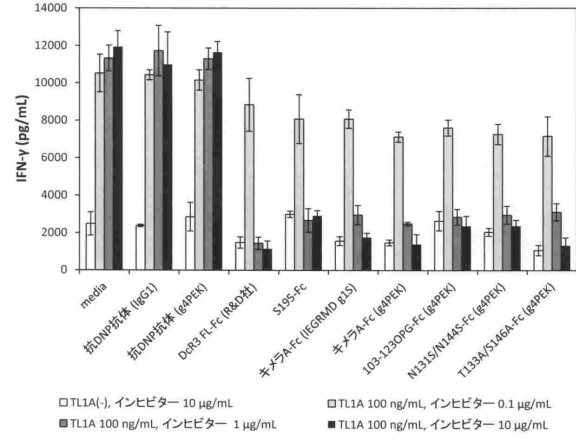
40

50

【 図 9 】

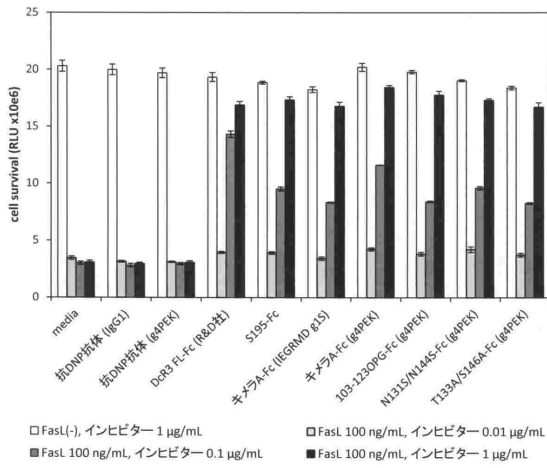


【 図 10 】

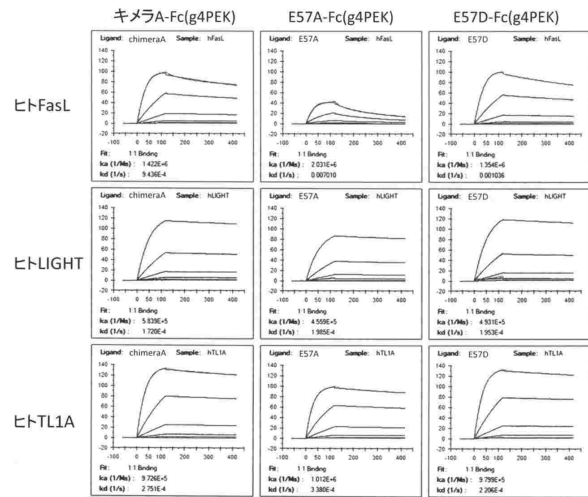


10

【 図 11 】



【 図 12 A 】



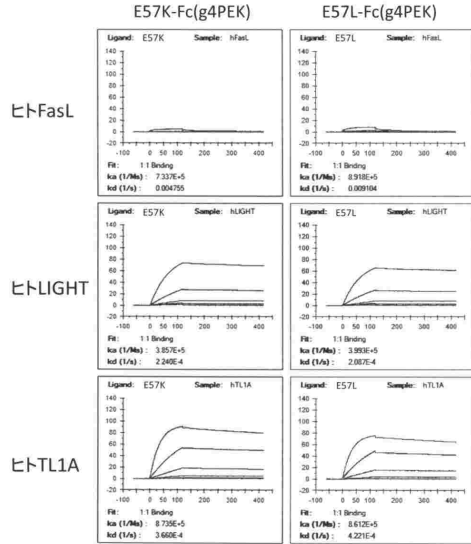
20

30

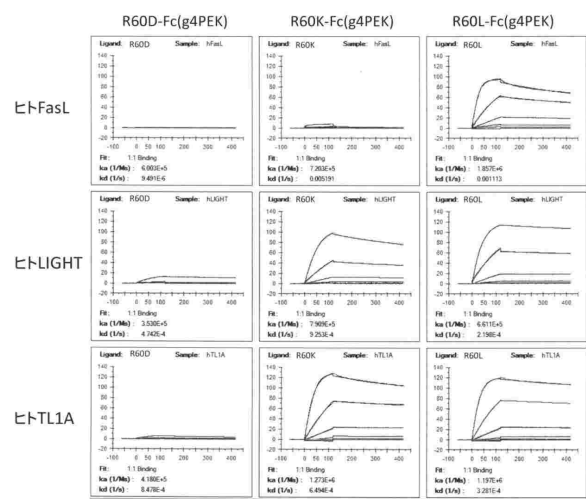
40

50

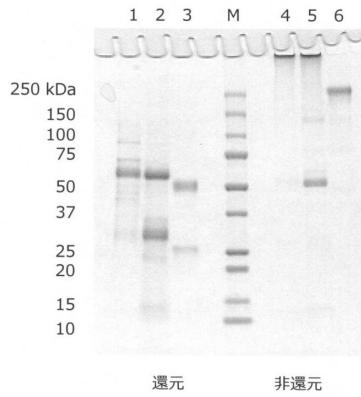
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 1 3】



【図 1 4 A】

変異番号	変異導入部位	単量体 (%)	凝集体 (%)	分解物 (%)
45-1	E57K_W53D	85.8	14.2	0.0
45-2	E57K_W53N	77.7	22.3	0.0
45-3	E57K_N54D	78.6	20.2	1.3
45-4	E57K_Y55T	98.3	1.7	0.0
45-5	E57K_Y55D	97.3	2.7	0.0
45-6	E57K_Y55Q	97.5	2.5	0.0
45-7	E57K_L56D	97.6	2.4	0.0
45-8	E57K_L56Q	97.2	2.8	0.0
45-9	E57K_L56T	94.7	5.3	0.0
45-10	E57K_R58D	93.4	6.6	0.0
45-11	E57K_R58T	97.2	2.8	0.0
45-12	E57K_R58P	74.3	25.7	0.0
45-13	E57K_Y59E	93.7	6.3	0.0
45-14	E57K_L56E	94.0	6.0	0.0
45-15	E57K_L56G	91.5	8.5	0.0
45-16	E57K_L56N	96.2	3.3	0.6
45-17	E57K_L56P	38.6	59.5	2.6
45-18	E57K_R58E	93.4	6.6	0.0
46-1	E57L_L56D	93.7	6.3	0.0
46-2	E57L_L56E	92.9	7.1	0.0
46-3	E57L_R58D	64.0	36.0	0.0
46-4	E57L_R58E	84.7	15.4	0.0
82-1	E57R_Y55D	96.2	3.8	0.0
82-2	E57R_L56D	97.1	2.9	0.0
82-3	E57R_L56E	96.6	3.4	0.0
82-4	E57R_L56P	41.3	55.7	3.0
82-5	E57R_R58D	88.4	11.6	0.0
85-1	E57V_N54D	58.1	40.2	1.8
85-2	E57V_Y55T	97.6	2.4	0.0
85-3	E57V_L56D	98.1	1.9	0.0
85-4	E57V_L56T	88.3	11.7	0.0
85-5	E57V_R58D	81.0	19.0	0.0
85-6	E57V_R58T	89.4	10.2	0.5
85-7	E57V_L56E	93.0	7.0	0.0
85-8	E57V_R58E	80.3	19.7	0.0

