

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-521822

(P2021-521822A)

(43) 公表日 令和3年8月30日 (2021.8.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-559408 (P2020-559408)	(71) 出願人	520409545 イミューン ターゲティング インク、 アメリカ合衆国 テキサス州 7 5 2 2 5 ダラス グリーンプライアー・ドライブ 4 3 0 5
(86) (22) 出願日	平成31年4月24日 (2019.4.24)	(74) 代理人	100082072 弁理士 清原 義博
(85) 翻訳文提出日	令和2年12月21日 (2020.12.21)	(72) 発明者	フー, ヤン-シン アメリカ合衆国 テキサス州 7 5 2 2 5 ダラス グリーンプライアー・ドライブ 4 3 0 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/028933	(72) 発明者	ベン, ファ 中華人民共和国 チャオヤン・ディストリ クト ナンバー6923 ダートン・ロー ド 1 5
(87) 国際公開番号	W02019/209965	最終頁に続く	
(87) 国際公開日	令和1年10月31日 (2019.10.31)		
(31) 優先権主張番号	201810376920.1		
(32) 優先日	平成30年4月25日 (2018.4.25)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		

(54) 【発明の名称】 インターロイキン12融合タンパク質および組成物、ならびにその治療方法

(57) 【要約】

本発明は、さまざまな疾患や障害（例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置する際に有用な、インターロイキン12とプロドラッグの新規な融合タンパク質、および組成物、ならびにその調製方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

融合タンパク質であって：

第 1 の構造単位：P 3 5 と P 4 0 のサブユニットから選択されたインターロイキン（I L 1 2）の 1 つまたは 2 つのサブユニットであって、ここで、第 1 の構造単位が融合タンパク質の N 末端に位置する、サブユニット；

第 2 の構造単位：抗体 F c フラグメントであって、第 2 の構造単位が融合タンパク質の C 末端に位置する、抗体 F c フラグメント；および、

第 1 の構造単位および第 2 の構造単位と共有結合するか、あるいは、第 1 の構造単位の 2 つのサブユニットと共有結合する第 1 のリンカーセグメント、
を含む、融合タンパク質。

10

【請求項 2】

P 3 5 と P 4 0 サブユニットは、ヒト、サル、マウス、イヌ、ラット、ウシ、ブタ、およびヒツジからなる群から選択された哺乳動物に由来する、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

哺乳動物はマウスである、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

哺乳動物はヒトである、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

抗体 F c フラグメントはヒト F c フラグメントを含む、請求項 1－4 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

20

【請求項 6】

抗体 F c フラグメントはヒト I g G 1 を含む、請求項 1－5 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

ヒト I g G 1 はヒト F c－ノブまたはヒト F c－ホールである、請求項 1－6 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

P 3 5 サブユニットは、SEQ ID No. 3 で記載されるアミノ酸配列を有する、
請求項 1－3 および 5－7 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

30

【請求項 9】

P 3 5 サブユニットは、SEQ ID No. 4 で記載されるアミノ酸配列を有する、
請求項 1、2、および 4－7 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

P 4 0 サブユニットは、SEQ ID No. 1 で記載されるアミノ酸配列を有する、
請求項 1－3 および 5－8 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

P 4 0 サブユニットは、SEQ ID No. 2 で記載されるアミノ酸配列を有する、
請求項 1、2、および 4－9 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

40

【請求項 12】

第 1 のリンカーセグメント（L 1）は、SEQ ID No. 12 で記載されるアミノ酸配列を有する、請求項 1－11 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

第 1 の構造単位の N 末端で修飾されたシグナルペプチドをさらに含む、請求項 1－12 のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

P 3 5 サブユニットの N 末端で修飾されたシグナルペプチドは、SEQ ID No. 27 で記載されるアミノ酸配列を含む第 1 のシグナルペプチド（SP 1）である、請求項 13 に記載の融合タンパク質。

50

【請求項 15】

P35 サブユニットのN末端で修飾されたシグナルペプチドは、SEQ ID No. 28で記載されるアミノ酸配列を含む第1のシグナルペプチド (SP1) である、請求項13に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

P40 サブユニットのN末端で修飾されたシグナルペプチドは、SEQ ID No. 29で記載されるアミノ酸配列を含む第2のシグナルペプチド (SP2) である、請求項13に記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

P40 サブユニットのN末端で修飾されたシグナルペプチドは、SEQ ID No. 30で記載されるアミノ酸配列を含む第2のシグナルペプチド (SP2) である、請求項13に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 18】

第1の構造単位のN末端に結合されたインターロイキン12受容体 (IL12R) のサブ配列；および、

IL12Rを第1の構造単位に共有結合する第2のリンカーセグメント (L2)、をさらに含む、請求項1-17のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

IL12Rは、IL12Rβ1 (Rβ1) と IL12Rβ2 (Rβ2) から選択される、請求項18に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 20】

第2のリンカーセグメントL2は、腫瘍微小環境で特異的に発現されたタンパク分解酵素によって認識および加水分解可能である、請求項18または19に記載の融合タンパク質。

【請求項 21】

Rβ1は、SEQ ID No. 8で記載されるアミノ酸配列を含み、および、Rβ2はSEQ ID No. 10で記載されるアミノ酸配列を含む、請求項19または20に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

Rβ1は、SEQ ID No. 9で記載されるアミノ酸配列を含み、および、Rβ2はSEQ ID No. 11で記載されるアミノ酸配列を含む、請求項19または20に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 23】

腫瘍微小環境で特異的に発現されたタンパク分解酵素は、マトリックスメタロプロテイナーゼである、請求項20-22のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

マトリックスメタロプロテイナーゼは、マトリックスメタロプロテイナーゼ14 (MMP14) である、請求項23に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

リンカーセグメントL2は、SEQ ID No. 13-26で記載されるアミノ酸配列を含む、請求項18-24のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

40

【請求項 26】

IL12RのC末端は、リンカーセグメントL2を介して第1の構造単位のN末端に結合され；および、

第1の構造単位のC末端と第2の構造単位のN末端は、リンカーセグメントL1を介して結合され；

第1の構造単位が2つのサブユニットを含む場合、第1のサブユニットのC末端と第2のサブユニットのN末端は、リンカーセグメントL1によって結合される、請求項18-25のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【請求項 27】

50

請求項 1-26 のいずれか 1 つの融合タンパク質を含む、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項 28】

P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、P35 サブユニット、リンカーセグメント L1、ヒト IgG1 の融合タンパク質を含む単量体のホモ二量体であり、および SEQ ID No. 31 で記載されるアミノ酸配列を有する、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項 29】

P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、P35 サブユニット、リンカーセグメント L1、ヒト IgG1 の融合タンパク質を含む単量体のホモ二量体であり、および SEQ ID No. 32 で記載されるアミノ酸配列を有する、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

10

【請求項 30】

第 1 の単量体：P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、およびヒト Fc ノブを含み、SEQ ID No. 18 で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質と、

第 2 の単量体：リンカーセグメント L1、およびヒト Fc ホールを含む P35 サブユニットを含み、SEQ ID No. 35 で記載されるアミノ酸配列構造を有する、融合タンパク質と、

のヘテロ二量体である、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

20

【請求項 31】

第 1 の単量体：P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、およびヒト Fc ノブを含み、SEQ ID No. 18 で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質と、

第 2 の単量体：リンカーセグメント L1、およびヒト Fc ホールを含む P35 サブユニットを含み、SEQ ID No. 36 で記載されるアミノ酸配列構造を有する、融合タンパク質と、

のヘテロ二量体である、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項 32】

IL12Rβ1、リンカーセグメント L2、P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、P35 サブユニット、リンカーセグメント L1、およびヒト IgG1 であり、ならびに、SEQ ID No. 37 で記載されるアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

30

【請求項 33】

IL12Rβ1、リンカーセグメント L2、P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、P35 サブユニット、リンカーセグメント L1、およびヒト IgG1 であり、ならびに、SEQ ID No. 38 で記載されるアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項 34】

IL12Rβ1、リンカーセグメント L2、P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、P35 サブユニット、リンカーセグメント L1、およびヒト IgG1 であり、ならびに、SEQ ID No. 39 で記載されるアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

40

【請求項 35】

IL12Rβ1、リンカーセグメント L2、P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、P35 サブユニット、リンカーセグメント L1、およびヒト IgG1 であり、ならびに、SEQ ID No. 40 で記載されるアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である、請求項 27 に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項 36】

Rβ1、リンカーセグメント L2、P40 サブユニット、リンカーセグメント L1、ヒ

50

トFc-ノブの融合タンパク質であり、および、SEQ ID 41で記載されるアミノ酸配列を有する、第1の単量体と、

Rβ2の融合タンパク質、リンカーセグメントL2、P35サブユニット、リンカーセグメントL1、およびIL12のヒトFc-ホールであり、ならびにSEQ ID No. 43で記載されるアミノ酸配列を有する、第2の単量体と、
のヘテロ二量体である、請求項27に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項37】

Rβ1、リンカーセグメントL2、P40サブユニット、リンカーセグメントL1、ヒトFc-ノブの融合タンパク質であり、および、SEQ ID No. 42で記載されるアミノ酸配列を有する、第1の単量体と、

Rβ2の融合タンパク質、リンカーセグメントL2、P35サブユニット、リンカーセグメントL1、および、IL12のヒトFc-ホールであり、ならびにSEQ ID No. 44で記載されるアミノ酸配列を有する、第2の単量体と、
のヘテロ二量体である、請求項27に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項38】

Rβ1、リンカーセグメントL2、P40サブユニット、リンカーセグメントL1、ヒトFc-ノブの融合タンパク質であり、および、SEQ ID No. 45で記載されるアミノ酸配列を有する、第1の単量体と、

シグナルペプチドSP1を含むP35サブユニット、リンカーセグメントL1、ヒトFc-ホールを含み、およびSEQ ID No. 47で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質、である第2の単量体と、
のヘテロ二量体である、請求項27に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項39】

Rβ1、リンカーセグメントL2、P40サブユニット、リンカーセグメントL1、ヒトFc-ノブの融合タンパク質であり、SEQ ID No. 46で記載されるアミノ酸配列を有する、第1の単量体と、

シグナルペプチドSP1を含むP35サブユニット、リンカーセグメントL1、ヒトFc-ホールを含み、およびSEQ ID No. 48で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質である、第2の単量体と、
のヘテロ二量体である、請求項27に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項40】

第1の単量体：P40サブユニット、リンカーセグメントL1、およびヒトFc-ノブを含み、SEQ ID No. 49で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質と、

第2の単量体：Rβ2、リンカーセグメントL2、P35サブユニット、リンカーセグメントL1、および、ヒトFc-ホールを含み、ならびにSEQ ID No. 51で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質と、
のヘテロ二量体である、請求項27に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項41】

第1の単量体：P40サブユニット、リンカーセグメントL1、およびヒトFc-ノブを含み、SEQ ID No. 50で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質と、

第2の単量体：Rβ2、リンカーセグメントL2、P35サブユニット、リンカーセグメントL1、および、ヒトFc-ホールを含み、ならびにSEQ ID No. 52で記載されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質と、
のヘテロ二量体である、請求項27に記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項42】

腫瘍微小環境で特異的に発現されたタンパク分解酵素によって加水分解される、請求項27-41のいずれか1つに記載のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質。

【請求項43】

請求項 1－4 2 のいずれかの実質的に精製されたタンパク質。

【請求項 4 4】

請求項 1－4 3 のいずれか 1 つのタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4 5】

請求項 4 4 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 4 6】

請求項 1－4 3 のいずれか 1 つのタンパク質、および、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項 4 7】

疾患または状態を処置するための方法であって、

10

治療上有効な量の請求項 1－4 3 のいずれか 1 つのタンパク質、または請求項 4 6 の医薬組成物を、それを必要としている患者に投与する工程を含み、
ここで、疾患または状態は、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍から選択される、方法。

【請求項 4 8】

化学療法、放射線療法、標的療法、または免疫療法の 1 つ以上を前記被験体に施す工程を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

化学療法剤を投与する工程を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

20

放射線療法を施す工程を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

疾患または障害を処置または軽減するための請求項 1－4 3 のいずれか 1 つのタンパク質の使用。

【請求項 5 2】

疾患または障害を処置または軽減するための薬剤の調製における、請求項 1－4 3 のいずれか 1 つのタンパク質、および薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤の使用。

【請求項 5 3】

疾患または障害は、頭頸部癌、子宮内膜癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌、黒色腫、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、肛門癌、肉腫、リンパ腫、白血病、脳腫瘍、胃癌、精巣癌、膵臓癌、甲状腺癌から選択される、請求項 5 1 または 5 2 に記載の使用。

30

【請求項 5 4】

薬剤の調製のための請求項 1～4 3 のいずれか 1 つのタンパク質の使用。

【請求項 5 5】

薬剤が抗腫瘍薬である、請求項 5 4 に記載の使用。

【請求項 5 6】

抗腫瘍薬は B 細胞リンパ腫を処置するために、または抗大腸癌に有効である、請求項 5 5 に記載の使用。

【請求項 5 7】

40

請求項 1－4 3 のいずれか 1 つのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞株。

【請求項 5 8】

請求項 5 7 の細胞株を培養する工程を含む、タンパク質を製造するための方法。

【請求項 5 9】

生成されたタンパク質を精製または単離する工程を含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

タンパク質を製造するための方法であって、

請求項 1－4 3 のいずれか 1 つのタンパク質をコードする発現ベクターを提供する工程

50

;

宿主細胞へ発現ベクターを導入する工程；

タンパク質を発現するのに十分な条件下において培地中で宿主細胞を培養する工程；および、

宿主細胞または培地からタンパク質を精製する工程、を含む、方法。

【請求項 61】

宿主細胞は 293F である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

宿主細胞は CHO である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 63】

発現ベクターの導入は一過性トランスフェクションまたは安定した細胞株によるものである、請求項 60－62 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 64】

タンパク質の精製は、プロテイン A/G のアフィニティークロマトグラフィー、またはサイズ除去法によるものである、請求項 60－63 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 65】

請求項 60－64 のいずれか 1 つの方法によって生成される、単離されたタンパク質。

【請求項 66】

実質的に純粋である、請求項 65 に記載の単離されたタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

優先権主張および関連出願

本出願は、2018 年 4 月 25 日に提出された中国出願第 201810376920.1 号に対する利益を主張し、その全内容は、すべての目的のために参照により本明細書に引用される。

【0002】

技術分野

本発明は一般に、新規な融合タンパク質と治療的使用に関する。具体的には、本発明は、さまざまな疾患や障害（例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置する際に有用な、インターロイキン 12 とプロドラッグの新規な融合タンパク質および組成物、ならびにその調製方法を提供する。 30

【背景技術】

【0003】

細胞障害性リンパ球成熟因子（CLMF）としても知られているインターロイキン 12（IL12）は、末梢血リンパ球に対する複数の生物学的活性を備えたナチュラルキラー（NK）細胞刺激因子として 1989 年に初めて同定された。IL12 は、食細胞、B 細胞、および活性化樹状細胞を含む免疫系のさまざまな細胞による感染に応答して産生される（Colombo et al., 2002 Cytokine & Growth Factor Reviews 13: 155-168）。IL12 は、免疫系の先天的な武器と適応的な武器（innate and adaptive arms）との相互作用を媒介する上で重要な役割を果たし、T 細胞とナチュラルキラー（NK）細胞に作用し、細胞傷害性リンパ球の増殖と活性を増強し、他の炎症性サイトカイン、特にインターフェロン- γ の産生を促進する。 40

【0004】

IL12 は、生物学的に活性な 74 kDa のヘテロ二量体を形成するために、ジスルフィド架橋によって共有結合された α 鎖（p35 サブユニット）と β 鎖（p40 サブユニット）から構成されるヘテロ二量体分子である。ヒトおよびマウスにおいて、IL12 は、ナチュラルキラー（NK）細胞活性の強力なアクチベーターであり（Kobayashi, et al., 1989 J. Exp. Med. 170: 827-845）、および重要な免疫細胞活性化能力を有するサイトカインである、NK および T リンパ球からの IFN 50

ー γ の主要な誘導剤である (Chan, et al. 1991 J. Exp. Med. 173: 869-879) ことが示されている。IFN- γ は、IL12に起因する血管新生作用の必須のメディエーターである (Voest, et al. 1995 J. Natl Cancer Inst. 87: 581-586; Majewski, et al. 1996 J. Invest. Dermatol. 106: 1114-1118)。

【0005】

複数の研究は、IL12が、抗腫瘍抗体によって腫瘍標的に特異的に向けられた免疫細胞によって媒介される腫瘍細胞の殺傷を増強することを示した (Lieberman, et al. 1991 J. Surg. Res. 50: 410-415)。IL12は、インビボでの一酸化窒素産生を刺激し、これがマウスにおける腫瘍の進行を遅らせる (Wigginton, et al. 1996 Cancer Res. 56: 1131-1136)。内因性のIL12産生も、腫瘍負荷が増加するにつれて徐々に減少することが報告されており (Handel-Fernandez, et al. 1997 J. Immunol. 158: 280-286)、細胞媒介性抗腫瘍応答を再構成するためにIL12を癌患者に提供することの合理的根拠を形成している。

【0006】

IL12は、腫瘍により引き起こされる血管新生の強力な阻害剤であることが報告されており (Voest, et al. 1995 supra; Majewski, et al. 1996 supra)、増殖している腫瘍の脈管構造に対する強力な血管新生抑制作用を有するケモカインである、IFN γ 誘導性タンパク質-10 (IP-10; Sgadari, et al. 1996 Blood 87: 3877-3882)を介して媒介されるマウスの腫瘍血管形成のインビボでの有意な阻害を実証している (Angiolillo, et al. Sci. 795: 158-167; Arenberg, et al. 1996 J. Exp. Med. 184: 981-992)。インビトロでは、それは内皮細胞による管状構造の形成を阻害する (Angiolillo, et al. 1995 J. Exp. Med. 182: 155-162)。インビボでは、IL12によるIP-10の誘導は、内膜の肥厚、内皮細胞アポトーシス、および血栓症による血管内腔の部分的から完全な閉塞を示す周囲の血管を伴う中心的な腫瘍壊死をもたらす (Angiolillo, et al. 1996 supra; Dias, et al. 1998 Int. J. Cancer 75: 151-157)。IL12は、VEGFとマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) 産生の調節因子としての役割を通じて、血管新生作用を発揮することも示されている (Dias, et al. 1998 Int. J. Cancer 78: 361-365)。

【0007】

IL12は前臨床モデルでは強力な抗腫瘍効果を示しているが、しかしながら、臨床試験では、組換え体IL12の全身投与により、発熱、胃腸管反応、リンパ球減少、肝機能異常などの重篤な副作用が引き起こされ、その重篤な毒性により患者の死はIL12の投与に起因している (Lasek, et al. 2014 Cancer Immunol Immunother. 63 (5): 419-435)。

【0008】

過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍に現在利用可能な処置および方法は不適切である。このような疾患や状態を効果的に処置する新規かつ改良された治療法に対する緊急かつ継続的なニーズが依然として存在している。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、新規な融合タンパク質およびその治療的用途の驚くべき発見に部分的に基づいている。IL12の新規な融合タンパク質およびそのプロドラッグ、組成物、およびその調製方法が本明細書で開示されるおり、これらは、副作用および標的外毒性を減少させて、さまざまな疾患および障害、例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍を処置するのに有用である。

10

20

30

40

50

【0010】

1つの態様では、本発明は一般に、融合タンパク質に関する。融合タンパク質は：第1の構造単位：P35とP40のサブユニットから選択されたIL12の1つあるいは2つのサブユニットであって、ここで、第1の構造単位が融合タンパク質のN末端に位置する、サブユニット；第2の構造単位：抗体Fcフラグメントであって、第2の構造単位が融合タンパク質のC末端に位置する、抗体Fcフラグメント；および、第1の構造単位および第2の構造単位と共有結合するか、あるいは、第1の構造単位の2つのサブユニットと共有結合する第1のリンカーセグメント、を含む。

【0011】

他の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される融合タンパク質を含む、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質に関する。

10

【0012】

さらに別の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される融合タンパク質またはフラグメントなどの実質的に精製されたタンパク質に関する。

【0013】

さらに別の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0014】

さらに別の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関する。

20

【0015】

さらに別の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質、および薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤を含む医薬組成物に関する。

【0016】

さらに別の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤を含む医薬組成物に関する。

【0017】

さらに別の態様では、本発明は一般に、疾患または状態を処置する方法に関する。上記方法は、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードする治療上有効な量のポリヌクレオチドを、それを必要としている患者に投与する工程を含み、ここで、疾患または状態は、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍から選択される。

30

【0018】

さらに別の態様では、本発明は一般に、疾患または障害（例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置するか、または減少させるための、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質の使用に関する。

【0019】

さらに別の態様では、本発明は一般に、疾患または障害（例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置するか、または減少させるための、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用に関する。

40

【0020】

さらに別の態様では、本発明は一般に、疾患または障害（例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置するか、または減少させるための薬剤の製造における、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質、および、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤の使用に関する。

【0021】

50

さらに別の態様では、本発明は一般に、疾患または障害（例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置するか、または減少させるための薬剤の製造における、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤の使用に関する。

【0022】

さらに別の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞株に関する。

【0023】

さらに別の態様では、本発明は一般に、細胞株を培養する工程を含む、タンパク質を作る方法に関する。特定の実施形態では、上記方法はさらに、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどの生成されたタンパク質を精製または単離する工程を含む。

【0024】

さらに別の態様では、本発明は一般に、タンパク質を作る方法に関する。上記方法は、本明細書で開示される融合タンパク質またはそのフラグメントなどのタンパク質をコードする発現ベクターを提供する工程；宿主細胞へ発現ベクターを導入する工程；タンパク質を発現するのに十分な条件下において培地中で宿主細胞を培養する工程；および、宿主細胞または培地からタンパク質を精製する工程、を含む。

【0025】

さらに別の態様では、本発明は一般に、本明細書で開示される方法によって生成された単離されたタンパク質に関する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】 IL12-Fc二量体プロドラッグ：直列形態のホモ二量体 IL12-Fc (Homo IL12) の構造の概略図を示す。

【図2】 IL12-Fc二量体プロドラッグ：並列形態のヘテロ二量体 IL12-Fc (Hetero IL12) の構造の概略図を示し、Fc-kはFc-ノブ (Fc-knob) の短縮形であり、Fc-hはFc-ホール (Fc-hole) の短縮形である。

【図3】 ホモ二量体 IL12-Rβ1二量体プロドラッグ (Homo-R1) の構造の概略図を示す。

【図4】 ホモ二量体 IL12-Rβ2二量体プロドラッグ (Homo-R2) の構造の概略図を示す。

【図5】 ヘテロ二量体 IL12-Rβ1/Rβ2二量体プロドラッグ (Hetero-R1/R2) の構造の概略図を示し、Fc-kはFc-ノブ (Fc-knob) の短縮形であり、Fc-hはFc-ホール (Fc-hole) の短縮形である。

【図6】 ヘテロ二量体 IL12-Rβ1二量体プロドラッグ (Hetero-R1) の構造の概略図を示し、Fc-kはFc-ノブ (Fc-knob) の短縮形であり、Fc-hはFc-ホール (Fc-hole) の短縮形である。

【図7】 ヘテロ二量体 IL12-Rβ2二量体プロドラッグ (Hetero-R2) の構造の概略図を示し、Fc-kはFc-ノブ (Fc-knob) の短縮形であり、Fc-hはFc-ホール (Fc-hole) の短縮形である。

【図8A】 図1-7の7つの融合タンパク質の発現のSDS-PAGE電気泳動結果の例示的なデータを示す。

【図8B】 図1-7の7つの融合タンパク質の発現のSDS-PAGE電気泳動結果の例示的なデータを示す。

【図9】 IL12受容体に結合されていない IL12-Fcの注入がMC38腫瘍を完全に除去し、Hetero IL12がHomo IL12よりも強い排除効果を有するという例示的なデータを示している。

【図10】 Hetero IL12がHomo IL12よりも高い細胞毒性を持っているとい

10

20

30

40

50

う例示的なデータを示す。

【図 1 1】H e t R 1、H e t R 2、およびH e t - R 1 / R 2 がすべて、M C 3 8 腫瘍を有効に除去するという例示的なデータを示す。

【図 1 2 A】I L 1 2 受容体に結合されたH e t I L 1 2 プロドラッグが、全身投与時に副作用が少ないという例示的なデータを示す。

【図 1 2 B】I L 1 2 受容体に結合されたH e t I L 1 2 プロドラッグが、全身投与時に副作用が少ないという例示的なデータを示す。

【図 1 2 C】I L 1 2 受容体に結合されたH e t I L 1 2 プロドラッグが、全身投与時に副作用が少ないという例示的なデータを示す。

【図 1 2 D】I L 1 2 受容体に結合されたH e t I L 1 2 プロドラッグが、全身投与時に副作用が少ないという例示的なデータを示す。

【図 1 2 E】I L 1 2 受容体に結合されたH e t I L 1 2 プロドラッグが、全身投与時に副作用が少ないという例示的なデータを示す。

【図 1 2 F】I L 1 2 受容体に結合されたH e t I L 1 2 プロドラッグが、全身投与時に副作用が少ないという例示的なデータを示す。

【図 1 2 G】I L 1 2 受容体に結合されたH e t I L 1 2 プロドラッグが、全身投与時に副作用が少ないという例示的なデータを示す。

【図 1 3】M M P 1 4 による消化を伴う場合と伴わない場合のヒトH e t - R 1 とH e t - R 1 / R 2 の発現のS D S - P A G E 電気泳動結果の例示的なデータを示す。

【図 1 4】(A) M M P 1 4 消化後のヒトH e t - R 1 が、インビトロでH e t I L 1 2 と組換えI L 1 2 と同様の活性を呈し、(B) z M M P 1 4 消化後のヒトH e t - R 1 / R 2 が、H E K B l u e - I L 1 2 レポーター細胞株を用いてH e t I L 1 2 と組換えI L 1 2 と同様の活性を呈するという例示的なデータを示す。

【0 0 2 7】

定義

別段の定めのない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。以下の用語は、別段の定めのない限り、用語がある文脈に従って、以下の意味を持つように意図されている。

【0 0 2 8】

商品名が本明細書で使用される場合、商品名は、別段の定めのない限り、商品名製品の製剤、ジェネリック医薬品、および商品名製品の有効な医薬成分を含む。

【0 0 2 9】

本明細書で提供される範囲は、範囲内の値について簡潔にした表現であると理解される。例えば、1 ~ 5 0 の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、または5 0 からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、または部分的な範囲を含むと理解される。

【0 0 3 0】

本明細書で使用されるように、「少なくとも」特定の値とは、その値、および、その値よりも大きいすべての値であると理解される。

【0 0 3 1】

本明細書で使用されるように、「2 以上」とは、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 5、3 0、4 0、5 0、1 0 0 など、またはその間の任意の値として理解される。

【0 0 3 2】

明細書と添付の請求項において、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が他に明確に指示していない限り、複数の参照を含む。

【0 0 3 3】

本明細書で使用されるように、具体的に記載されていない限り、または、文脈から明らかでない限り、「約」という用語は、当該技術分野における通常の許容範囲内、例えば、平均値の2標準偏差内であると理解される。「約」とは、記載された値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%の範囲内であると理解され得る。文脈から明らかでない限り、本明細書で提供されるすべての数値は、「約」という用語によって修正され得る。

【0034】

本明細書で使用されるように、具体的に記載されていない限り、または、文脈から明らかでない限り、「または」という用語は、包括的に理解される。

【0035】

組成物および方法を定義するために使用される場合、「含むこと」という用語は、組成物および方法が記載された要素を含むが、他の要素を除外しないことを意味するものとする。組成物および方法を定義するために使用される場合、「本質的に～からなる」という用語は、組成物および方法が記載された要素を含み、組成物および方法にとって本質的に重要な他の要素を除外することを意味するものとする。例えば、「本質的に～からなる」という用語は、明示的に記載された薬理学的に活性な薬剤の投与を指し、明示的に記載されていない薬理学的に活性な薬剤を除外する。「本質的に～からなる」という用語は、薬学的に不活性または非活性な薬剤、例えば、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤を除外するものではない。「からなる」という用語は、組成物および方法を定義するために使用される場合、他の成分の微量要素および実質的な方法工程を除外することを意味するものとする。こうした移り変わる用語 (transition term) の各々により定められる実施形態は、本発明の範囲内である。

【0036】

本明細書で使用されるように、「アゴニスト」という用語は、受容体と組み合わせて、細胞応答を生じさせることができる化合物を指す。アゴニストは、受容体に直接結合するリガンドであってもよい。代替的に、アゴニストは、例えば、(a) 受容体に直接結合する他の分子と複合体を形成すること、または (b) 別の方法で、他の化合物が受容体に直接結合するように別の化合物の修飾をもたらすことによって、間接的に受容体と結合してもよい。

【0037】

本明細書で使用されるように、「アンタゴニスト」という用語は、受容体への結合のためにアゴニストまたは逆アゴニストと競合し、それによって受容体に対するアゴニストまたは逆アゴニストの作用を遮断する化合物を指す。しかしながら、アンタゴニストは構造的な受容体の活性には影響を与えない。

【0038】

本明細書で使用されるように、「抗体」という用語は、エピトープまたは抗原決定基と結合することができる分子を指す。この用語は、全抗体およびその抗原結合フラグメントを含むように意図している。この用語は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、Fab、Fvs、単鎖抗体および単数または複数の免疫グロブリン可変鎖、あるいは、CDRドメイン設計、さらに、二重特異性および多特異性の抗体を包含する。抗体は任意の動物由来のものであり得る。好ましくは、抗体は哺乳動物、例えば、ヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマなど、または他の適切な動物である。抗体はポリペプチドまたはポリヌクレオチドの抗原を認識することがある。この用語は、例えば、免疫グロブリンの抗原結合性フラグメント、重鎖の可変および／または定常領域、軽鎖の可変および／または定常領域、相補性決定領域 (cdr)、ならびにフレームワーク領域を含む活性フラグメントを含んでいる。この用語は、ポリクローナルとモノクローナル抗体の調製物、さらに、ハイブリッド抗体、修飾された抗体、キメラ抗体、ハイブリッド抗体分子、F(ab)₂ と F(ab) フラグメントを含む調製物；Fv分子 (例えば、非共有結合ヘテロ二量体)、二量体および三量体抗体フラグメント構築物；ミニボディ、ヒト化抗体分子、ならびにそのような分子から得られた機能的フラグメントを含み、ここで、こうし

10

20

30

40

50

たフラグメントは特異的な結合を保持する。

【0039】

本明細書で使用されるように、「抗原」という用語は、免疫系がそれに対する抗体または特異的な細胞媒介性の免疫応答を生成する原因となる任意の物質を意味する。疾患関連抗原とは、免疫系に抗体またはそれに対する特異的な細胞媒介性の免疫応答を生成させる任意の疾患に関連する任意の物質を意味する。抗原は、免疫系によって認識され、および／またはBリンパ球ならびに／あるいはTリンパ球の活性化につながる体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答を誘導することができる。抗原は、1つ以上のエピトープ（Bーおよび／またはT細胞エピトープ）を有することができる。抗原は、好ましくは、典型的には高度に選択的な方法で、その対応する抗体またはTCRと反応し、他の抗原によって誘発され得る多数の他の抗体またはTCRとは反応しない。本明細書で使用される抗原はさらに、複数の個々の抗原の混合物であってもよい。