10

20

30

40

50

【 1 4 B 】

アミノ酸置換体	Fc配列	単量体 (%)	凝集体 (%)	分解物 (%)
E57K	Eg1S YTE	78.4	21.6	0.0
	Eg1S N434A	78.6	20.4	1.0
	Eg1S LALAGA N434A	77.2	21.7	1.1
	g1S YTE	75.9	24.1	0.0
	g1S N434A	77.0	22.6	0.4
E57R	g1S LALAGA N434A	80.9	19.1	0.0
	Eg1S YTE	77.0	23.0	0.0
	Eg1S N434A	75.3	23.6	1.1
	Eg1S LALAGA N434A	78.1	20.8	1.1
	g1S YTE	74.9	24.7	0.4
E57V	g1S N434A	76.1	23.4	0.4
	g1S LALAGA N434A	80.9	18.7	0.3
	Eg1S YTE	61.8	37.7	0.5
	Eg1S N434A	63.6	35.0	1.4
	Eg1S LALAGA N434A	63.0	35.6	1.4
45-10	g1S YTE	64.6	34.8	0.6
	g1S N434A	62.3	37.0	0.7
	g1S LALAGA N434A	66.1	33.2	0.7
	Eg1S YTE	67.5	32.5	0.0
	Eg1S N434A	70.4	29.6	0.0
45-18	Eg1S LALAGA N434A	69.2	29.8	1.0
	g1S YTE	72.5	27.5	0.0
	g1S N434A	62.8	36.5	0.8
	g1S LALAGA N434A	73.6	26.4	0.0
	Eg1S YTE	82.4	17.6	0.0
キメラA	Eg1S N434A	85.0	15.0	0.0
	Eg1S LALAGA N434A	84.4	15.6	0.0
	g1S YTE	85.8	14.2	0.0
	g1S N434A	68.7	31.3	0.0
	g1S LALAGA N434A	88.0	12.0	0.0

【 1 4 C 】

DcR3改変体	Fc配列	単量体 (%)	凝集体 (%)	分解物 (%)
キメラA	Eg1S YTE	87.9	11.2	0.9
	Eg1S N434A	88.7	10.7	0.6
	Eg1S LALAGA	91.3	8.3	0.4
	Eg1S LALAGA N434A	87.6	12.0	0.5
	g1S YTE	78.9	21.1	0.0
	g1S N434A	79.2	20.8	0.0
	g1S LALAGA	79.6	20.4	0.0
g1S LALAGA N434A	78.7	21.3	0.0	

10

【 1 5 A 】

	ENLIGHT		ENTLIA		ENFBSL	
	$k_p$ (1/Ms) $\times 10^6$	$K_D$ (nM)	$k_p$ (1/Ms) $\times 10^6$	$K_D$ (nM)	$k_p$ (1/Ms) $\times 10^6$	$K_D$ (nM)
DcR3-Fc	1.0	2.2	1.3	2.8	0.52	4.8
S195-g1S	1.3	5.5	3.6	14	0.73	9.9
ChimeraA g4PEK	1.7	3.2	2.9	4.1	1.3	7.0
ChimeraA g1Sb	1.6	2.9	2.9	3.6	1.2	8.0
ChimeraA Eg1S	1.6	2.8	2.8	3.2	1.2	7.7

【 1 5 B 】

	ENLIGHT		ENTLIA		ENFBSL	
	$k_p$ (1/Ms) $\times 10^6$	$K_D$ (nM)	$k_p$ (1/Ms) $\times 10^6$	$K_D$ (nM)	$k_p$ (1/Ms) $\times 10^6$	$K_D$ (nM)
E57K g4PEK	0.87	2.9	1.9	6.8	0.16	5.1
E57L g4PEK	1.1	3.1	2.4	6.7	0.23	5.8
E57R g4PEK	0.85	3.3	2.0	8.3	0.16	5.1
E57V g4PEK	1.2	3.7	2.7	6.7	0.25	5.9
45-10 g4PEK	1.5	3.7	3.1	6.8	0.16	3.3
45-18 g4PEK	1.4	3.2	2.7	5.2	0.19	3.4
82-5 g4PEK	1.5	4.1	2.9	6.9	0.17	3.8

20

30

40

50

【 図 1 6 A 】

	ヒト LIGHT	ヒト TL1A	ヒト FasL
キメラA-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57A-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57D-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57K-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57L-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57C-Fc (g4PEK)	-	-	-
E57F-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57G-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57H-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57I-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57M-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57N-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57P-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57Q-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57R-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57S-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57T-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57V-Fc (g4PEK)	+	+	-
E57W-Fc (g4PEK)	+	+	+
E57Y-Fc (g4PEK)	-	+	+

+: KD値の倍率 < 3  
 -: KD値の倍率 > 3, または Rmax < 5  
 Fc配列は全てg4PEK

【 図 1 6 B 】

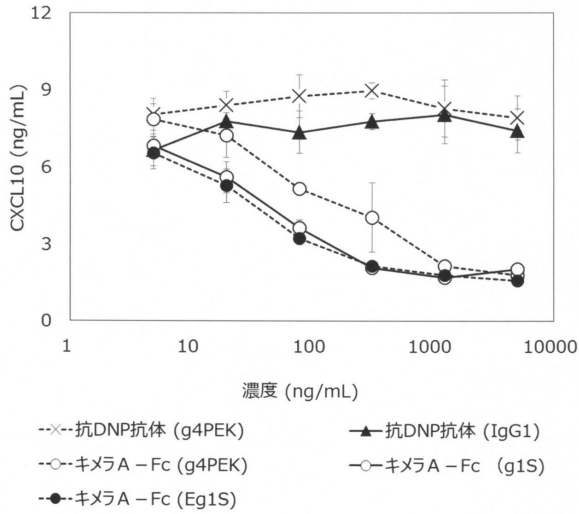
	ヒト LIGHT	ヒト TL1A	ヒト FasL
キメラA-Fc (g4PEK)	+	+	+
45-1	-	-	-
45-2	-	-	+
45-3	-	-	-
45-4	-	+	-
45-5	-	-	-
45-6	-	-	-
45-7	-	+	-
45-8	-	-	-
45-9	-	+	-
45-10	+	+	-
45-11	+	+	-
45-12	-	-	+
45-13	-	-	-
45-14	-	+	-
45-15	-	+	-
45-16	-	-	-
45-17	-	-	-
45-18	+	+	-
46-1	-	-	-
46-2	-	+	-
46-3	-	-	-
46-4	+	+	-
82-1	-	-	-
82-2	-	-	-
82-3	-	+	-
82-4	-	-	-
82-5	+	+	-
85-1	-	-	-
85-2	-	-	-
85-3	-	+	-
85-4	-	+	-
85-5	-	+	-
85-6	+	+	-
85-7	-	+	-
85-8	+	+	-