10

【0040】

本明細書で使用されるように、「生物学的に活性な」実体、または「生物学的活性」を有する実体という用語は、自然発生する分子の構造的、調節的、または生化学的な機能を有するもの、または代謝もしくは生理学的プロセスに関連するか、または関連付けられるあらゆる機能を有するものを意味する。生物学的に活性なポリペプチドまたはそのフラグメントは、生物学的プロセスまたは反応に関与することができ、および／または所望の効果をもたらすことができるものを含む。生物学的活性は、改善された所望の活性、または減少した望ましくない活性を含み得る。例えば、実体は、それが他の分子との分子相互作用に関与する場合、疾患状態を緩和する際に治療的価値を有する場合、免疫応答を誘導する際に予防的価値を有する場合、または分子の存在を決定する際に診断的価値および／または予後的価値を有する場合に、生物学的活性を発揮する。生物学的に活性なタンパク質またはポリペプチドは、自然発生するものであってもよく、または、例えば、組換えまたは化学合成によって既知の成分から合成されたものであってもよく、異種成分を含むものであってもよい。

20

【0041】

本明細書で使用されるように、「癌（cancer）」および「癌性の（cancerous）」という用語は、典型的に未制御の細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理的状态を指すか、記載する。癌の例は、限定されないが、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、および白血病を含む。そのような癌の具体的な例としては、扁平上皮癌、肺癌、膵臓癌、子宮頸癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、および頭頸部癌が挙げられる。

30

【0042】

本明細書で使用されるように、「細胞」という用語は、任意の原核生物、真核生物、初代細胞または不死化細胞株、組織または器官のようなこうした細胞の任意の群を指す。好ましくは、細胞は哺乳動物（例えば、ヒト）由来であり、1つ以上の病原体に感染し得る。

【0043】

本明細書で使用されるように、「共投与」という用語は、同時に血中に2つの薬理学的薬剤が存在することを意味する。2つの薬理学的薬剤は、同時にまたは順次投与することができる。

40

【0044】

本明細書で使用されるように、「共発現」という用語は、2つの異なるポリペプチドが宿主細胞中または宿主細胞培養液中のいずれかで相互作用または結合し、複合体を形成することができるように、2つのポリペプチドが宿主細胞中で同時に発現されることを意味するように意図される。

【0045】

本明細書で使用されるように、「疾患」または「障害」という用語は、病理学的状態、例えば、症状または他の識別因子によって健康な状態または正常な状態から逸脱していると識別され得るものを指す。「疾患」という用語には、障害、症候群、状態、および傷害

50

が挙げられる。疾患には、限定されないが、増殖性疾患、炎症性疾患、免疫性疾患、代謝性疾患、感染性疾患、および虚血性疾患が挙げられる。

【0046】

本明細書で使用されるように、活性薬剤の「有効量」という用語は、所望の生物学的応答を引き出すのに十分な量を指す。当業者によって理解されるように、本発明の化合物の有効量は、所望の生物学的エンドポイント、化合物の薬物動態、処置されている疾患、投与形態、および患者などのこうした要因に依存して変化することがある。

【0047】

本明細書で使用されるように、「核酸分子の発現」という用語は、核酸分子に含まれる情報を遺伝子産物に変換することを指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA、または任意の他のタイプのRNA）、あるいは、mRNAの翻訳によって産生されるペプチドまたはポリペプチドであり得る。遺伝子産物はさらに、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集などのプロセスによって修飾されたRNA；ならびに、例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化、ミリスチル化、およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質を含む。

【0048】

本明細書で使用されるように、「宿主細胞」という用語は、任意の組換えベクターまたは単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであり得るか、またはレシピエントであったことがある個々の細胞または細胞培養物を指す。宿主細胞は、原核細胞、真核細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、植物細胞、または細菌細胞を含む、任意の起源のトランスフェクト細胞、形質転換細胞、形質導入細胞、または感染細胞であり得、あるいは、本明細書に記載される核酸を伝播させるために使用され得る任意の起源の細胞であり得る。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、その子孫は、自然の、偶発的、または意図的な突然変異および／または変化によって、（形態学的または総DNA相補体において）必ずしも元の親細胞と完全に同一であるとは限らない。宿主細胞は、本発明の組換えベクターまたはポリヌクレオチドをインビトロまたはインビトロでトランスフェクトまたは感染させた細胞を含む。本発明の組換えベクターを含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」と呼ばれることもある。

【0049】

宿主細胞としては、限定されないが、哺乳動物、植物、昆虫、真菌、および細菌が挙げられる。細菌細胞としては、好ましくは、限定されないが、バチルス属（genus *Bacillus*）、ストレプトマイセス属（*Streptomyces*）、およびスタフィロコッカス属（*Staphylococcus*）などのグラム陽性菌の細胞、ならびに、エシェリヒア属（*Escherichia*）およびシュードモナス属（*Pseudomonas*）の細胞などのグラム陰性菌の細胞が挙げられる。真菌細胞としては、好ましくは、サッカロミセス（*Saccharomyces*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、ハンセヌラポリモーファ（*Hansenula polymorpha*）などの酵母細胞が挙げられる。昆虫細胞としては、限定されないが、ショウジョウバエの細胞、およびSf9細胞が挙げられる。植物細胞としては、とりわけ、穀類、薬用植物または観賞用植物、あるいは球根などの作物植物からの細胞が挙げられる。本発明に好適な哺乳動物細胞としては、上皮細胞株（ブタなど）、骨肉腫細胞株（ヒトなど）、神経芽腫細胞株（ヒトなど）、上皮癌細胞株（ヒトなど）、グリア細胞株（マウスなど）、肝臓細胞株（サルなど）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣）、COS細胞、BHK細胞、細胞HeLa、911、AT1080、A549、293またはPER.C6、ヒトECCs NTERA-2細胞、mESCsの株のD3細胞、HS293およびBGV01、SHEF1、SHEF2およびHS181などのヒト胚性幹細胞、細胞NIH3T3、293T、REH、およびMCF-7ならびにhMSCs細胞が挙げられる。

【0050】

本明細書で使用されるように、「Fc」という用語は、単量体または多量体の形態であるか否かにかかわらず、全抗体の非抗原結合フラグメントの配列からなる分子または配列を指す。天然Fcの元の免疫グロブリン源は、好ましくはヒト由来であり、免疫グロブリン（例えば、IgG1、IgG2）のいずれであってもよい。天然Fcは、共有結合（すなわち、ジスルフィド結合）および非共有結合によって二量体または多量体の形態に連結され得る単量体ポリペプチドから構成される。天然Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、IgG、IgA、IgE）またはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2）に応じて、1から4までの範囲である。

【0051】

10

本明細書で使用されるように、「Fcドメイン」または「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖「結晶化可能なフラグメント」領域を指すことを意味する。一般に、Fcドメインは、二量体複合体を形成するために第2のFcドメインと相互作用することができる。Fcドメインは、Fc受容体と呼ばれる細胞表面受容体および／または補体系のタンパク質を結合することができるか、またはこれらの結合活性を低減または増強するように修飾されていてもよい。Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、IgM、またはIgE抗体のアイソタイプに由来するものであってもよく、オクソン化、細胞溶解、肥満細胞、好塩基球、好酸球の脱顆粒、および他のFc受容体依存性プロセスを含む免疫活性；補体経路の活性化；およびインビボでのタンパク質の安定性に影響を与える。

【0052】

20

「Fcドメイン」は、本明細書で定義されるように、天然FcおよびFc変異体分子および配列を包含する。Fc変異体および天然Fcの場合と同様に、「Fcドメイン」という用語は、抗体全体から消化されたか、または組換え遺伝子発現または他の手段によって産生されたかどうかにかかわらず、単量体または多量体の形態の分子を包含する。

【0053】

Fc融合タンパク質は、IgGのFc領域を、様々なサイトカインおよび可溶性受容体などの別のタンパク質のドメインと結合させることが報告されている。（例えば、Capon et al. 1989 Nature 337:525-531; Chamow et al. 1996 Trends Biotechnol. 14:52-60; U. S. Pat. Nos. 5,116,964 and 5,541,087）。

30

【0054】

Fc融合の使用は、当該技術分野で知られている（例えば、米国特許第7,754,855号；第5,480,981号；第5,808,029号；WO7/23614号；WO98/28427号、および本明細書に引用された文献）。Fc融合タンパク質は、（例えば、米国特許第7,732,570号に記載されるような）変異体Fc分子を含むことができる。Fc融合タンパク質は血漿において溶解可能であるか、または特定のFc受容体を有する細胞の細胞表面に結合することができる。

【0055】

本明細書で使用されるように、「Fc変異体」という用語は、天然Fcから修飾されているが、サルベージ受容体FcRnの結合部位を含む分子または配列を指す。国際出願WO97/34631号（1997年9月25日公開）とWO96/32478号は、例示的なFc変異体、およびサルベージ受容体との相互作用について記載しており、参照により本明細書に組み込まれる。したがって、「Fc変異体」という用語は、非ヒト天然Fcからヒト化された分子または配列を含む。さらに、天然Fcは、本発明の融合分子に必要とされない構造的特徴または生物学的活性を提供することから、除去され得る部位を含む。したがって、特定の実施形態では、「Fc変異体」という用語は、（1）ジスルフィド結合形成、（2）選択された宿主細胞との不適合性、（3）選択された宿主細胞での発現時のN末端不均一性、（4）グリコシル化、（5）補体との相互作用、（6）サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、または、（7）抗体依存性細胞毒性（ADCC）に影響を与えるか、または関与する1つ以上の天然Fc部位または残基を欠いた分子また

40

50

は配列を含む。Fc変異体についてさらに以下で詳細に説明する。

【0056】

本明細書で使用されるように、「融合タンパク質」という用語は、組換え、化学的または他の適切な方法により共有結合された（すなわち、「融合」された）異なるまたは異種のタンパク質からの2つ以上の領域を含むポリペプチドを指す。望ましい場合に、融合分子を、ペプチドまたは他のリンカーセグメントまたは配列を介して、1つ以上の部位で融合させることができる。例えば、融合タンパク質の構築を補助するために、1つ以上のペプチドリッカーを使用することができる。

【0057】

本明細書で使用されるように、「GC含有量」という用語は、デオキシグアノシン（G）および／またはデオキシシチジン（C）デオキシリボヌクレオシド、あるいはグアノシン（G）および／またはシチジン（C）リボヌクレオシド残基から構成される核酸配列の割合を指す。

【0058】

本明細書で使用されるように、「高用量」という用語は、任意のヒトの疾患または状態の処置のための特定の化合物の最高標準推奨用量よりも少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、50%、100%、200%、またはさらには300%）多いことを意味する。

【0059】

本明細書で使用されるように、「免疫応答」という用語は、免疫細胞が刺激され、および／または、明確な接着および／または活性化工程を含む多因子プロセスを介して、血液からリンパ系組織と非リンパ系組織まで補充されるプロセスを指す。活性化条件は、サイトカイン、成長因子、ケモカイン、およびその他の因子の放出を引き起こし、免疫細胞上の接着およびその他の活性化分子の発現をアップレギュレートし、組織を介した走化性と同時に接着、形態学的変化、および／または溢出を促し、細胞増殖および細胞毒性活性を増加させ、抗原提示を刺激し、および記憶細胞型の生成を含むその他の表現型の変化を引き起こす。免疫応答は、他の免疫細胞の炎症性または細胞毒性活性を抑制または調節するための免疫細胞の活性を指すことも意味する。免疫応答は、インビボまたはインビトロでの免疫細胞の活性を指す。

【0060】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、「同一性」またはパーセント「同一性」という用語は、以下に記載されるデフォルトのパラメーターを有するBLASTまたはBLAST 2.0配列比較アルゴリズムを使用して、あるいは、手動での位置合わせと目視検査によって測定されるように、同じである（すなわち、比較ウィンドウまたは指定された領域での最大対応関係について比較して位置合わせした際に、指定された領域（例えば、IL12配列またはIL12R配列の）にわたって約70%同一であり、好ましくは75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である）アミノ酸残基またはヌクレオチドの所定の割合を有する2つ以上の配列または部分配列を指す。こうした配列は「実質的に同一である」と言われる。この定義はさらに、試験配列の補足物を指すこともあれば、試験配列の補足物に当てはめられることもある。本定義はさらに、欠失および／または付加を有する配列と、置換を有する配列を含む。以下に記載されるように、好ましいアルゴリズムはギャップなどを説明することができる。好ましくは、同一性は、少なくとも約25、50、75、100、150、200アミノ酸またはヌクレオチド長さである部位に、しばしば、225、250、300、350、400、450、500アミノ酸またはヌクレオチド長さである部位に、あるいは完全長のアミノ酸または核酸配列に存在する。

【0061】

配列比較のために、典型的には、1つの配列は基準配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用して、試験配列と基準配列をコンピュ

10

20

30

40

50

ーターに入力し、その後の座標が必要に応じて指定され、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターが指定される。好ましくは、デフォルトプログラムパラメーターが使用可能であるか、または、代替的なパラメーターが指定可能である。その後、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づいて、基準配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を計算する。

【0062】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの好ましい例は、BLASTアルゴリズムであり、これは、Altschul et al. *Acids Res.* 25:3389-3402およびAltschul et al. 1990 *J. Mol. Biol.* 215:403-410にそれぞれ記載されている。BLASTソフトウェアは、ncbi.nlm.nih.govにあるワールドワイドウェブ上のNational Center for Biotechnology Informationを通じて一般に入手可能である。デフォルトパラメータまたは他の非デフォルトパラメータの両方を使用することができる。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、デフォルトとして、ワード長（W）11、期待値（E）10、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムはデフォルトとして、ワード長3、期待値（E）10、BLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)を参照）のアラインメント（B）50、期待値（E）10、M=5、N=-4、両方の鎖の比較を用いる。

【0063】

本明細書で使用されるように、「阻害する」という用語は、生物学的活性の任意の測定可能な減少を指す。したがって、本明細書で使用されるように、「阻害する」または「阻害」は、正常な活性レベルの割合と呼ばれることがある。

【0064】

本明細書で使用されるように、「インターロイキン12」または「IL12」という用語は、生物学的に活性な哺乳動物の天然IL12アミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドを指し、これは、変異したタンパク質（「ムテイン」）が、少なくとも1つの機能アッセイにおいて天然IL12タンパク質と同様の機能性（75%以上）を有することを意味する。

【0065】

IL12ポリペプチドの例示的な機能アッセイは、例えば、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞によるインターフェロン- γ （IFN- γ ）の産生を誘導すること、およびTヘルパー-1（Th1）細胞の分化を促進することを含む。Th1細胞へ分化したヘルパーT細胞は、IFN- γ の分泌によって同定することができる。例えば、IL-12で刺激されたT細胞またはNK細胞によって分泌されたIFN- γ は好都合なことに、ELISAを使用して、例えば、血清または細胞培養上清中で検出することができる。ELISA法と技術は当該技術分野で周知であり、IFN- γ を検出するためのキットは市販されている（例えば、R&D Systems, Minneapolis, Minn.; Peprotech, Rocky Hill, N. J.; および、Biosource Intl., Camarillo, Calif.）。さらに、Coligan, et al., *Current Methods in Immunology*, 1991-2006, John Wiley & Sons; Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press; および、The ELISA Guidebook, Crowther, ed., 2000, Humana Pressを参照。

【0066】

本明細書で使用されるように、「単離された」分子（ポリペプチドまたはポリヌクレオ

チドなど) という用語は、自然界よりも高い濃度で存在するように操作されたか、またはその本来の環境から取り除かれたものである。例えば、被験体抗体は、自然界で関連付けられる非被験体抗体材料の少なくとも10%、または20%、または40%、または50%、または70%、または90%が除去されたときに、単離され、精製され、実質的に単離され、または実質的に精製される。例えば、生きた動物に自然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されていないが、その自然の状態の共存物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されている。さらに、ベクターに含まれる組換えDNA分子は、本発明の目的のために単離されたものとみなされる。単離されたRNA分子は、DNA分子およびRNA分子のインビボまたはインビトロのRNA複製産物を含む。単離された核酸分子はさらに、合成的に生成された分子を含む。加えて、組換え宿主細胞に含まれるベクター分子も単離される。したがって、すべての「単離された」分子が「精製」される必要はない。