+: KD値の倍率 < 3  
 -: KD値の倍率 > 3, または Rmax < 5  
 Fc配列は全てg4PEK

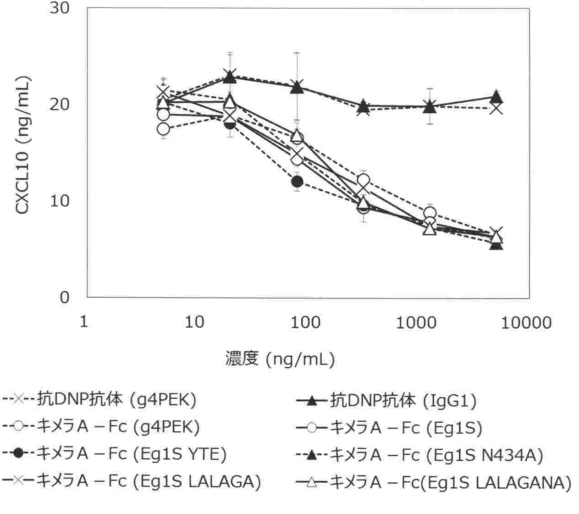
10

20

【 図 1 7 A 】



【 図 1 7 B 】

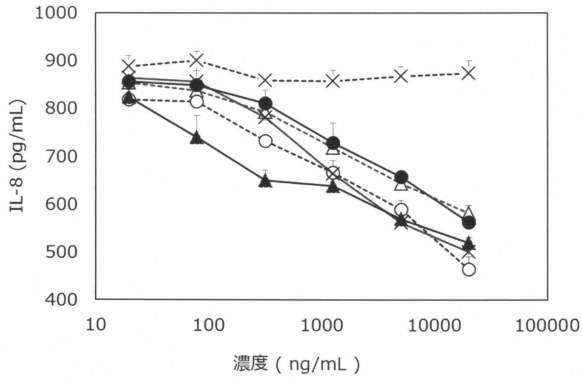


30

40

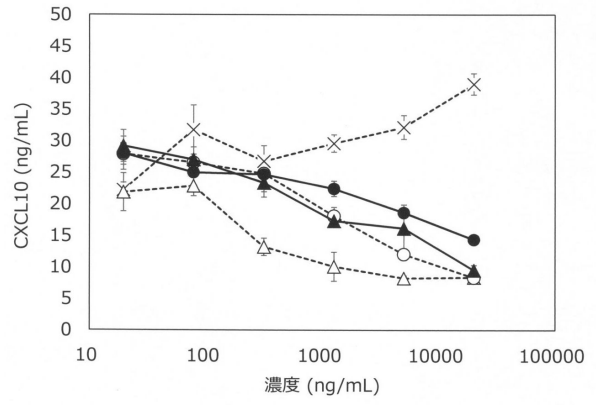
50

【図 17C】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- o-- E57K-Fc (g4PEK)
- E57R-Fc (g4PEK)
- △-- キメラA-Fc (g4PEK)
- × E57L-Fc (g4PEK)
- ▲ E57V-Fc (g4PEK)

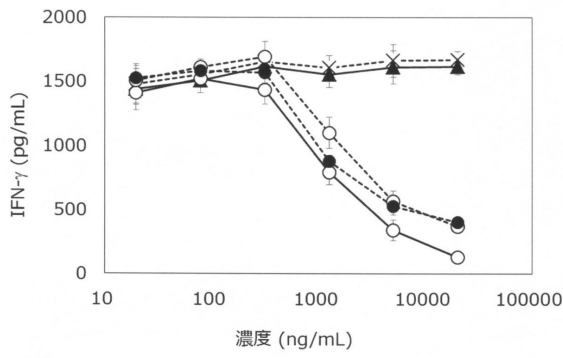
【図 17D】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- o-- 45-10-Fc (g4PEK)
- 82-5-Fc (g4PEK)
- △-- キメラA-Fc (g4PEK)
- ▲ 45-18-Fc (g4PEK)
- 82-5-Fc (g4PEK)

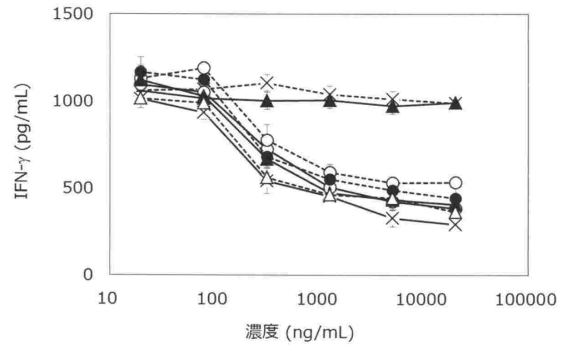
10

【図 18A】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- キメラA-Fc (g4PEK)
- キメラA-Fc (Eg1S)
- ▲ 抗DNP抗体 (IgG1)
- キメラA-Fc (g1S)

【図 18B】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- キメラA-Fc (g4PEK)
- キメラA-Fc (Eg1S YTE)
- × キメラA-Fc (Eg1S LALAGA)
- ▲ 抗DNP抗体 (IgG1)
- キメラA-Fc (Eg1S)
- ▲ キメラA-Fc (Eg1S N434A)
- △ キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)

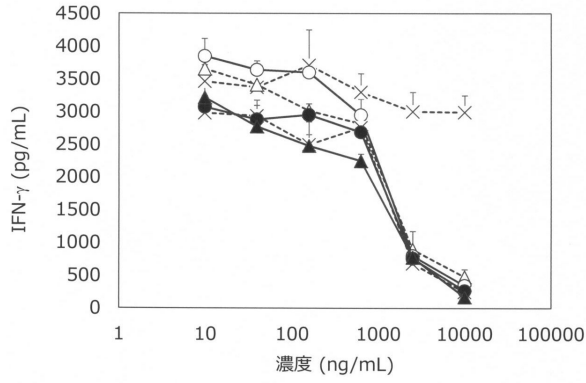
20

30

40

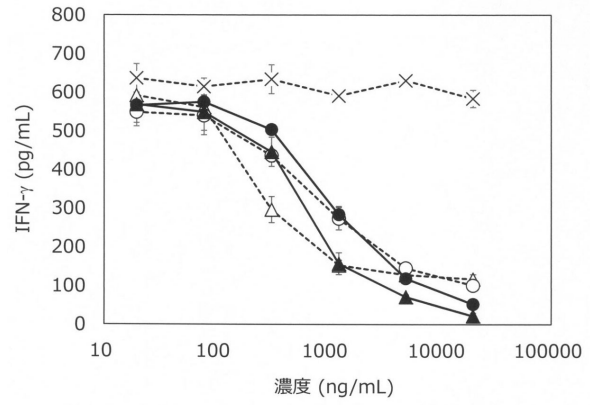
50

【図 18 C】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- △-- キメラA-Fc (g4PEK)
- E57K-Fc (g4PEK)
- x-- E57L-Fc (g4PEK)
- E57R-Fc (g4PEK)
- ▲ E57V-Fc (g4PEK)

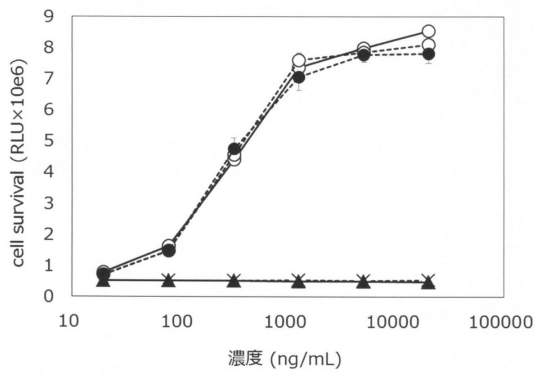
【図 18 D】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- △-- キメラA-Fc (g4PEK)
- 45-10-Fc (g4PEK)
- ▲ 45-18-Fc (g4PEK)
- 82-5-Fc (g4PEK)

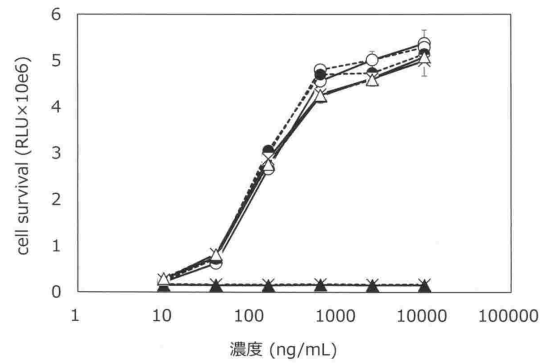
10

【図 19 A】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- ▲ 抗DNP抗体 (IgG1)
- キメラA-Fc (g4PEK)
- キメラA-Fc (g1S)
- キメラA-Fc (Eg1S)
- ▲ キメラA-Fc (g1S)

【図 19 B】



- x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)
- ▲ 抗DNP抗体 (IgG1)
- キメラA-Fc (g4PEK)
- キメラA-Fc (Eg1S)
- キメラA-Fc (Eg1S YTE)
- ▲ キメラA-Fc (Eg1S N434A)
- × キメラA-Fc (Eg1S LALAGA)
- △-- キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)

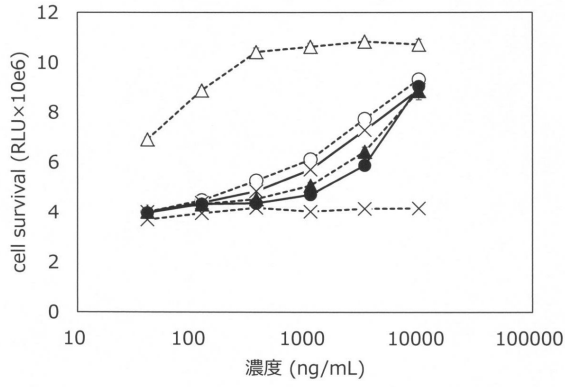
20

30

40

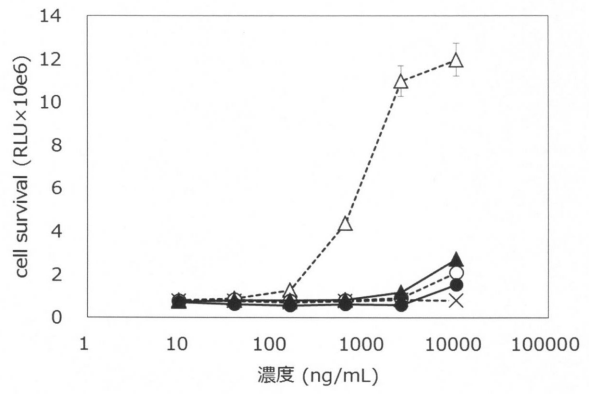
50

【図 19 C】



--x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)      --△-- キメラ-Fc (g4PEK)  
 --○-- E57K-Fc (g4PEK)      --x-- E57L-Fc (g4PEK)  
 ● E57R-Fc (g4PEK)      --▲-- E57V-Fc (g4PEK)

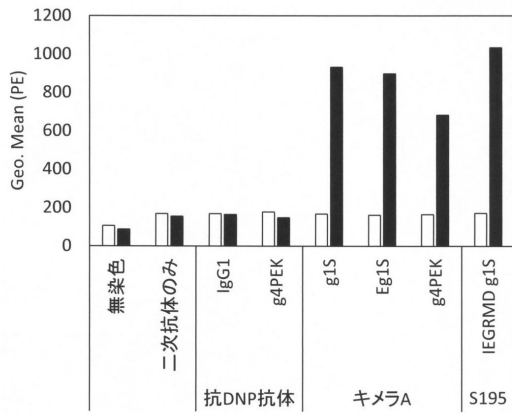
【図 19 D】



--x-- 抗DNP抗体 (g4PEK)      --△-- キメラ-Fc (g4PEK)  
 --○-- 45-10-Fc (g4PEK)      ▲ 45-18-Fc (g4PEK)  
 ● 82-5-Fc (g4PEK)