10

【0067】

本明細書で使用されるように、「リンカー」または「連結セグメント」は、2つの他の分子または群を接続する分子または群を指す。ペプチドリリンカーは、接続された分子または群が官能的な構成を獲得することを可能にし得る。リンカーペプチドは好ましくは、少なくとも2つのアミノ酸、少なくとも3つのアミノ酸、少なくとも5つのアミノ酸、少なくとも10のアミノ酸、少なくとも15のアミノ酸、少なくとも20のアミノ酸、少なくとも30のアミノ酸、少なくとも40のアミノ酸、少なくとも50のアミノ酸、少なくとも60のアミノ酸、少なくとも70のアミノ酸、少なくとも80のアミノ酸、少なくとも90のアミノ酸、またはおよそ100のアミノ酸を含む。

20

【0068】

サイトカインまたは他の生理活性分子および任意のペプチドリリンカーなどの融合タンパク質の構成要素は、融合タンパク質が意図された機能を有することを条件として、ほぼあらゆる方法で組織化することができる。特に、融合タンパク質の各構成要素は、望ましい場合に、少なくとも1つの適切なペプチドリリンカーセグメントまたは配列によって、別の構成要素から間隔をあけて配置することができる。さらに、融合タンパク質は、融合タンパク質の修飾、同定、および／または精製を容易にするために、例えば、タグを含むことができる。具体的な融合タンパク質は以下に記載される例にある。

【0069】

本明細書で使用されるように、「低用量」という用語は、任意のヒトの疾患または状態の処置のための所定の投与経路のために製剤化された特定の化合物の最低標準推奨用量よりも少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、50%、80%、90%、またはさらには95%）少ないことを意味する。例えば、吸入による投与のために製剤化された薬剤の低用量は、経口投与のために製剤化された同じ薬剤の低用量とは異なるであろう。例えば、吸入によって投与のための製剤される剤の低投与量は、経口投与のための製剤された同じ剤の低投与量と異なる。

30

【0070】

本明細書で使用されるように、「培地 (medium)」または「培地 (media)」という用語は、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真核生物宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、CHO細胞、原核生物宿主細胞、大腸菌宿主細胞、またはシュードモナス宿主細胞、および細胞含有物を含む、任意の宿主細胞を支持するか、または含むことができる任意の培地、溶液、固体、半固体、または剛体の支持体を含む。したがって、この用語は、宿主細胞が増殖した培地、例えば、増殖工程の前後のいずれかの培地を含む、ポリペプチドが分泌された培地を包含することができる。この用語はさらに、ポリペプチドが細胞内で産生され、ポリペプチドを放出するために宿主細胞が溶解または破壊される場合など、宿主細胞の溶解物を含む緩衝液または試薬を包含してもよい。

40

【0071】

本明細書で使用されるように、「調節する」という用語は、適切な対照と比較した場合に、測定された活性の増加または減少、刺激、阻害、干渉、または遮断を直接的または間

50

接的にもたらすことを指す。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「モジュレーター」とは、適切な対照と比較した場合に、例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの測定された活性に影響を与える、例えば、増加させ、減少させ、刺激し、阻害し、干渉し、または遮断する物質を指す。例えば、「モジュレーター」は、測定可能な親和性を有する標的に結合し、および／または上記標的を活性化もしくは阻害するか、あるいは受容体活性の正常な調節に直接的または間接的に影響を与えることができる。

【0072】

「動作可能に連結された」という用語は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が単一の核酸配列に転写されるような、第1の核酸配列と第2の核酸配列との間の機能的な連結を指す。動作可能に連結された核酸配列は、互いに物理的に隣接している必要はない。「動作可能に連結された」という用語はさらに、核酸発現制御配列（プロモーター、または転写因子結合部位のアレイなど）と転写可能な核酸配列との間の機能的な連結を意味し、ここで、発現制御配列は、転写可能な配列に対応する核酸の転写を指示する。

【0073】

本明細書で使用されるように、「薬学的に許容可能な」賦形剤、担体、または希釈剤という用語は、主題の医薬品を1つの臓器または身体部分から、別の臓器または身体部分へと運ぶまたは輸送することに関与する、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、または封入物質などの、薬学的に許容可能な物質、組成物、またはビヒクルを指す。担体はそれぞれ、製剤の他の成分に適合可能であり、かつ患者に有害ではないという意味で、「許容可能」でなければならない。薬学的に許容可能な担体として機能することができる物質のいくつかの例としては、以下が挙げられる：ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖類；トウモロコシデンプンとジャガイモデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなどのセルロースとその誘導体；トラガカント粉末；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバターと座剤用ワックスなどの賦形剤；落花生油、綿実油、ひまわり油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、およびダイズ油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルとラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウムと水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張食塩水；リンゲル溶液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；および、医薬製剤中で利用される他の非毒性の適合物質。ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、およびポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシドのコポリマーなどの湿潤剤、乳化剤、および潤滑剤と、着色料、剥離剤、コーティング剤、甘味料、香味料および芳香剤、防腐剤、および抗酸化剤も組成物中に存在し得る。

【0074】

本明細書で使用されるように、「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、任意の長さのリボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを含むヌクレオチドの重合体形態を指すために、本明細書で互換的に使用される。それらは、二本鎖、一本鎖の両方、または三重らせん配列を含むことができ、限定されないが、ウイルス、原核生物、および真核生物源からのcDNA；mRNA；ウイルス（例えば、DNAウイルスとレトロウイルス）または原核生物源からのゲノムDNA配列；RNAi；cRNA；アンチセンス分子；組換えポリヌクレオチド；リボザイム；および、合成DNA配列を含む。この用語はさらに、DNAとRNAの知られている塩基アナログのいずれかを含む配列を捉える。ヌクレオチドも、その一般に容認された1文字のコードによって呼ばれることがある。

【0075】

ポリヌクレオチドは、自然界に現れるポリヌクレオチドに限定されるものではなく、不自然なヌクレオチドアナログやヌクレオチド間結合が現れるポリヌクレオチドも含む。核酸分子は、修飾された核酸分子（例えば、修飾された塩基、糖、および／またはヌクレオチド間リンカー）を含み得る。この種の不自然な構造の非限定的な例としては、糖がリボ

10

20

30

40

50

ースとは異なるポリヌクレオチド、ホスホジエステル結合 3' - 5' と 2' - 5' が現れるポリヌクレオチド、逆結合 (3' - 3' と 5' - 5') が現れるポリヌクレオチド、および分岐構造が挙げられる。同様に、本発明のポリヌクレオチドは、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA)、メチルホスホネートの C1 - C4 アルキルホスホネート結合、ホスホルアミデート、C1 - C6 アルキルホスホトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートのタイプなどの不自然なヌクレオチド間結合を含む。いずれの場合でも、本発明のポリヌクレオチドは、天然ポリヌクレオチドと同様の方法で標的核酸とハイブリダイズする能力を維持する。

【0076】

別段の定めのない限り、または、または、文脈から明らかでない限り、特定の核酸配列は、保存的に修飾されたその変異体 (例えば、縮重コドン置換)、および、相補的な配列と明示された配列も暗に含んでいる。縮重コドン置換は、1つ以上の選択された (またはすべての) コドンの第3位が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基と置換された配列を生成することにより達成することができる。(Batzer et al. 1991 Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al. 1985 J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Rosso lini et al. 1994 Mol. Cell. Probes 8:91-98.)

【0077】

本明細書で使用されるように、「予防する」、「予防すること」、または「予防」という用語は、疾患または状態の発症、発生率、重症度、または再発を予防、遅延、回避、または停止するための方法を指す。例えば、ある方法は、その方法を受けていない被験体と比較して、疾患または状態にかかりやすい被験体において、その疾患または状態の発症、発生率、重症度、または再発、あるいは、その1つ以上の症状の減少または遅延がある場合に、予防であると考えられる。開示された方法は、処置を受ける前の被験者の進行と比較して、上記方法を受けた後の疾患または状態に罹患しやすい被験者における疾患または状態の1つ以上の症状の発症、発生率、重症度、または再発の減少または遅延がある場合には、予防であると考えられる。骨粗鬆症の発症、発生率、重症度、または再発の減少または遅延は、約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、またはその間の任意の量の減少であり得る。

【0078】

予防などは、被験体が特定の疾患や障害に罹患しないようにすることを意味するものではない。予防は複数回の投与が必要な場合がある。予防は、すべての疾患症状が除去された被験体における疾患の再発の予防、または再発性疾患における再発の予防を含むことができる。

【0079】

本明細書で使用されるように、「プロモーター」という用語は、哺乳動物細胞においてRNAポリメラーゼと結合し、動作可能に連結された下流 (3' 方向) のコード配列の転写を開始することができるDNA調節領域を指す。プロモーター配列は、従来よりも検出可能なレベルで関心のある遺伝子の転写を開始するために必要な最小数の塩基または要素を含む。プロモーター配列内には、転写開始部位、およびRNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメイン (コンセンサス配列) が含まれ得る。真核生物のプロモーターはしばしば、いつもではないが、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。プロモーターは、核酸分子に自然に連続するものと、核酸分子に自然に連続しないものを含む。加えて、「プロモーター」という用語は、誘導性プロモーター、cre-loxプロモーターなどの条件付きで活性なプロモーター、構成的なプロモーター、および組織特異的なプロモーターを含む。

【0080】

本明細書で使用されるように、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために交換可能に使用され、最小限の長さ限定されない

。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などは、定義に含まれている。完全長のタンパク質およびそのフラグメントの両方が、定義に包含される。この用語は、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。さらに、ポリペプチドとは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、固有の配列に対する（自然界で一般に保存的な）欠失、追加、および置換などの修飾を含むタンパク質を指すこともある。こうした修飾は意図的なこともある、偶発的なこともある。アミノ酸は、一般に知られている3文字記号、またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会（Biochemical Nomenclature Commission）に推奨される1文字記号のいずれかによって、本明細書で引用され得る。

【0081】

本明細書で使用されるように、「精製された」という用語は、自然発生環境、すなわち天然細胞、または組換え産生されたタンパク質の場合には宿主細胞で見られるような、タンパク質に通常付随するか相互作用する成分を実質的にまたは本質的に含まないことがあるタンパク質を指す。細胞物質を実質的に含まないこともあるタンパク質は、約30%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満（乾燥重量比）の汚染タンパク質を有するタンパク質の調製物を含む。タンパク質またはその変異体が宿主細胞によって組換え産生されるとき、タンパク質は、細胞の乾燥重量の約30%、約20%、約15%、約10%、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%以下で存在し得る。タンパク質またはその変異体が宿主細胞によって組換え産生される場合、タンパク質は、細胞の乾燥重量の約5g/L、約4g/L、約3g/L、約2g/L、約1g/L、約750mg/L、約500mg/L、約250mg/L、約100mg/L、約50mg/L、約10mg/L、または約1mg/L以下で培養液中に存在してもよい。したがって、「実質的に精製された」タンパク質は、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC、およびキャピラリー電気泳動などの適切な方法によって決定されるように、少なくとも約80%の純度レベル、具体的には、少なくとも約85%の純度レベル、より具体的には、少なくとも約90%の純度レベル、少なくとも約95%の純度レベル、少なくとも約99%以上の純度レベルを有することもある。

【0082】

本発明のタンパク質とプロドラッグは、それらの調製後、好ましくは80%以上（「実質的に純粋」）の重量を含む組成物を得るために単離および／または精製され、その後、本明細書で記載されるように使用または製剤化される。特定の実施形態において、本発明の化合物は95%を超えて純粋である。

【0083】

本明細書で使用されるように、「受容体」という用語は、リガンドと呼ばれる別の分子と相互作用することができる、糖タンパク質またはそのフラグメントを含むタンパク質を指す。リガンドは、生化学的または化学的な化合物の任意のクラスに属することがある。リガンドは通常、受容体に結合すると、シグナル伝達経路の開始などの細胞応答を通常、開始する細胞外分子である。受容体は、必ずしも膜結合タンパク質である必要はない。

【0084】

本明細書で使用されるように、核酸分子に対する「組換え」という用語は、ゲノム、cDNA、ウイルス、半合成、および／または合成由来のポリヌクレオチドを意味し、このポリヌクレオチドは、その由来または操作によって、自然界でそれが関連するポリヌクレオチドのすべてまたは一部に関連付けられないことを意味する。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される「組換え」という用語は、組換えポリヌクレオチドの発現によって産生されるポリペプチドを意味する。宿主細胞に関して使用される「組換え」という用語は、組換えポリヌクレオチドが導入された宿主細胞を意味する。

【0085】

本明細書で使用されるように、「組換えウイルス」という用語は、人の手によって遺伝子組換えされたウイルスを指す。この語句は、当該技術分野で知られている任意のウイル

スをカバーする。

【0086】

本明細書で使用されるように、「試料」という用語は、ヒト、動物、または研究用試料、例えば、細胞、組織、器官、流体、気体、エアロゾル、スラリー、コロイド、または凝固物からの試料を指す。「試料」は、例えば、ヒトまたは動物から除去することなく、インビトロで試験されることもあれば、あるいは、インビトロで試験されることもある。「試料」は、処理後、例えば、組織学的方法によって試験されてもよい。「試料」はさらに、例えば、流体または組織試料を含む細胞、あるいは、流体または組織試料から分離された細胞を指す。「試料」はさらに、ヒトまたは動物から新鮮に採取される細胞、組織、器官、または流体、あるいは加工または保存された細胞、組織、器官、または流体を指すこともある。

10

【0087】

本明細書で使用されるように、「可溶性」という用語は、水性緩衝液、例えば、細胞培地からの低Gフォース遠心分離（例えば、標準的な遠心分離器で毎分約30,000回転未満）では容易に沈降しない融合分子、特に融合タンパク質を指す。融合分子は、アニオン性または非イオン性界面活性剤の低濃度または無濃度の存在下で、約5-37°Cよりも大きい温度で、中性またはそれに近いpHで水溶液中に残存する場合に、可溶性である。このような条件下では、可溶性タンパク質はしばしば、低い沈降値、例えば、約10-約50未満のスベドベリ単位を有する。

【0088】

本明細書で参照される水溶液は典型的には、約5-9のpH範囲内であり、かつ、約2mM-500mMの間のイオン強度範囲にある、典型的にはpHを確立するための緩衝化合物を有する。場合によっては、プロテアーゼ阻害剤またはマイルドな非イオン性界面活性剤が添加される。さらに、必要に応じて、担体タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）が添加され得る。例示的な水性緩衝剤は、標準的なリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、または他の周知の緩衝剤および細胞培地製剤を含む。

20

【0089】

本明細書では、「刺激する」または「刺激すること」という用語は、生理活性、例えば免疫応答を増大し、増幅し、増強し、押し上げることを指す。刺激は肯定的性質変化である場合がある。例えば、5%、10%、25%、50%、75%、またはさらに90-100%増大する場合がある。他の例示的な増加として、2倍、5倍、10倍、20倍、40倍、またはさらに100倍が挙げられる。

30

【0090】

本明細書では、「被験体」および「患者」という用語は、生きた動物（ヒトまたはヒト以外）を指すように互換的に使用される。この被験体は哺乳動物でもよい。「哺乳動物」または「哺乳類」という用語は、分類学的分類哺乳綱内の任意の動物を指す。哺乳動物は、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラット、およびマウスでもよい。「被験体」という用語は、疾患あるいは状態に関して完全に正常である、または全ての点で正常である個体を除外するものではない。