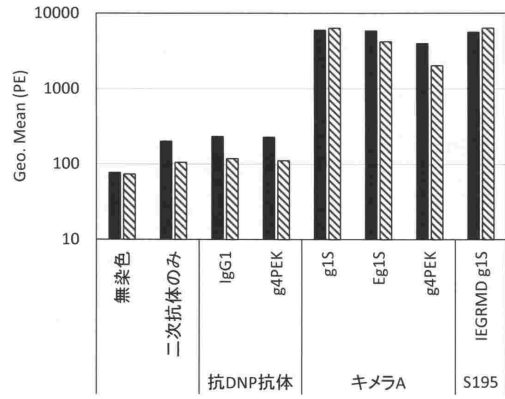
10

【図 20 A】



□ 293    ■ LIGHT\_293

【図 20 B】



■ TL1A\_CHO    ▨ FasL\_CHO

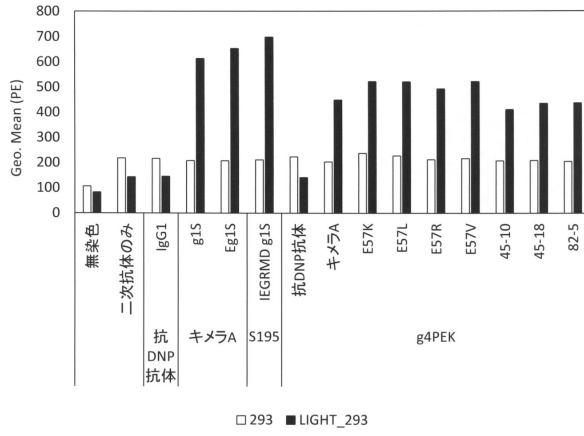
20

30

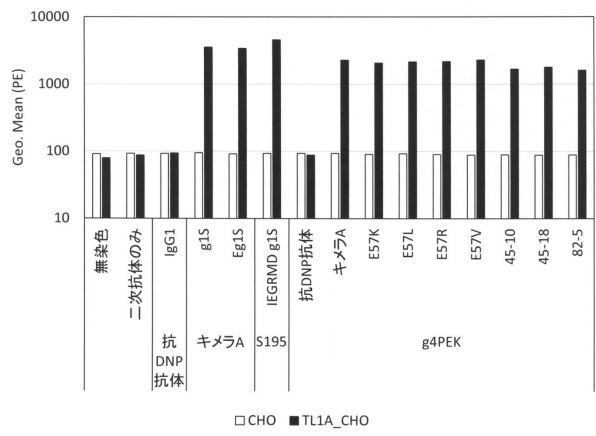
40

50

【図 2 1 A】

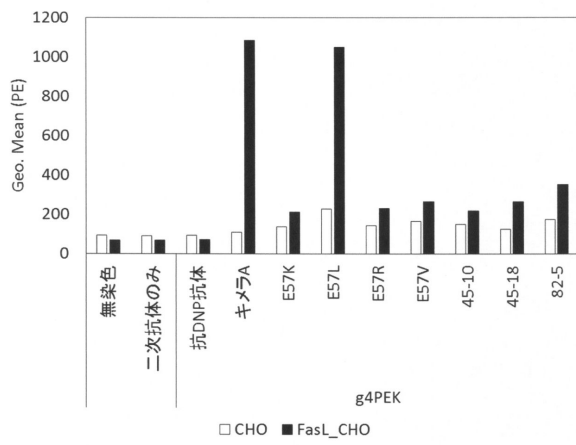


【図 2 1 B】

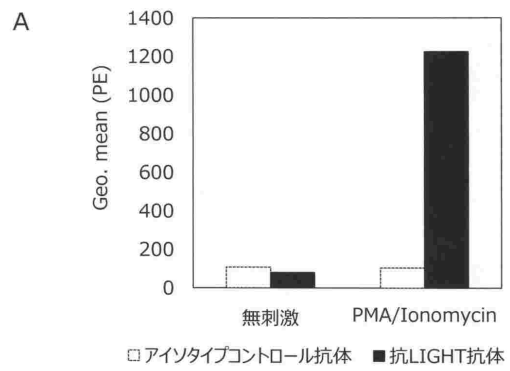


10

【図 2 1 C】

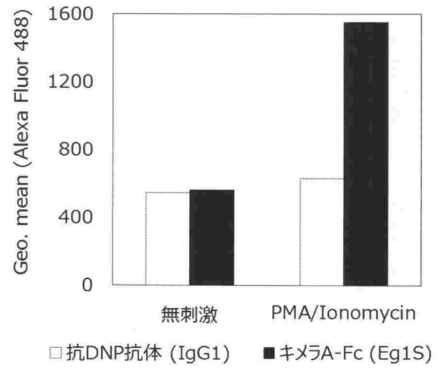


【図 2 2】



20

B

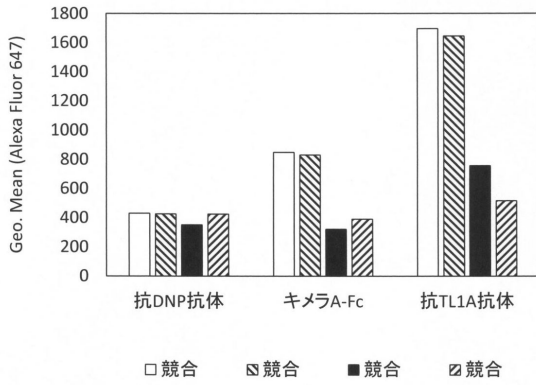


30

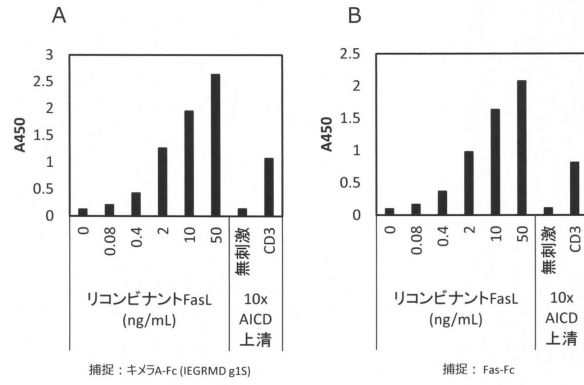
40

50

【図 2 3】



【図 2 4】



10

【図 2 5】

	溶出時間(分)
キメラA-Fc (g1S)	37.3
キメラA-Fc (Eg1S)	37.5
キメラA-Fc (Eg1S YTE)	37.8
キメラA-Fc (Eg1S N434A)	38.1
キメラA-Fc (Eg1S LALAGA)	37.5
キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)	38.1
キメラA-Fc (g4PEK)	38.2
E57K-Fc (g4PEK)	37.5
E57L-Fc (g4PEK)	38.5
E57R-Fc (g4PEK)	37.7
E57V-Fc (g4PEK)	38.4
45-10-Fc (g4PEK)	38.5
45-18-Fc (g4PEK)	38.3
82-5-Fc (g4PEK)	38.7

【図 2 6】

	Tm1	Tm2
キメラA-Fc (g1S)	67.3	82.5
キメラA-Fc (Eg1S)	66.5	82.0
キメラA-Fc (Eg1S YTE)	59.7	82.0
キメラA-Fc (Eg1S N434A)	66.0	80.0
キメラA-Fc (Eg1S LALAGA)	66.5	81.5
キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)	66.0	79.0
キメラA-Fc (g4PEK)	61.5	82.5
E57K-Fc (g4PEK)	61.2	83.0
E57L-Fc (g4PEK)	61.0	83.0
E57R-Fc (g4PEK)	61.5	83.0
E57V-Fc (g4PEK)	61.0	83.0
45-10-Fc (g4PEK)	62.0	82.5
45-18-Fc (g4PEK)	62.0	82.7
82-5-Fc (g4PEK)	61.7	83.0

20

【図 2 7】

	血中半減期 (h)	AUC 0-∞ (μg*h/mL)
キメラA-Fc (Eg1S)	95.4	3070
E57K-Fc (g4PEK)	69.9	4490
E57L-Fc (g4PEK)	83.9	3390
E57R-Fc (g4PEK)	89.1	4460
E57V-Fc (g4PEK)	62.2	3580
45-10-Fc (g4PEK)	122	9990
45-18-Fc (g4PEK)	144	10800
82-5-Fc (g4PEK)	108	9410

【図 2 8 A】

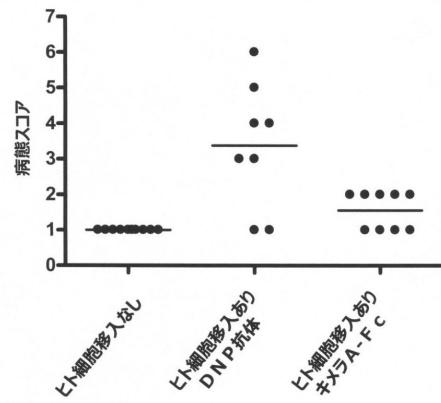
スコア	毛並み	活動	腸管発赤	体重低下
0	異常なし	異常なし	無し	15% 未満
1	軽度の毛羽立ち	軽度の活動低下	部分的に発赤 (2cm以内)	15~20%
2	重度の毛羽立ち	重度の活動低下	広範囲の発赤 (2cm以上)	20%以上