【0091】

本明細書では、「抑制する」または「抑制すること」という用語は、生理活性、例えば免疫応答を低下させる、減衰させる、減少させる、停止させる、または安定化させることを指す。抑制は否定的性質変化である場合がある。例えば、5%、10%、25%、50%、75%、またはさらに90-100%低下する場合がある。例示的な低下として、2倍、5倍、10倍、20倍、40倍、またはさらに100倍が挙げられる。

40

【0092】

本明細書では、「治療上有効な量」という用語は、望ましくない副作用が最小限であるか、または全くない意図した治療効果を達成するのに十分な治療薬の投与量を指す。治療上有効な量は、当業者により、例えば、先ず低用量の薬理学的薬剤を投与し、次に望ましくない副作用が最小限または全くない状態で所望の治療効果が達成されるまで投与量を徐

50

々に増やすことにより、容易に決定することができる。

【0093】

本明細書では、「トランスフェクトした」という用語は、リポフェクタミンなどの付随する促進剤の使用の有無にかかわらず、導入されたDNAまたはRNAを持つことを意味する。当該技術分野で既知のトランスフェクションの方法としては、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラントランスフェクション、原形質体融合、電気穿孔、およびリポフェクションが挙げられる。

【0094】

本明細書では、疾患もしくは障害を「処置」または「処置すること」という用語は、発生の前もしくは後に、このような状態、または、このような疾患または状態の1つ以上の症状を減らし、遅延し、または改善する方法を指す。処置は、疾患および／または基礎的な病態の1つ以上の作用または症状を対象としてもよい。前記処置は任意の軽減であってもよく、疾患またはその症状の完全な消失が挙げられるが、これに限定されない。同等の未処置の対照と比較して、このような軽減、または予防の程度は、任意の標準技術により測定されるように少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、または100%である。

10

【0095】

本明細書では、「腫瘍」という用語は、任意の悪性細胞または腫瘍性細胞を指す。

【0096】

本明細書では、「ベクター」という用語は、遺伝物質を宿主細胞または生物に伝達可能な核酸分子を指す。ベクターは、DNAまたはRNAのいずれかで構成されてもよい。ベクターは、その独自の複製起源、外来DNAの挿入に使用可能な制限エンドヌクレアーゼに対する1つ以上の固有認識部位、抗生物質耐性をコードする遺伝子などの通常選択可能なマーカー、ならびに多くの場合は挿入DNAの発現のための認識配列（例えばプロモーター）を保因する。一般的なベクターは、プラスミドベクターおよびファージベクターを含む。

20

【0097】

本明細書に開示される任意の組成物または方法は、本明細書で提供される他の組成物および方法のいずれか1つ以上と組み合わせることができる。

【発明を実施するための形態】

30

【0098】

本発明は、新規の融合タンパク質およびその治療用途を提供する。より具体的に本発明は、IL12の新規融合タンパク質およびそのプロドラッグ、組成物、およびその調製方法を提供する。これらは、処置中に標的外毒性および副作用の低下が伴う様々な疾患および障害、例えば、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍を処置するのに有用である。

【0099】

一態様では、本発明は全体として、融合タンパク質に関する。前記融合タンパク質は、P35およびP40サブユニットから選択されるIL12の1つ以上のサブユニットである第1の構造単位であって、前記融合タンパク質のN末端に位置する、第1の構造単位と、抗体Fcフラグメントである第2の構造単位であって、前記融合タンパク質のC末端に位置する、第2の構造単位と、前記第1の構造単位と前記第2の構造単位とを共有結合する、または前記第1の構造単位のうち2つのサブユニットを共有結合する第1のリンカーセグメントとを含む。

40

【0100】

融合タンパク質のある実施形態では、P35およびP40サブユニットは、ヒト、サル、マウス、イヌ、ラット、ウシ、ブタ、およびヒツジからなる群から選択される哺乳動物に由来する。

【0101】

融合タンパク質のある実施形態では、P35およびP40サブユニットはヒト由来である。融合タンパク質のある実施形態では、P35およびP40サブユニットはサル由来で

50

ある。融合タンパク質のある実施形態では、P 3 5 および P 4 0 サブユニットはマウス由来である。融合タンパク質のある実施形態では、P 3 5 および P 4 0 サブユニットはイス由来である。融合タンパク質のある実施形態では、P 3 5 および P 4 0 サブユニットは、ラットから選択される哺乳動物由来である。融合タンパク質のある実施形態では、P 3 5 および P 4 0 サブユニットはウシ由来である。融合タンパク質のある実施形態では、P 3 5 および P 4 0 サブユニットはブタ由来である。融合タンパク質のある実施形態では、P 3 5 および P 4 0 サブユニットはヒツジ由来である。

【0102】

任意の適切な抗体 F c 断片を利用してもよい。

【0103】

融合タンパク質のある実施形態では、抗体 F c 断片はヒト F c 断片を含む。ある実施形態では、抗体 F c 断片は、SEQ ID No. 5 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0104】

ある実施形態では、抗体 F c 断片はヒト I g G 1 を含む。ある実施形態では、抗体 F c 断片は、SEQ ID No. 6 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0105】

ある実施形態では、ヒト I g G 1 は、ヒト F c - ノブまたはヒト F c - ホールである。

【0106】

ある実施形態では、ヒト I g G 1 は、SEQ ID No. 7 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0107】

融合タンパク質のある実施形態では、マウス P 3 5 サブユニットは、SEQ ID No. 3 に記載のアミノ酸配列を有する。

【0108】

融合タンパク質のある実施形態では、ヒト P 3 5 サブユニットは、SEQ ID No. 4 に記載のアミノ酸配列を有する。

【0109】

融合タンパク質のある実施形態では、マウス P 4 0 サブユニットは、SEQ ID No. 1 に記載のアミノ酸配列を有する。

【0110】

融合タンパク質のある実施形態では、ヒト P 4 0 サブユニットは、SEQ ID No. 2 に記載のアミノ酸配列を有する。

【0111】

融合タンパク質のある実施形態では、第 1 のリンカーセグメント L 1 は、SEQ ID No. 12 に記載のアミノ酸配列を有する。

【0112】

ある実施形態では、融合タンパク質は、例えば第 1 の構造単位の N 末端で修飾されたシグナルペプチドをさらに含む。

【0113】

ある実施形態では、マウス P 3 5 サブユニットの N 末端で修飾されたシグナルペプチド S P 1 は、SEQ ID No. 27 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0114】

ある実施形態では、マウス P 3 5 サブユニットの N 末端で修飾されたシグナルペプチド S P 1 は、SEQ ID No. 28 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0115】

ある実施形態では、マウス P 4 0 サブユニットの N 末端で修飾されたシグナルペプチド S P 2 は、SEQ ID No. 29 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0116】

ある実施形態では、ヒト P 4 0 サブユニットの N 末端で修飾されたシグナルペプチド S P 2 は、SEQ ID No. 30 に記載のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0117】

ある実施形態では、融合タンパク質はさらに、第2のリンカーセグメント(L2)により第1の構造単位(N末端)に共有結合されるインターロイキン12受容体(IL12R)の部分を含む。ある実施形態では、IL12Rは、Rβ1およびRβ2から選択される。

【0118】

ある実施形態では、マウスRβ1はSEQ ID No. 8に記載のアミノ酸配列を含み、マウスRβ2はSEQ ID No. 10に記載のアミノ酸配列を含む。

【0119】

ある実施形態では、ヒトRβ1はSEQ ID No. 9に記載のアミノ酸配列を含み、ヒトRβ2はSEQ ID No. 11に記載のアミノ酸配列を含む。

10

【0120】

融合タンパク質のある実施形態では、第2のリンカーセグメントL2は、腫瘍微小環境に特異的に発現されるタンパク質分解酵素により認識され、かつ加水分解される場合がある。

【0121】

ある実施形態では、腫瘍微小環境に特異的に発現されるタンパク質分解酵素は、マトリクスメタロプロテアーゼ、例えばマトリクスメタロプロテアーゼ14(MMP14)である。

【0122】

融合タンパク質のある実施形態では、第2のリンカーセグメントL2は、SEQ ID No. 13~26に記載のアミノ酸配列を含む。

20

【0123】

融合タンパク質のある実施形態では、IL12RのC末端はL2を介して第1の構造単位(N末端)に結合され、第1の構造単位(C末端)と第2の構造単位(N末端)はL1により結合される。第1の構造単位が2つのサブユニットを含む場合、第1のサブユニットのC末端と第2のサブユニットのN末端は、リンカーセグメントL1により結合される。

【0124】

別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される融合タンパク質を含む、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質に関する。

【0125】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、マウスP40サブユニット、L1リンカー、マウスP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトIgG1の融合タンパク質を含む、例えばSEQ ID No. 31に記載のアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である。

30

【0126】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、ヒトP40サブユニット、L1リンカー、ヒトP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトIgG1の融合タンパク質を含む、例えばSEQ ID No. 32に記載のアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である。

【0127】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、第1の単量体：マウスP40サブユニット、L1リンカー、およびヒトFcγ3を含み、SEQ ID No. 33に記載のアミノ酸配列を有する融合タンパク質、ならびに第2の単量体：マウスP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトFcγ1を含む、例えばSEQ ID No. 35に記載のアミノ酸配列構造を有する融合タンパク質の、ヘテロ二量体である。

40

【0128】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、第1の単量体：ヒトP40サブユニット、L1リンカー、およびヒトFcγ3を含み、SEQ ID No. 34に記載のアミノ酸配列を有する融合タンパク質、ならびに第2の単量体：ヒトP3

50

5サブユニット、L1リンカー、およびヒトFc-ホールを含む、例えばSEQ ID No. 36に記載のアミノ酸配列構造を有する融合タンパク質の、ヘテロ二量体である。

【0129】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、マウスIL12Rβ1、マウスP40サブユニット、L1リンカー、マウスP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトIgG1であり、例えばSEQ ID No. 37に記載のアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である。

【0130】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、ヒトIL12Rβ1、ヒトP40サブユニット、L1リンカー、ヒトP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトIgG1であり、例えばSEQ ID No. 38に記載のアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である。

【0131】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、マウスIL12Rβ2、マウスP40サブユニット、L1リンカー、マウスP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトIgG1であり、例えばSEQ ID No. 39に記載のアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である。

【0132】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、ヒトIL12Rβ2、ヒトP40サブユニット、L1リンカー、ヒトP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトIgG1であり、例えばSEQ ID No. 40に記載のアミノ酸配列を有する単量体のホモ二量体である。

【0133】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、マウスIL12Rβ1、L2リンカー、マウスP40サブユニット、L1リンカー、ヒトFc-ノブの融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 41に記載のアミノ酸配列を有する第1の単量体、ならびに、マウスIL12Rβ2、L2リンカー、マウスP35サブユニット、L1リンカー、およびIL12のヒトFc-ホールの融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 43に記載のアミノ酸配列を有する第2の単量体の、ヘテロ二量体である。

【0134】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、ヒトIL12Rβ1、L2リンカー、ヒトP40サブユニット、L1リンカー、ヒトFc-ノブの融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 42に記載のアミノ酸配列を有する第1の単量体、ならびに、ヒトIL12Rβ2、L2リンカー、ヒトP35サブユニット、L1リンカー、およびIL12のヒトFc-ホールの融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 44に記載のアミノ酸配列を有する第2の単量体の、ヘテロ二量体である。

【0135】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、マウスIL12Rβ1、L2リンカー、マウスP40サブユニット、L1リンカー、ヒトFc-ノブの融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 45に記載のアミノ酸配列を有する第1の単量体、ならびに、SP1シグナルペプチドを含むマウスP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトFc-ホールを含む融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 47に記載のアミノ酸配列を有する第2の単量体の、ヘテロ二量体である。

【0136】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、ヒトIL12Rβ1、L2リンカー、ヒトP40サブユニット、L1リンカー、ヒトFc-ノブの融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 46に記載のアミノ酸配列を有する第1の単量体、ならびに、SP1シグナルペプチドを含むヒトP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトFc-ホールを含む融合タンパク質であり、例えばSEQ ID No. 48

10

20

30

40

50

に記載のアミノ酸配列を有する第2の単量体の、ヘテロ二量体である。

【0137】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、第1の単量体：マウスP40サブユニット、L1リンカー、およびヒトFc γ ノブを含む、例えばSEQ ID No. 49に記載のアミノ酸配列を有する融合タンパク質、ならびに第2の単量体：マウスIL12R β 2、L2リンカー、マウスP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトFc γ ホールを含む、例えばSEQ ID No. 51に記載のアミノ酸配列構造を有する融合タンパク質の、ヘテロ二量体である。

【0138】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、第1の単量体：ヒトP40サブユニット、L1リンカー、およびヒトFc γ ノブを含む、例えばSEQ ID No. 50に記載のアミノ酸配列を有する融合タンパク質、ならびに第2の単量体：ヒトIL12R β 2、L2リンカー、ヒトP35サブユニット、L1リンカー、およびヒトFc γ ホールを含む、例えばSEQ ID No. 52に記載のアミノ酸配列構造を有する融合タンパク質の、ヘテロ二量体である。

10

【0139】

ある実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質は、腫瘍微小環境に特異的に発現されるタンパク質分解酵素により加水分解される。

【0140】

また別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される融合タンパク質または断片などの、実質的に精製されたタンパク質に関する。

20

【0141】

また別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0142】

また別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される融合タンパク質または断片などのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクターに関する。

【0143】

また別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質と、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤とを含む医薬組成物に関する。

30

【0144】

また別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤とを含む医薬組成物に関する。

【0145】

また別の態様では、本発明は全体として、疾患または状態を処置するための方法に関する。該方法は、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを治療上有効な量で患者に投与する工程を含み、前記疾患または状態は、過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍から選択される。

40

【0146】

ある実施形態では、処置される疾患または状態は過形成である。

【0147】

ある実施形態では、処置される疾患または状態は固形腫瘍である。

【0148】

ある実施形態では、処置される疾患または状態は造血器悪性腫瘍である。

【0149】

ある実施形態では、処置される被験体はさらに、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、またはホルモン療法のうち1つ以上を施される。

【0150】

50

ある実施形態では、前記方法は、化学療法剤を被験体に投与する工程をさらに含む。

【0151】

ある実施形態では、前記方法は、被験体に放射線療法を施す工程をさらに含む。

【0152】

ある実施形態では、前記方法は、被験体に標的療法を施す工程をさらに含む。

【0153】

ある実施形態では、前記方法は、被験体に免疫療法を施す工程をさらに含む。

【0154】

ある実施形態では、前記方法は、被験体にホルモン療法を施す工程をさらに含む。

【0155】

本明細書では、「化学療法剤」という用語は、癌の処置に有用な化合物を指す。化学療法剤の例として、エルロチニブ (TARCEVA (登録商標)、Genentech/O S I Pharm.)、ボルテゾミブ (VERCADE (登録商標)、Mremine i um Pharm.)、フルベストラント (FASLODEX (登録商標)、Astra Zeneca)、ステント (SU11248、Pfizer)、レトロゾール (FEMARA (登録商標)、Novartis)、メシル酸イマチニブ (GLEEVEC (登録商標)、Novartis)、PTK787/ZK 222584 (Novartis)、オキサリプラチン (Eloxatin (登録商標)、Sanofi)、5-FU (5-フルオロウラシル)、ロイコボリン、ラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標)、Wyeth)、ラパチニブ (TYKERB (登録商標)、GSK572016、Glaxo Smith kline)、ロナファルニブ (SCH66336)、ソラフェニブ (BAY43-9006、Bayer Labs)、およびゲフィチニブ (IRESA (登録商標)、AstraZeneca)、AG1478、AG1571 (SU5271; Sugen)、チオテパおよびCYTOXAN (登録商標) シクロスホスファミドなどのアルキル化剤、ブスルファン、イムプロスルファン、およびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル、ベンゾドパ、カルボクオン、メトレドパ、およびウレドパなどのアジリジン、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン、アセトゲニン (特にブラタシンおよびブラタシノン)、カンプトテシン (合成アナログトポテカンを含む)、ブリオスタチン、カリストアチン、CC-1065 (その