30

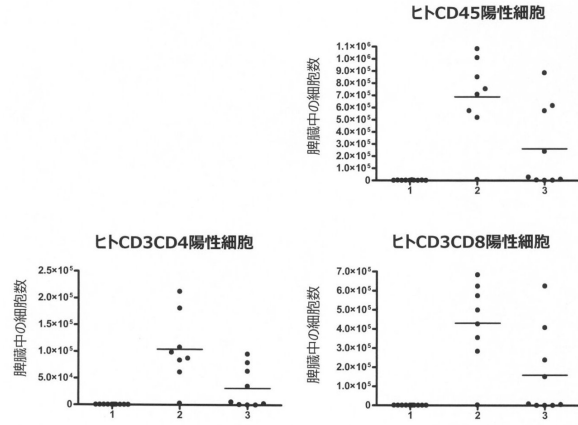
40

50

【図28B】



【図29】



【図30A】

	E1LIGHT			E3TL1A			E1FasL		
	$k_d$ (1/Mg) 1/E4+06	$k_a$ (1/s) 1/E4-04	$K_D$ (nM)	$k_d$ (1/Mg) 1/E4+06	$k_a$ (1/s) 1/E4-04	$K_D$ (nM)	$k_d$ (1/Mg) 1/E4+06	$k_a$ (1/s) 1/E4-04	$K_D$ (nM)
#Y3A-Fc (Eg15)	0.88	1.8	0.21	2.1	2.5	0.12	2.3	21	0.93
#Y3A-Fc (Eg15 YTE)	0.85	2.3	0.27	2.2	3.4	0.18	1.5	18	1.2
#Y3A-Fc (Eg15 N43A)	0.90	1.8	0.20	2.2	2.9	0.13	2.3	19	0.82
#Y3A-Fc (Eg15 LALAGA)	0.88	1.7	0.19	2.1	2.4	0.12	2.5	21	0.83
#Y3A-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.89	1.8	0.20	2.2	2.5	0.12	2.5	19	0.79
E57K-Fc (Eg15 YTE)	0.52	2.0	0.38	1.5	4.3	0.28	0.57	25	4.3
E57K-Fc (Eg15 N43A)	0.54	2.0	0.37	1.6	3.9	0.24	0.63	24	3.8
E57K-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.54	1.8	0.34	1.6	3.9	0.24	0.98	32	3.3
E57K-Fc (Eg15 YTE)	0.58	2.3	0.39	1.5	4.8	0.33	0.53	27	5.1
E57K-Fc (Eg15 N43A)	0.58	2.0	0.35	1.6	4.7	0.30	0.60	25	4.1
E57K-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.58	2.2	0.38	1.6	4.8	0.31	0.54	25	4.6
E57K-Fc (Eg15 YTE)	0.76	2.6	0.35	2.1	4.9	0.24	0.48	25	5.3
E57K-Fc (Eg15 N43A)	0.62	2.0	0.33	1.8	4.3	0.23	0.51	29	5.6
E57K-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.62	2.1	0.33	1.9	4.3	0.23	0.55	28	5.2
E57K-Fc (Eg15 YTE)	0.58	2.3	0.40	1.8	4.5	0.25	0.51	29	5.7
45-10-Fc (Eg15 YTE)	0.78	2.4	0.31	2.1	4.5	0.21	0.53	22	4.1
45-10-Fc (Eg15 N43A)	0.78	2.3	0.30	2.1	4.3	0.20	0.49	22	4.6
45-10-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.76	2.5	0.33	2.1	4.1	0.20	0.41	23	5.6
45-10-Fc (Eg15 YTE)	0.80	2.1	0.28	2.1	3.7	0.18	0.51	20	3.9
45-10-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.78	2.2	0.29	2.1	3.3	0.16	0.45	21	4.8

【図30B】

	カタリザルLIGHT			カタリザルTL1A			カタリザルFasL		
	$k_d$ (1/Mg) 1/E4+06	$k_a$ (1/s) 1/E4-04	$K_D$ (nM)	$k_d$ (1/Mg) 1/E4+06	$k_a$ (1/s) 1/E4-04	$K_D$ (nM)	$k_d$ (1/Mg) 1/E4+06	$k_a$ (1/s) 1/E4-04	$K_D$ (nM)
#Y3A-Fc (Eg15)	0.81	1.7	0.21	2.6	2.8	0.11	1.5	4.1	0.22
#Y3A-Fc (Eg15 YTE)	0.73	2.0	0.28	2.6	4.4	0.17	2.0	5.2	0.27
#Y3A-Fc (Eg15 N43A)	0.81	1.7	0.21	2.7	3.1	0.12	2.0	4.4	0.22
#Y3A-Fc (Eg15 LALAGA)	0.81	1.6	0.20	2.6	2.8	0.11	2.0	4.2	0.21
#Y3A-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.81	1.7	0.21	2.6	3.0	0.11	2.1	4.4	0.22
E57K-Fc (Eg15 YTE)	0.77	2.0	0.26	1.5	4.6	0.31	3.3	35	1.1
E57K-Fc (Eg15 N43A)	0.51	2.0	0.39	1.6	4.3	0.27	3.5	39	1.0
E57K-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.75	2.1	0.28	1.6	4.3	0.27	3.9	44	1.1
E57K-Fc (Eg15 YTE)	0.69	2.1	0.30	1.4	4.9	0.36	3.4	39	1.2
E57K-Fc (Eg15 N43A)	0.63	1.8	0.31	1.5	4.9	0.33	4.0	42	1.0
E57K-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.81	2.4	0.29	1.5	4.8	0.32	3.9	45	1.1
E57K-Fc (Eg15 YTE)	0.66	2.2	0.34	2.4	5.4	0.22	3.5	37	1.1
E57K-Fc (Eg15 N43A)	0.59	1.8	0.30	2.0	4.2	0.21	3.2	35	1.1
E57K-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.56	2.0	0.35	2.0	4.2	0.21	3.3	36	1.1
45-10-Fc (Eg15 YTE)	0.73	2.3	0.31	1.8	4.6	0.25	2.8	32	1.2
45-10-Fc (Eg15 N43A)	0.71	2.3	0.32	2.4	4.7	0.19	3.4	35	1.0
45-10-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.71	2.1	0.30	2.5	4.8	0.19	3.5	34	0.96
45-10-Fc (Eg15 YTE)	0.65	2.3	0.35	2.3	4.9	0.21	3.4	40	1.2
45-10-Fc (Eg15 N43A)	0.74	1.8	0.25	2.4	3.9	0.16	5.6	60	1.1
45-10-Fc (Eg15 LALAGANA)	0.72	2.0	0.28	2.4	4.1	0.17	4.5	44	0.99

10

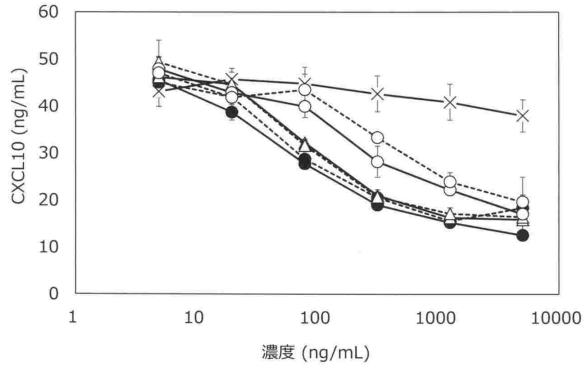
20

30

40

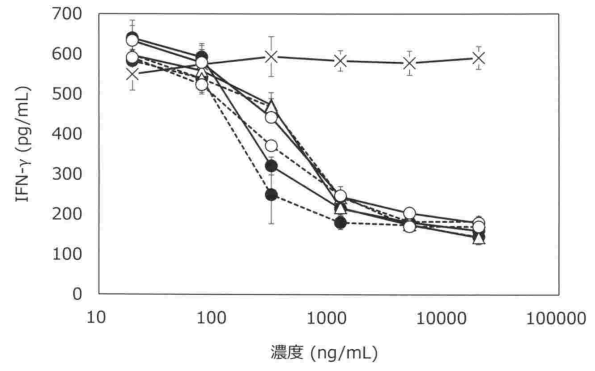
50

【 図 3 1 】



- ×— 抗DNP抗体 (IgG1)
- キメラA-Fc (Eg1S YTE)
- キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)
- △— E57K-Fc (Eg1S YTE)
- △— E57K-Fc (Eg1S LALAGANA)
- 45-18-Fc (Eg1S YTE)
- 45-18-Fc (Eg1S LALAGANA)