アドゼレシン、カルゼルシン、およびビゼレシン合成アナログを含む)、クリプトフィシン (特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)、ドラスタチン、デュオカルマイシン (合成アナログ、KW-2189、およびCB1-TM1を含む)、エリユテロビン、パンクラチスタチン、サルコジクチイン、スポンジスタチン、ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、およびウラシルマスタード、ニトロソウレア、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン、エンジン系抗生物質などの抗生物質 (例えばカリチエアミシン、特にカリケアマイシガンマール (gamma11) およびカリケアマイシンオメガール (omegal1) (例えば、Agnew, Chem I nt l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) を参照)、ジネマイシン Aを含むジネマイシン、クロドロネートなどのビスホスホネート、エスペラミシン、ネオカルジノスタチン発色団および関連の色素タンパクエンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN (登録商標) (ドキソルビシン)、モルホリノードキソルビシン、シアノモルホリノードキソルビシン、2-ピロリノ

10

20

30

40

50

ードキソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソニピシン (esonibicin)、イダルピシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン (olivomycins)、ペプロマイシン、ポボルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU) などの抗代謝物、葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、およびトリメトトレキサート、プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、およびチオグアニン、ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、およびフロクスウリジン、アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトン、抗アドレナリン、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、およびトリロスタン、フォリン (frolinilic) 酸などの葉酸補液、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル (bestrabucil)、ビスアントレン (bisantrene)、エダトラキセート (edatraxate)、デフォファミン (defofamine)、デメコルシン (demecolcine)、ジアジコン (diaziquone)、エルフォルニチン (elfornithine)、酢酸エリプチニウム、エポチロン、エトグルシド (etoglucid)、硝酸ガリウム、ヒドロキシウレア、レンチナン、ロニダイニン (lonidainine)、メイタンシン (maytansine) およびアンサミトシンなどのメイタンシノイド、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダンモール (mopidanmol)、ニトラエリン (nitraerine)、ペントスタチン、フェナメット (phenamet)、ピラルピシン、ロソキサントロン (losoxantrone)、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、PSK (登録商標) 多糖類複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR)、ラゾキサン、リゾキシン、シゾフィラン (sizofiran)、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジクオン、2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン (特にT-2トキシン、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン)、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン (gacytosine)、アラビノシド (「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、例えばTAXOL (登録商標) (パクリタキセル、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、ABRAXANE (登録商標) (クレモフォルフリー)、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)、およびTAXOTERE (登録商標) ドキセタキセル、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)、クロランブシル (chloranbucil)、GEMZAR (登録商標) (ゲムシタビン)、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類似体、ビンブラスチン、エトポシド (VP-16)、イホスファミド、ミトキサントロン、ビンクリスチン、NAVELBINE (登録商標) (ビノレルビン)、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、カペシタビン (XELODA (登録商標))、イバンドロネート、CPT-11、トポイソメラーゼ阻害剤、RFS2000、ジフルオロメチロミチン (difluoromethylomithine) (DMFO)、レチノイン酸などのレチノイド、ならびに、上述のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸、誘導体が挙げられる

【0156】

第2の(またはさらなる)薬剤または治療薬の例として、免疫療法薬(例えばPD-1阻害剤(ペンブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ)、PD-L1阻害剤(アテゾリ

10

20

30

40

50

ズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ）、C T L A 4 アンタゴニスト（イピリムマブ）、細胞シグナル伝達阻害剤（例えばイマチニブ、ゲフィチニブ、ボルテゾミブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ダサチニブ、ボリノスタット、ラパチニブ、テムシロリムス、ニロチニブ、エベロリムス、パゾパニブ、トラスツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ラニビズマブ、ペガブタニブ、パニツムマブなど）、有糸分裂阻害剤（例えばパクリタキセル、ビンクリスチン、ビンブラスチンなど）、アルキル化剤（例えばシスプラチン、シクロホスファミド、クロマブシル、カルムスチンなど）、抗代謝物（例えばメトトレキサート、5-FU など）、挿入抗癌剤（例えばアクチノマイシン、アントラサイクリン、プレオマイシン、マイトマイシン-C など）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えばイリノテカン、トポテカン、テニポシドなど）、免疫療法剤（例えばインターロイキン、インターフェロンなど）、ならびに抗ホルモン剤（例えばタモキシフェン、ラロキシフェンなど）が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0157】

また別の態様では、本発明は全体として、疾患または障害（例えば過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置または軽減するための、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質の使用に関する。

【0158】

また別の態様では、本発明は全体として、疾患または障害（例えば過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置または軽減するための、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用に関する。

20

【0159】

また別の態様では、本発明は全体として、疾患または障害（例えば過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置または軽減するための薬剤の調製における、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質、および薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤の使用に関する。

【0160】

また別の態様では、本発明は全体として、疾患または障害（例えば過形成、固形腫瘍、または造血器悪性腫瘍）を処置または軽減するための薬剤の調製における、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤の使用に関する。

30

【0161】

ある実施形態では、前記薬剤は抗癌剤である。

【0162】

ある実施形態では、前記疾患または障害は、頭頸部癌、子宮内膜癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌、黒色腫、肺癌、腎癌、肝癌、肛門癌、肉腫、リンパ腫、白血病、脳腫瘍、胃癌、精巣癌、膵臓癌、および甲状腺癌から選択される1つ以上である。

【0163】

ある実施形態では、抗癌剤は、B細胞リンパ腫の処置または抗大腸癌に有効である。

【0164】

また別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される融合タンパク質または断片などのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、細胞株に関する。

40

【0165】

また別の態様では、本発明は全体としてタンパク質を製造する方法に関し、該方法は前記細胞株を培養する工程を含む。ある実施形態では、前記方法は、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などの生成タンパク質を精製または単離する工程をさらに含む。

【0166】

また別の態様では、本発明は全体として、タンパク質を製造する方法に関する。該方法は、本明細書に開示される融合タンパク質またはその断片などのタンパク質をコードする発現ベクターを提供する工程と、該発現ベクターを宿主細胞に導入する工程と、タンパク

50

質を発現するのに十分な条件にて培地中で前記宿主細胞を培養する工程と、前記宿主細胞または培地から前記タンパク質を精製する工程とを含む。

【0167】

任意の適切な発現ベクターを利用してもよい。例示的な発現ベクターは p E E 1 2 . 4 発現ベクターである。

【0168】

任意の適切な宿主細胞、例えば 2 9 3 F 細胞や C H O 細胞を利用してもよい。

【0169】

発現ベクターの導入は、任意の適切なトランスフェクション方法により達成することができ、かつ、一過的なトランスフェクションまたは安定した細胞株を介して行うことができる。

10

【0170】

任意の適切な精製方法を利用してもよい。例示的な精製方法は、P r o t e i n A / G のアフィニティークロマトグラフィー、またはサイズ除去方法により行われる。

【0171】

また別の態様では、本発明は全体として、本明細書に開示される方法により生成される単離タンパク質に関する。

【0172】

ある実施形態では、この単離タンパク質は実質的に純粋である。

【0173】

本明細書に開示されるように、生物学的に活性なポリペプチドの2つ以上のポリペプチドを結合させて所望の機能的活性を持つ単鎖分子を生成するために、リンカー配列を使用することができる。

20

【0174】

任意の適切なリンカーを利用してもよい。例示的なペプチドリリンカー配列として、約7~20のアミノ酸、例えば約8~16のアミノ酸を有する配列が挙げられる。前記リンカー配列は、生物学的に活性なポリペプチドまたはエフェクター分子を望ましくない1つの立体構造に保持しないように可動性であることが好ましい。例えば認識部位と融合分子との間隔を空けるために、このリンカー配列を使用することができる。具体的に、ペプチドリリンカー配列は、分子の可動性を提供するように位置決めすることができる。リンカーは、可動性を提供するために、グリシン、アラニン、およびセリンなどの、小さな側鎖を持つアミノ酸を主に含むことが好ましい。

30

【0175】

通常、本発明の融合タンパク質複合体の調製は、本明細書に開示される手順により、および、例えばポリメラーゼ連鎖増幅反応 (P C R)、プラスミド D N A の調製、制限酵素による D N A の切断、オリゴヌクレオチドの調製、D N A のライゲーション、m R N A の単離、D N A の適切な細胞への導入、宿主の形質転換またはトランスフェクション、宿主の培養を含む、認知されている組み換え D N A 技術により達成することができる。さらに前記融合分子は、カオトロピック剤、ならびに周知の電気泳動、遠心分離、およびクロマトグラフィー法を使用して単離および精製することができる (これら方法に関する開示については、S a m b r o o k , e t a l . , 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 (2 n d e d . (1 9 8 9) 、および A u s u b e l , e t a l . , 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 , N e w Y o r k (1 9 8 9) を参照)。

40

【0176】

本発明はさらに、本融合タンパク質をコードする核酸配列および D N A 配列を提供する。この D N A 配列は、ファージ、ウイルス、プラスミド、ファージミド、コスミド、Y A C、またはエピソームなど、染色体外複製に適したベクターにより保因されてもよい。例えば、所望の融合タンパク質をコードする D N A ベクターは、本明細書に記載の調製方法

50

を容易にする、かつ相当量の融合タンパク質またはその成分を得るために使用されてもよい。DNA配列は、適切な発現ベクター、すなわち、挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクターに挿入することができる。様々な宿主ベクター系を利用して、タンパク質コード配列を発現させてもよい。これらの系として、ウイルス（例えばワクシニアウイルス、アデノウイルスなど）に感染した哺乳動物細胞系、ウイルス（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、酵母ベクターを含む酵母などの微生物、またはバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAで形質転換された細菌が挙げられる。利用される宿主ベクター系に応じて、多くの適切な転写および翻訳要素のいずれか1つを使用してもよい（これら方法に関する開示については、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed. (1989)、およびAusubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1989)を参照)。

10

【0177】

DNAベクターによりコードされる融合タンパク質成分は、カセット形式で提供することができる。「カセット」という用語は、標準の組み換え方法により各成分が別の成分へと容易に置換可能であることを意味する。具体的に、カセット形式で構成されるDNAベクターは、血清型を発生させる能力を持つ、またはその可能性がある病原体に対してコード化された融合複合体が使用される場合に特に望ましい。

20

【0178】

融合タンパク質複合体をコードするベクターを作るために、生物学的に活性なポリペプチドをコードする配列は、適切なリガーゼを使用してエフェクターペプチドに結合される。存在するペプチドをコードするDNAは、適切な細胞株などの天然供給源からDNAを単離することにより、または既知の合成法、例えばリン酸トリエステル法により得ることができる(Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, M. J. Gait, ed., 1984)。合成オリゴヌクレオチドは、市販の自動オリゴヌクレオチド合成装置を用いて調製されてもよい。一旦単離されると、生物学的に活性なポリペプチドをコードする遺伝子は、PCR、または当技術分野で既知の他の手段により増幅することができる。生物学的に活性なポリペプチド遺伝子を増幅するのに適したPCRプライマーは、PCR産物に制限部位を付加することができる。PCR産物は、生物学的に活性なポリペプチドエフェクター融合複合体の適切な発現と分泌に必要な、エフェクターペプチドとリーダー配列に対するスプライス部位を含むのが好ましい。PCR産物は、リンカー配列をコードする配列、またはそのような配列のライゲーションのための制限酵素部位を含むことも好ましい。

30

【0179】

本明細書に記載される融合タンパク質は、標準の組み換えDNA技術により生成されてもよい。例えば、生物学的に活性なポリペプチドをコードするDNA分子が単離されると、配列は、エフェクターポリペプチドをコードする別のDNA分子に結合される場合がある。生物学的に活性なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、エフェクターペプチドをコードするDNA配列に直接結合することができるか、またはより一般的には、本明細書で議論されるようなリンカー配列をコードするDNA配列は、生物学的に活性なポリペプチドをコードする配列とエフェクターペプチドをコードする配列との間に挿入され、かつ適切なリガーゼを用いて結合されてもよい。結果として生じるハイブリッドDNA分子を適切な宿主細胞に発現させて、融合タンパク質複合体を生成することができる。DNA分子は5'～3'配向で互いにライゲートされ、そうすることで、ライゲーション後、コードされたポリペプチドの翻訳フレームは改質されない（すなわち、DNA分子はフレーム内で互いにライゲートされる）。結果として生じるDNA分子は、フレーム内融合タンパク質をコードする。

40

【0180】

50

他のヌクレオチド配列も遺伝子構築物に含めることができる。例えば、エフェクターペプチドに融合した生物学的に活性なポリペプチドをコードする配列の発現を調節するプロモーター配列、または融合タンパク質を細胞表面もしくは培養培地に誘導するリーダー配列は、構築物中に含まれるか、または該構築物が挿入される発現ベクター中に存在する場合がある。

【0181】

変異体の生物学的に活性なポリペプチド、I L 1 2、I L 1 2 R、またはFcドメインコード配列を得る際に、生物学的活性の損失または減少を伴うことなく、ポリペプチドがある種のアミノ酸置換、付加、欠失、および翻訳後修飾により修飾されてもよいことが、当業者に認識されるであろう。具体的に、保存的アミノ酸置換、すなわち同様のサイズ、電荷、極性、および立体配座を持つ別のアミノ酸に対する1つのアミノ酸の置換は、タンパク質機能を有意に改質する可能性が低いことが、よく知られている。タンパク質の構成成分である20の標準アミノ酸は、次のように保存的アミノ酸の4つの群へと広く分類することができる。非極性（疎水性）群はアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、およびバリンを含み、極性（非荷電、中性）群はアスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、セリン、トレオニン、およびチロシンを含み、正帯電（塩基性）群はアルギニン、ヒスチジン、およびリジンを含み、負帯電（酸性）群はアスパラギン酸とグルタミン酸を含む。同群内での1つのアミノ酸のタンパク質における別のタンパク質に対する置換は、タンパク質の生物学的活性に悪影響を及ぼす可能性が低い。他の例では、アミノ酸位置への修飾は、タンパク質の生物学的活性を低下または増強するために行うことができる。このような変化は、標的残基の既知もしくは推定される構造的特性か機能的特性に基づいて、無作為に、または部位特異的変異を介して導入することができる。変異体タンパク質の発現後、修飾による生物学的活性の変化は、結合アッセイまたは機能的アッセイを用いて容易に評価することができる。

【0182】

ヌクレオチド配列間の相同性はDNAハイブリダイゼーション分析により決定することができ、その中で二本鎖DNAハイブリッドの安定性は生じる塩基対の程度に左右される。高温および／または低塩含有量の条件によりこのハイブリッドの安定性は低下し、この条件は、選択された相同性未満の相同性を持つ配列のアニーリングを妨げるように変動する場合がある。例えば、G-C含有量が約55%の配列では、40～50℃、6×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウムバッファー）、および0.1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）のハイブリダイゼーション・洗浄条件により、約60～70%の相同性が示され、50～65℃のハイブリダイゼーション・洗浄条件では約82～97%の相同性が、52℃、0.1×SSC、および0.1%SDSのハイブリダイゼーション・洗浄条件では約99～100%の相同性が示される。ヌクレオチドをアミノ酸配列と比較する（および相同性の程度を測定する）ための多種多様なコンピュータプログラムも利用可能である。容易に利用可能な配列比較および複数配列アライメントアルゴリズムはそれぞれ、Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）およびClustalWプログラムである。

【0183】

本発明のタンパク質融合複合体を発現させるために多くの戦略を利用することができる。例えば、上述の融合タンパク質構築物は、制限酵素の使用など既知の手段により適切なベクターへと組み込まれることで、構築物の挿入、続いてライゲーションのためにベクターを切断することができる。次いで遺伝子構築物を含むベクターは、融合タンパク質を発現するのに適切な宿主に導入される（これら方法に関する開示については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., (1989)を参照)。