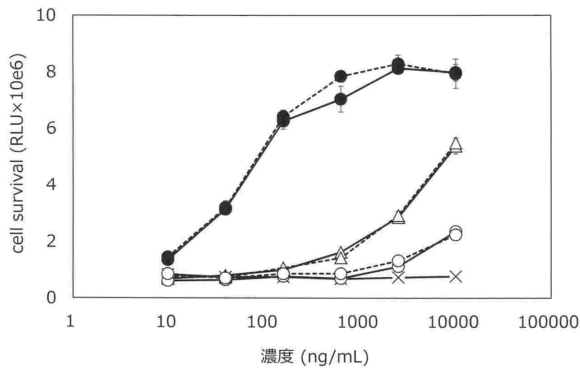
【 図 3 2 】



- ×— 抗DNP抗体 (IgG1)
- キメラA-Fc (Eg1S YTE)
- キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)
- △— E57K-Fc (Eg1S YTE)
- △— E57K-Fc (Eg1S LALAGANA)
- 45-18-Fc (Eg1S YTE)
- 45-18-Fc (Eg1S LALAGANA)

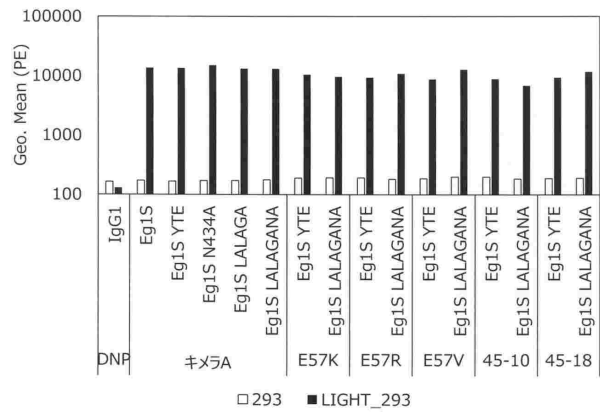
10

【 図 3 3 】



- ×— 抗DNP抗体 (IgG1)
- キメラA-Fc (Eg1S YTE)
- キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)
- △— E57K-Fc (Eg1S YTE)
- △— E57K-Fc (Eg1S LALAGANA)
- 45-18-Fc (Eg1S YTE)
- 45-18-Fc (Eg1S LALAGANA)