【0184】

適切なベクターの選択は、クローニングプロトコルに関連する因子に基づき経験的に行うことができる。例えば、前記ベクターは、利用される宿主に対して適切なレプリコンに

適合し、かつ該レプリコンを有していなければならない。さらに前記ベクターは、発現される融合タンパク質複合体をコードするDNA配列に適応可能でなければならない。適切な宿主細胞としては、真核生物細胞および原核生物細胞、好ましくは、容易に形質転換可能でありかつ培養培地中で急速な増殖を示す細胞が挙げられる。具体的には、好ましい宿主細胞として、*E. coli*、*Bacillus subtilis*などの原核生物、および動物細胞や酵母株などの真核生物、例えば*S. cerevisiae*が挙げられる。全体として哺乳動物細胞、特にJ558、NSO、SP2-O、またはCHOが好ましい。他の適切な宿主として、例えばSf9などの昆虫細胞が挙げられる。従来の培養条件が利用される。上述のSambrookを参照。次いで、形質転換またはトランスフェクトされた安定した細胞株を選択することができる。本発明の融合タンパク質複合体を発現する細胞は、既知の手順により決定することができる。例えば、免疫グロブリンに結合した融合タンパク質複合体の発現は、結合した免疫グロブリンに特異的なELISA、および／または免疫ブロッティングにより決定することができる。IL12またはIL12Rドメインに結合した生物学的に活性なポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を検出する他の方法が、実施例に開示される。

【0185】

宿主細胞は、所望の融合タンパク質またはその成分をコードする核酸を増殖させるため調製目的に使用することができる。宿主細胞は、融合タンパク質の生成が特異的に意図される原核生物細胞または真核生物細胞を含む場合がある。ゆえに宿主細胞としては具体的に、酵母、ハエ、虫、植物、カエル、哺乳動物の細胞、および、融合をコードする核酸を増殖可能な器官が挙げられる。使用可能な哺乳動物細胞株の非限定的な例として、CHO dhfr細胞 (Urlaub and Chasman, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216)、293細胞 (Graham et al., 1977 J. Gen. Virol., 36:59 ()), またはSP2かNSOのような骨髓腫細胞 (Galfrè and Milstein, 1981 Meth. Enzymol., 73 (B):3) が挙げられる。

【0186】

所望の融合タンパク質複合体をコードする核酸を増殖可能な宿主細胞は、昆虫 (例えば *Sp. frugiperda*)、酵母 (例えば、通常はFleer, R., 1992 Current Opinion in Biotechnology, 3 (5):486 496に概説されるような*S. cerevisiae*、*S. pombe*、*P. pastoris*、*K. lactis*、*H. polymorpha*)、真菌、および植物細胞を含む、非哺乳動物真核生物細胞も包含する。また、*E. coli*や*Bacillus*などの特定の前核生物も企図される。

【0187】

所望の融合タンパク質をコードする核酸は、細胞をトランスフェクトする標準技法により宿主細胞に導入させることができる。「トランスフェクトすること」または「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ウイルス形質導入、および／または組み込みを包含するように意図されている。

【0188】

様々なプロモーター (転写開始調節領域) を本発明に従って使用してもよい。適切なプロモーターの選択は、提案された発現宿主に左右される。異種性供給源由来のプロモーターは、選択された宿主において機能的である限り使用されてもよい。

【0189】

プロモーターの選択は、ペプチドまたはタンパク質の生成の所望の効率とレベルにも左右される。*tac*などの誘導性プロモーターは、*E. coli*でのタンパク質発現レベルを劇的に上昇させるために利用されることが多い。タンパク質の過剰発現は宿主細胞に有害な場合もある。その結果、宿主細胞の成長は制限される場合がある。誘導性プロモーター系の使用により、宿主細胞を許容可能な密度まで培養してから遺伝子発現を誘導するこ

とができ、これによってさらに多くの産出が容易になる。

【0190】

様々なシグナル配列が本発明に従って使用されてもよい。生物学的に活性なポリペプチドコード配列と相同であるシグナル配列を使用してもよい。あるいは、発現宿主での効率的な分泌と処理のために選択または設計されたシグナル配列も使用してもよい。シグナル配列は、シグナルペプチダーゼ切断部位をコードする配列を介してタンパク質コード配列に直接結合され、または短いヌクレオチド架橋により結合されてもよい。

【0191】

発現構築物は、既知の組み換えDNA技法を利用することで組み立てることができる。制限酵素の消化とライゲーションは、DNAの2つの断片を結合するために用いられる基本工程である。選択された断片の結合を容易にするために、ポリリンカーとアダプターを利用してもよい。前記発現構築物は通常、E. coliの制限、ライゲーション、および形質転換を複数回用いて段階的に組み立てることができる。発現構築物の構築に適した多数のクローニングベクターは当該技術分野で公知である (λ ZAP and pBLUE SCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, Calif., pET, Novagen Inc., Madison, Wis.)。

【0192】

前記発現構築物は、線形または円形いずれかのクローニングベクター構築物として宿主に形質転換されるか、またはクローニングベクターから除去された後、そのまま使用されるか、もしくは送達ベクターに導入されてもよい。この送達ベクターは、選択された宿主細胞型での発現構築物の導入と維持を容易にする。前記発現構築物は、多数の既知の遺伝子導入系のうちいずれか（例えば、自然能力、化学的に媒介された形質転換、プロトプラスト形質転換、電気穿孔、生物学的形質転換、トランスフェクション、または抱合）により宿主細胞に導入される。選択される遺伝子導入系は、使用される宿主細胞およびベクター系に左右される。

【0193】

本発明はさらに、対象の融合タンパク質を単離するための製造プロセスを提供する。このプロセスでは、調節配列に動作可能に結合された対象のタンパク質をコードする核酸に導入されている宿主細胞（例えば酵母、真菌、昆虫、細菌、または動物細胞）は、対象の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の転写を刺激するために培養培地にて生産規模で成長させられる。その後、対象の融合タンパク質は、採取された宿主細胞から、または培養培地から単離される。標準のタンパク質精製技法を使用して、培地または採取された細胞から対象のタンパク質を単離することができる。特に、ローラーボトル、スピナーフラスコ、組織培養プレート、バイオリアクター、または発酵槽を含む様々な実施形態から所望の融合タンパク質を大規模（すなわち、少なくともミリグラムの量）で発現かつ精製するための精製技法を、使用することができる。

【0194】

発現されたタンパク融合複合体は、既知の方法により単離かつ精製することができる。通常、培養培地は遠心分離または濾過され、次いで上清は、アフィニティーまたはイムノアフィニティークロマトグラフィー、例えばProtein-AもしくはProtein-Gアフィニティークロマトグラフィー、あるいは、結合したTCRまたはその免疫グロブリン領域などの発現された融合複合体に結合するモノクローナル抗体の使用を含むイムノアフィニティープロトコルにより精製される。本発明の融合タンパク質は、既知の技術を適切に組み合わせたものにより分離かつ精製することができる。これらの方法として、例えば、塩沈殿および溶媒沈殿などの溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの分子量差を利用する方法、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどの電荷差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特定の親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法、Ni-NTAなどの金属親和性カラムが挙げられる（これら方法に関する開示については、Samb

rook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed. (1989)、および Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1989) を参照)。

【0195】

本発明の融合タンパク質はほぼ純粋であることが好ましい。すなわち、前記融合タンパク質は、通常それに付随する細胞置換基から単離され、それにより融合タンパク質は、好ましくは少なくとも80%または90%~95%の均一性(w/w)で存在する。少なくとも98~99%の均一性(w/w)を持つ融合タンパク質が、多くの製薬、臨床、および研究の用途に最も好ましい。一旦実質的に精製されると、前記融合タンパク質は、治療用途のために汚染物質がほとんどない状態にされねばならない。一旦実質的な純度にまで部分的に精製されると、可溶性融合タンパク質は、治療に、または本明細書に開示されるインビトロかインビボのアッセイの実行に使用することができる。クロマトグラフィーおよびゲル電気泳動などの様々な標準技法により実質的な純度を求めることができる。

【0196】

本発明はまた、本発明に係る治療上有効な量の組成物、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、遺伝子構築物、ベクター、または宿主細胞と、薬学的に許容可能な賦形剤またはビヒクルを含む医薬調製物を提供する。

【0197】

本発明での使用に好ましい賦形剤は、糖類、デンプン、セルロース、ガム、およびタンパク質を含む。好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、固体(例えば、錠剤、カプセル剤、トロチ剤、顆粒剤、坐剤、再構成により液体形態を呈することが可能な結晶性か非晶質性の滅菌固体など)、液体(例えば溶液、懸濁液、乳剤、エリキシル剤、ローション剤、軟膏(unguents)など)、または半固体(ゲル、軟膏、クリームなど)として投与するための医薬形態で製剤される。本発明の医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、脳室内、経皮、腹腔内、鼻腔内、腸管内、局所、舌下、または直腸経路を含むがこれらに限定されない任意の経路により投与することができる。活性原理の投与の異なる形態、使用される賦形剤、およびその製造手順についての改訂は、Remington's Pharmaceutical Sciences (A. R. Gennaro, Ed.), 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000)に見出すことができる。薬学的に許容可能なビヒクルの例は当該技術分野で既知であり、リン酸塩で緩衝された生理食塩水、水、油/水乳剤などの乳剤、異なるタイプの加湿剤、滅菌溶液などが挙げられる。前記ビヒクルを含む組成物は、当該技術分野で既知の従来手順により製剤することができる。

【0198】

核酸(本発明のポリヌクレオチド、ベクター、または遺伝子構築物)を含む本発明の医薬組成物の場合、本発明は、前記核酸を投与するために特別に調製された医薬組成物を企図する。この医薬組成物は、裸の形態、要するに、生物のヌクレアーゼによる分解から核酸を保護する化合物がない状態で前記核酸を含むことができる。このことには、トランスフェクションに使用される試薬に関連する毒性を除去するという利点が伴う。裸の化合物に適切な投与経路として、血管内、腫瘍内、頭蓋内、腹腔内、脾内、筋肉内、網膜下、皮下、粘液、局所、および経口経路が挙げられる(Templeton, 2002 DNA Cell Biol., 21: 857-867)。あるいは前記核酸は、リボソームの形成部分として投与され、コレステロールに抱合され、または、HIV-1のTATタンパク質由来のTatペプチド、D. melanogasterのアンテナペディアンタンパク質のホメオドメインの第3ヘリックス、単純ヘルペスウイルスのVP22タンパク質、アルギニンのオリゴマー、およびWO07069090記載されるものなどのペプチドといった、細胞膜を介した転座の促進を可能にする化合物に抱合されてもよい(Lindgren, et al. 2000 Trends Pharmacol. Sci 21: 99-103; Schwarze, et al. 2000 Trends Pharma

col. Sci. 21:45-48; Lundberg, et al. 2003 Mol. Therapy 8:143-150、および Snyder, et al. 2004 Pharm. Res. 21:389-393)。あるいは、プラスミドベクターまたはウイルスベクター、好ましくは、アデノウイルスに基づくベクター、アデノ関連ウイルスもしくはレトロウイルスにおけるベクター、例えばマウス白血病ウイルス (MLV) もしくはレンチウイルス (HIV、FIV、EIAV) に基づくウイルスにおけるベクターの一部を形成するポリヌクレオチドを投与することができる。

【0199】

本発明の組成物は、体重1kg当たり10mg未満、好ましくは体重1kg当たり5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、または0.00001mg未満、および200nmol未満の薬剤、すなわち体重1kg当たり約 4.4×10^{16} コピー、または体重1kg当たり1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、または0.075nmolの投与量で投与することができる。単一用量は、注射、吸入、または局所投与により投与することができる。本発明の二官能性ポリヌクレオチドおよび組成物は、器官に直接投与することができる。この器官内では、標的mRNAが発現され、その場合、投与量は、器官当たり0.00001mg~3mg、好ましくは器官当たり0.0001~0.001mg、器官当たり約0.03~3.0mg、器官当たり約0.1~3.0mg、または器官当たり0.3~3.0mgで投与されることになる。

【0200】

この投与量は、処置される状態の重症度とそれに対する反応に左右されるものであり、数日から数か月まで、または状態の寛解を確認するまで変動する場合がある。最適投与量は、患者の生体中の薬剤濃度を定期的に測定することにより決定することができる。この最適投与量は、動物モデルに対する以前のインビトロかインビボ検査により得たEC50値から決定することができる。単位投与量は、1日1回、または1日1回未満、好ましくは2、4、8、もしくは30日ごとに1回未満で投与することができる。あるいは、最初に投与を1回行い、その後、通常は最初の投与量よりも少ない量で1回以上の維持投与量を投与することができる。この維持管理体制は、1日に体重1kg当たり0.01μg~1.4mg、例えば1日に体重1kg当たり1、0.1、0.01、0.001、または0.00001mg/kgの投与量で患者を処置することを必要とする場合がある。維持投与量は、5日、10日、または30日ごとに多くとも1回投与されるのが好ましい。この処置は、患者が受ける変化の種類、その重症度、および患者の状態に応じて変化する時間にわたって継続しなければならない。処置後、疾患が処置にตอบสนองしない場合に投与量を増やすべきかどうか、または疾患あるいは望ましくない二次作用の改善を観察した場合に投与量を減らすべきかどうかを決定するために、患者の発展 (evolution) を監視しなければならない。

【0201】

特定の状況に応じて、1回の投与、または2回以上の投与で一日投与量を投与することができる。反復投与または頻繁な投与が必要な場合、ポンプ、長期的カテーテル (静脈内、腹腔内、胸腔内、もしくは嚢内)、またはリザーバーなどの投与デバイスを移植することが推奨される。

【0202】

本発明の組成物は、静脈内、経口、経鼻、非経口、局所、経皮、直腸などを含むがこれらに限定されない当業者に既知の方法に従って投与される。

【0203】

以下の実施例は、本発明の実施を例示するものであり、あらゆる方法でそれを制限するものではないことを意味する。

【実施例】

【0204】

下記の実施例は、開示された発明に従って調製された化合物のある例示的な実施形態を説明する。以下の一般的な方法、および、当業者に既知の他の方法は、本明細書に開示される化合物およびそのサブクラスならびに種に適用可能であることが理解されよう。

【0205】

実施例1. 7つのIL12-Fcプロドラッグの設計

IL12には、2つのサブユニットであるp35およびp40がある。ヒトIgG1のFcセグメント、ヒトFc-knob、およびヒトFc-holeを使用して、対応するプロドラッグを構築した。プロドラッグ設計は、直列または並列にIL12の2つのサブユニットを結合する。特定の形態は以下の通りである：

【0206】

図1は、ホモ二量体IL12-Fc (Homo IL12) の構造を示す概要であり、2つのサブユニットが直列に結合され、二量体の分子量は175のKD (MW=175KD) である。

【0207】

図2は、ヘテロ二量体IL12-Fc (Het IL12) の構造を示す概略図であり、2つのサブユニットが並列に結合される。二量体の分子量は115KD (MW=115KD) であり、P35シグナルペプチドおよびP40シグナルペプチドを、P35ならびにP40のサブユニットのN末端にそれぞれ加えた。

【0208】

プロドラッグの形態は、IL12がその受容体のいずれかに結合することを阻止するか、または両方の受容体 (IL12Rβ1とIL12Rβ2) に同時に結合することを阻止する。IL12Rβ1のN末端で2つのフィブロネクチン型-I I Iドメイン (I+I I) で構成され、Rβ1と呼ばれるIL12Rβ1の細胞外ドメインの一部は、P40のN末端に融合される。Rβ1は、P40との内因性IL12Rβ1相互作用を競合的に防ぐデコイとして機能する。P35は、Rβ2と呼ばれる、IL12Rβ2のN末端で2つのフィブロネクチン型-I I Iドメイン (I+I I) を使用して遮断され、それにより、内因性IL12Rβ2とのP35相互作用を防ぐ。