【 図 3 4 A 】



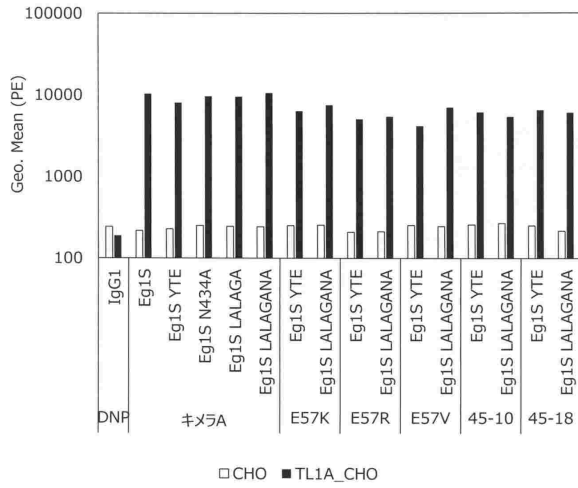
20

30

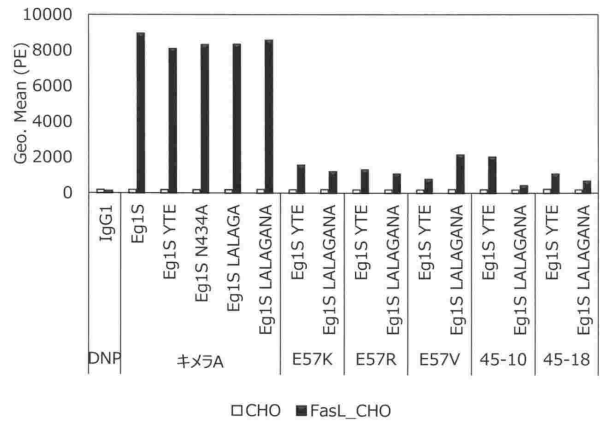
40

50

【 図 3 4 B 】

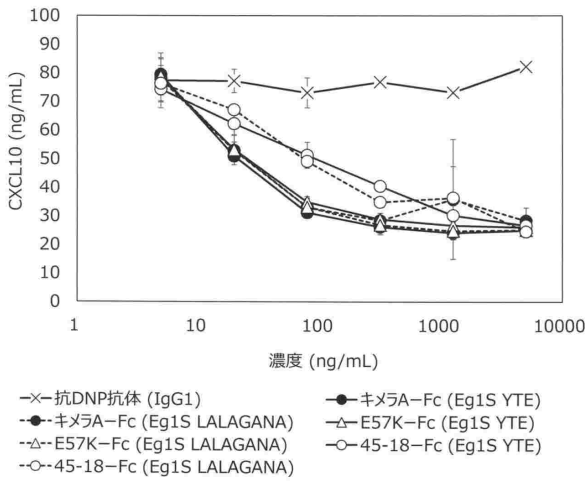


【 図 3 4 C 】

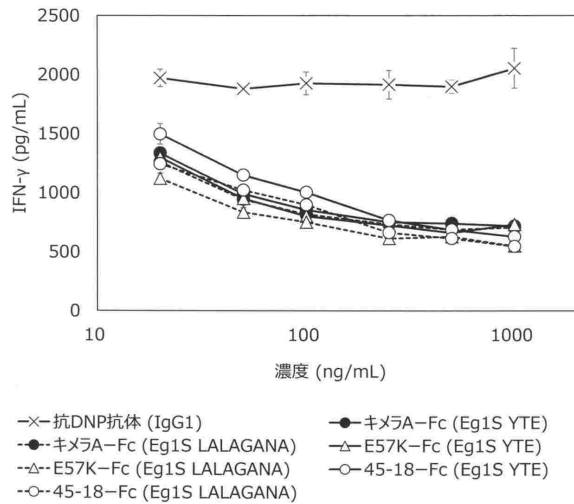


10

【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



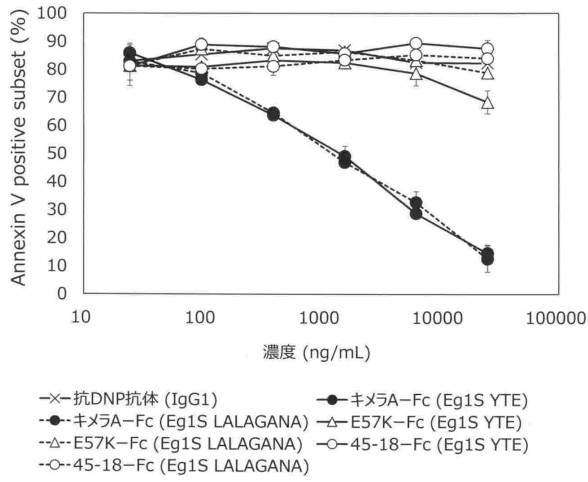
20

30

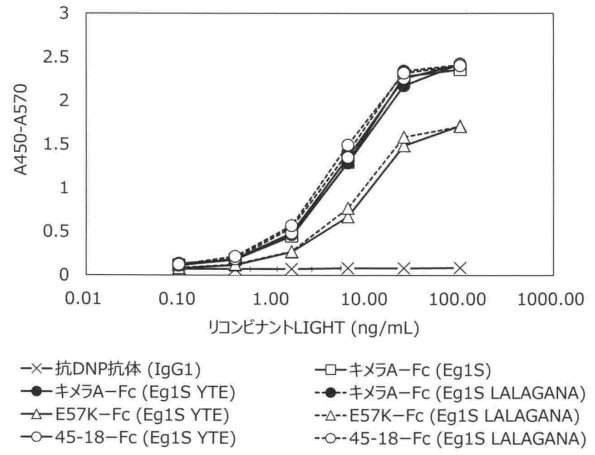
40

50

【 図 3 7 】

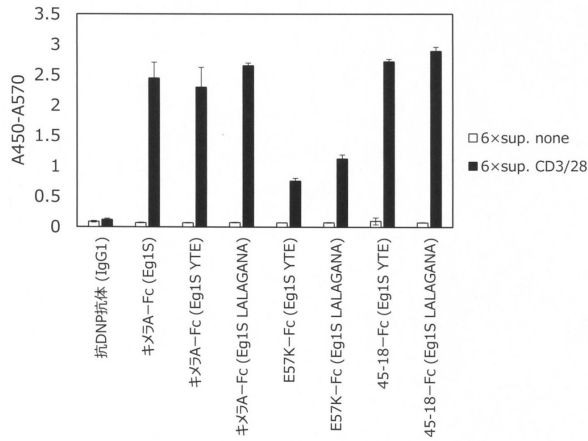


【 図 3 8 A 】

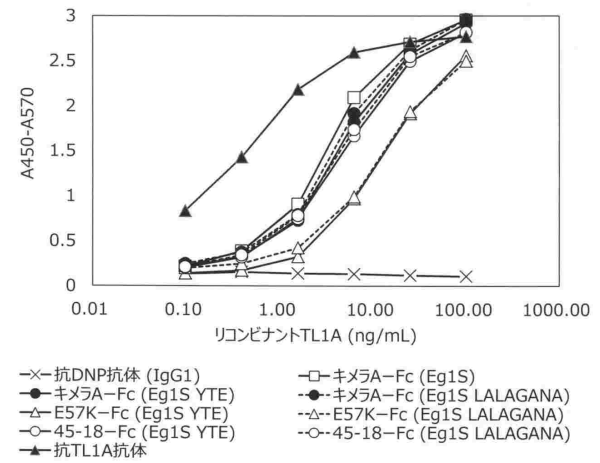


10

【 図 3 8 B 】



【 図 3 8 C 】



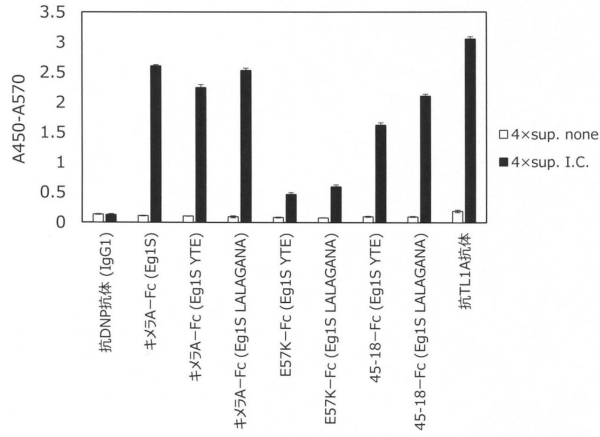
20

30

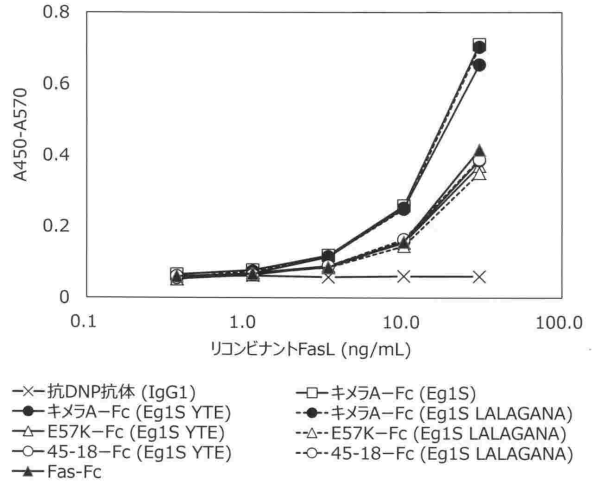
40

50

【 3 8 D 】

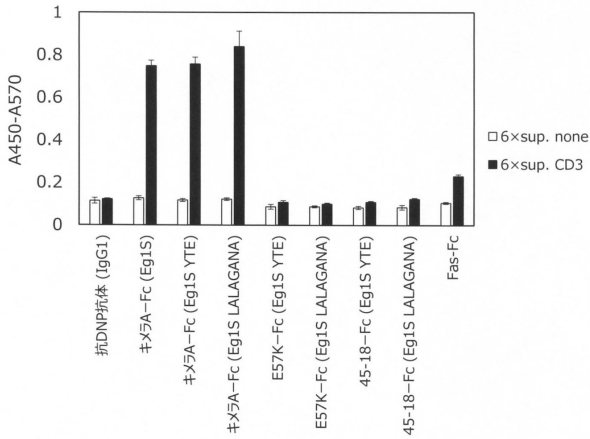


【 3 8 E 】



10

【 3 8 F 】



【 3 9 】


	血中半減期 (h)	AUC 0-∞ (μg*h/mL)
キメラA-Fc (Eg1S YTE)	35.2	2430
キメラA-Fc (Eg1S LALAGANA)	85.4	9360
E57K-Fc (Eg1S YTE)	63.9	986
E57K-Fc (Eg1S LALAGANA)	74.3	4030
45-18-Fc (Eg1S YTE)	36.0	2480
45-18-Fc (Eg1S LALAGANA)	92.4	12100

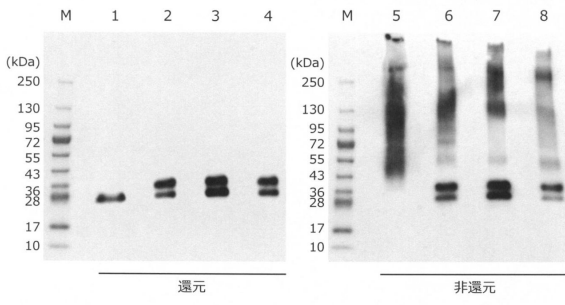
20

30

40

50

【 4 0】



10

【配列表】

0007679300000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	14/715 (2006.01)	C 0 7 K	14/715	
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C

## (56)参考文献 特表 2 0 0 1 - 5 1 6 5 8 1 ( J P , A )

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 9 / 0 0  
 A 6 1 K 3 8 / 1 6  
 A 6 1 P 2 9 / 0 0  
 A 6 1 P 3 7 / 0 6  
 A 6 1 P 3 7 / 0 8  
 C 0 7 K 1 4 / 7 1 5  
 C 0 7 K 1 6 / 0 0  
 C 1 2 N 1 / 1 5  
 C 1 2 N 1 / 1 9  
 C 1 2 N 1 / 2 1  
 C 1 2 N 5 / 1 0  
 C 1 2 N 1 5 / 1 2  
 C 1 2 N 1 5 / 6 2  
 C 1 2 N 1 5 / 6 3  
 C 1 2 P 2 1 / 0 2

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

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

U n i P r o t / G e n e S e q