【0209】

ホモ二量体-I L 1 2 のためのプロドラッグ構築物は図3に示される。

【0210】

図3は、ホモ二量体IL12Rβ1 (Homo-R1と呼ばれる) のプロドラッグ構造の概略図であり、二量体MW=232KDである。

【0211】

図4は、ホモ二量体IL12Rβ2 (Homo-R2と呼ばれる) のプロドラッグ構造の概略図であり、二量体MW=250KDである。

【0212】

図5は、ヘテロ二量体IL12Rβ1/Rβ2 (Het-R1/R2と呼ばれる) のプロドラッグ構造の概略図であり、二量体MW=182KDである。

【0213】

図6は、ヘテロ二量体IL12Rβ1 (Het-R1と呼ばれる) のプロドラッグ構造の概略図であり、二量体MW=144KDであり、この二量体中のP35-Fc-hole単量体の融合セグメントP35のC末端に、P35シグナルペプチドを加えた。

【0214】

図7は、ヘテロ二量体IL12Rβ2 (Het-R2と呼ばれる) のプロドラッグ構造の概略図であり、二量体MW=153KDであり、この二量体中のP40-Fc-knob単量体の融合セグメントP40のC末端に、P40シグナルペプチドを加えた。

【0215】

実施例2. IL12プロドラッグの構造、精製、および産生

実施例1に記載される7つのタンパク質を発現させ、産生した。初めに、発現ベクターpEE12.4上に構築された各融合タンパク質の組換えDNAを、293FまたはCH

10

20

30

40

50

O細胞にトランスフェクトした。宿主細胞を培養し、細胞上清を集めた。その後、プロテインA／Gの親和性クロマトグラフィーカラムによって、上清からタンパク質を精製した。

【0216】

ホモ二量体タンパク質の発現のために、構築された発現ベクタープラスミドを293またはCHO細胞宿主に移した。細胞のプラスミド発現産物は、自発的にホモ二量体タンパク質を形成することができる。ヘテロ二量体タンパク質の発現のためには、同じモル比を有する2つの発現ベクタープラスミドでトランスフェクトすることが必要であり、細胞中で発現された単量体も、ヘテロ二量体を自発的に形成することができる。

【0217】

SDS-PAGE電気泳動の結果を図8Aと図8Bに示す。

【0218】

ベクターの構築、宿主細胞のトランスフェクション、および発現の誘導に使用された手順を、以下に説明する。

【0219】

様々な融合タンパク質の発現プラスミドをPEE12.4のベクター上で構築し、293FまたはCHO細胞にトランスフェクトした。培養液上清中で発現されたタンパク質を、プロテインA親和性クロマトグラフィーカラムによって精製した。

【0220】

発現ベクターを以下のように構築した：

(1) PEE12.4-HindIII-p40 (シグナル)-NruI-p35 (シグナルなし)-BsiWI-hlgG1-EcoRI

(2) PEE12.4-HindIII-P35 (シグナル)-BsiWI-Fch-EcoRI

(3) PEE12.4-HindIII-P40 (シグナル)-NruI-Fck-EcoRI

(4) PEE12.4-HindIII-IL12Rb1-BsiWI-p40 (シグナルなし)-NruI-p35 (シグナルなし)-BsiWI-hlgG1-EcoRI

(5) PEE12.4-HindIII-IL12Rb2-BsiWI-p40 (シグナルなし)-NruI-p35 (シグナルなし)-BsiWI-hlgG1-EcoRI

(6) PEE12.4-HindIII-IL12Rb1-BsiWI-p40 (シグナルなし)-NruI-Fck-EcoRI

(7) PEE12.4-HindIII-IL12Rb2-BstBI-p35 (シグナルなし)-BsiWI-Fch-EcoRI。

【0221】

HindIII、NruI、BsiWI、およびEcoRIは酵素切断部位である。

【0222】

各融合タンパク質セグメント間の結合配列は以下のとおりである：

(1) Homo IL12：P40とP35との間のリンカーL1、P35とFcとの間のリンカーL1。

(2) Het IL12：P40とFcとの間のリンカーL1、P35とFcとの間のリンカーL1。

(3) Rβ1とP40との間のリンカーL2；プロテアーゼの対応する標的配列はSGRSENI RTAである。

(4) Rβ2とP40との間のリンカーL2；対応するプロテアーゼの標的配列はSGRSENI RTAである。

(5) Rβ2とP35との間のリンカーL2；プロテアーゼの対応する標的配列はSGRSENI RTAである。

10

20

30

40

50

【0223】

トランスフェクションは安定的に、または一過性に行うことができ、一過性トランスフェクションのプロトコルは以下のとおりである：

(1) 細胞の蘇生：自由型293F細胞を、 3×10^7 細胞/mLの濃度で、CD OptiCHO（商標）培地（10%のDMSOを含有する）中で凍結保存した。液体窒素から取り出した後に、それを37°Cの水浴に迅速に溶解させ、10mLのOptiCHO（商標）培地を含有している15mLの遠心分離管に添加し、1,000rpmで5分間遠心分離機にかけた。上清を廃棄し、細胞ペレットを懸濁し、30mLのOptiCHO（商標）培地において、37°C、8%のCO₂、135rpmで培養した。4日後に、細胞を増やして培養し、増やした時の濃度は 3×10^6 細胞/mL以下であった。

10

(2) トランスフェクションの2日前に、懸濁培養のために調製された293F細胞を使用して、 $0.6 - 0.8 \times 10^6$ 細胞/mLの播種密度で、一過性トランスフェクション（200mL）を行った。

(3) 2日後に、トランスフェクトされた細胞懸濁液を計数し（ $2.5 - 3.5 \times 10^6$ 細胞/mLと予想される細胞密度）、細胞懸濁液を1,000rpmで5分間遠心分離機にかけ、上清を廃棄した。

(4) 細胞を50mLの新しい自由型293培地において再攪拌し、1,000rpmで5分間再び遠心分離機にかけ、上清を廃棄した。

(5) 293F細胞を200mLの自由型293培地で再攪拌した。

(6) 600μgのプラスミドを5mLの自由型293培地で希釈し、0.22μMフィルターを使用した濾過によって滅菌した。

20

(7) 1.8mgのPEIを、5mLの自由型293培地で希釈し、0.22μMのフィルターを使用した濾過によって滅菌した。直ちに、5mLのプラスミドおよび5mLのPEIを混合し、室温で5分間静置した。

(8) プラスミド/PEI混合物を細胞懸濁液に添加し、37°C、8%のCO₂、85rpmのインキュベーターに入れ、50μg/LのLONG（商標）R3 IGF-1の成長因子で補足した。

(9) 4時間後、200mLのEX-CELL（商標）293培地および2mMのグルタミンを添加し、速度を135rpmに調節して培養を続けた。

(10) 24時間後、細胞増殖阻害剤3.8mMのVPAを添加した。上清をトランスフェクション後4～8日の間に集めた（最適なタンパク質の品質のため、集めた時に細胞生存率が70%を超えていることを確認する）。

30

【0224】

融合タンパク質の採取、精製、および電気泳動の検証：

(1) サンプル調製：懸濁細胞培養溶液を500mLの遠心分離バレルに移し、8,000rpmで20分間遠心分離機にかけた。上清を廃棄し、0.45μMフィルターを使用して不純物を除去した。精製工程中の細菌増殖を防ぐために、0.05%のNaN3を添加した。

(2) カラムアセンブリ：適切な量のプロテインAアガロースをカラムに添加し（1mLのプロテインA当たり20mgのヒトFc融合タンパク質）、20%のエタノール溶液で、室温で約10分間インキュベートした。カラムの出口を開けて、エタノール溶液を重力によりゆっくり放出した。

40

(3) 上記カラムを洗浄し、10のカラム容量の蒸留水および結合緩衝液（20mMのリン酸ナトリウム+0.15MのNaCl、pH7.0）をそれぞれ平衡化した。

(4) サンプルを、1時間当たり10のカラム容量の流量で、カラムを通して絶えずポンプで送り込んだ。

(5) カラムを結合緩衝液の10倍のカラム容量で洗浄し、流出液中にタンパク質が検出されなくなるまですすいだ。

(6) 溶出緩衝液（0.1Mのグリシン、pH2.7）を溶出に使用し、1mLを一単位として溶出液を集めた。適切な量の1MのTris（pH9.0）を添加して中和した

50

(pHを6-8に調節し、精製されたタンパク質の等電点は0.5以上であるべきである)。

(7) Zeba脱塩回転カラムあるいは濃縮回転カラムを使用して、標的タンパク質溶液を所望の緩衝液と取り替えた(タンパク質の等電点を回避するために、緩衝液のpHを調節する)。基準としてBSAを使用して、タンパク濃度を、SDS-PAGE電気泳動(1つのサンプル当たり2.5 µgのタンパク質負荷)およびNanoDrop2000によって決定した。

【0225】

溶出後、カラムを20のカラム容量の蒸留水で連続的に洗浄し、その後、そのカラムを10のカラム容量の20%のエタノールで洗浄した。最後に、エタノール溶液をゲル培地に浸し(immersed)、4°Cで保存した。

【0226】

実施例3. 融合タンパク質のインビボの抗腫瘍活性

IL12-Fcの全身注射がMC38腫瘍を完全に排除し、Het IL12はHomo IL12よりも有力である。

IL12-Fcが、全身投与の間に腫瘍を効果的に除去することができるか否かを決定するために、および、IL12-Fcの両方の形態の治療効果を比較するために、MC38マウスモデルをマウスに使用し、コホートを全身投与によって様々な投与で処置した。試験の結果を図9に示す。

【0227】

図9のA: 0日目に、WT C57BL/6マウス(n=5/群)に、 5×10^5 のMC38細胞を皮下接種した。13、16、および20日目に、PBS、0.5 µg、1 µg、5 µg、10 µgのHomo IL12の腹腔内注入によって、癌を有するマウスの腫瘍体積を記録した。

【0228】

図9のB: 0日目に、WT C57BL/6マウス(n=5/群)に、 5×10^5 のMC38細胞を皮下接種した。13、16、および20日目に、PBS、0.5 µg、1 µg、5 µg、10 µgのHomo IL12の腹腔内注入によって、癌を有するマウスの腫瘍体積を記録した。

【0229】

これらの結果は、IL12-Fcが腫瘍を除去するのに効果的であり、Het IL12がHomo IL12よりも有力であることを示す。IL12-Fcの全身的な使用は深刻な副作用を引き起こし、Het IL12はHomo IL12よりも毒性がある。

【0230】

IL12受容体がT、B、およびNK細胞中に広く存在するため、IL12の使用には、しばしば強力な毒性の副作用が伴う。臨床的に、患者は、主として、様々な血液疾患および肝臓毒性によって特徴付けられる。マウス血清中の様々な炎症性サイトカインを、IL12-Fcによって引き起こされた毒性の主要な指標として実験的に測定した。

【0231】

0日目に、 5×10^5 のMC38細胞をWT C57BL/6マウス(n=5/群)に皮下接種した; 13、16、および20日目にPBS、5 µgのHomo IL12またはHet IL12の腹腔内注入を行った。20日目の投与の6時間後、血液を眼の血管から集めて、血清中の炎症性因子IL12p70、IFN-γ、TNF、MCP-1、IL-10、およびIL-6のレベルを検出した。

【0232】

その結果、図10に示されるように、Homo IL12およびHet IL12の両方は、強力な細胞毒性を引き起こし、Het IL12はHomo IL12よりも細胞毒性があった。Het IL12受容体プロドラッグは、MC38腫瘍を効果的に除去する。

【0233】

腫瘍微小環境中の I L 1 2 のデコイの力を弱めるために、I L 1 2 プロドラッグを、特定のタンパク質分解酵素に感受性のある基質配列を使用して、I L 1 2 デコイ受容体を結合することによって構築した。基質を切断することができるタンパク質分解酵素は、正常組織と比較して、特定の腫瘍型でより高度に発現され、したがって、腫瘍部位で活性な I L 1 2 の局在化が増大する一方、I L 1 2 の全身毒性は減少する。インビボでの実験では、5 μ g / マウス未満の量が使用される場合、H e t I L 1 2 は、H o m o I L 1 2 と比べて M C 3 8 腫瘍に対してより強力な抗腫瘍効果をもたらし、より毒性でもあった。インビボでの I L 1 2 治療の毒性を減少させる手段としてのプロドラッグの概念を試験するために、H e t I L 1 2 (実施例 1 に記載される) を、いくつかの構成 (例えば、H e t - R 1、H e t - R 2、H e t - R 1 / R 2) 中のデコイ I L 1 2 受容体に結合させた。デコイ I L 1 2 受容体 (例えば、H o m o - R 1、H o m o - R 2) に結合された H o m o I L 1 2 も試験した。

10

【0234】

図 1 1 の A : 0 日目に 5 x 1 0 ⁵ の M C 3 8 細胞を W T C 5 7 B L / 6 マウス (n = 5 / 群) の皮下に接種し、および 1 0、1 3、ならびに 1 6 日目に、5 μ g の H e t I L 1 2、H e t - R 1、H e t - R 2、または H e t - R 1 / R 2 を、W T C 5 7 B L / 6 マウス (n = 5 / 群) の皮下に接種し、対照群を P B S で処置した。

【0235】

図 1 1 の B : 0 日目に、5 x 1 0 ⁵ の M C 3 8 細胞を、W T C 5 7 B L / 6 マウス (n = 5 / 群) の皮下に接種した。1 0、1 3、および 1 6 日目に、2 . 5 μ g の H e t I L 1 2、H e t - R 1、H e t - R 2、あるいは H e t - R 1 / R 2 を腹腔内注入し、対照群を P B S で処置した。

20

【0236】

結果は、H e t I L 1 2 のプロドラッグの 3 つの形態が腫瘍を除去するのに効果的であったことを示した。5 μ g / マウスの用量では、H e t I L 1 2 プロドラッグの 3 つの形態は、H o m o I L 1 2 と比べて、M C 3 8 に対してより良い抗腫瘍効果があり、上記用量を 2 . 5 μ g / マウスに減らした場合でも、H e t I L 1 2 プロドラッグ (H e t R 1、H e t R 2、あるいは H e t R 1 / R 2) は、依然として有効に腫瘍を制御することができる。I L 1 2 受容体に結合された H e t I L 1 2 プロドラッグは、全身投与された場合、より少ない副作用を有していた。

30

【0237】

マウスの体重変化を、異なる薬物 / プロドラッグの全身投与後に記録し、および、血清中の炎症性サイトカインの発現レベルをマウスの眼の血管から採取した。

【0238】

図 1 2 A : 0 日目に 5 x 1 0 ⁵ の M C 3 8 細胞を、および 1 0、1 3、ならびに 1 6 日目に 5 μ g の H e t I L 1 2、H e t - R 1、H e t - R 2、または H e t - R 1 / R 2 を、W T C 5 7 B L / 6 マウス (n = 5 / 群) の皮下に接種し、対照群を P B S で処置した。マウスの重量を処置中に測定した。

【0239】

図 1 2 B - G : 処置中に、マウスの眼の血管から血液を得た。炎症性サイトカインである I L 1 2 p 7 0、T N F、I F N - γ 、M C P - 1、I L - 1 0、および I L - 6 の血清レベルを測定した。

40

【0240】

その結果は、I L 1 2 受容体プロドラッグ (H e t - R 1、H e t - R 2) に結合された H e t I L 1 2 が、2 . 5 μ g / マウスの用量で I L 1 2 受容体に結合されていない H e t I L 1 2 と比べて、より少ない毒性の副作用を有することを示し、H e t - R 2 は、他のタイプのプロドラッグより毒性が少なかった。

【0241】

まとめると、マウス M C 3 8 モデルでは、I L 1 2 受容体に結合された I L 1 2 - F c のプロドラッグは、抗腫瘍効果を維持し、I L 1 2 - F c の安全性を高める。I L 1 2 受

50

容体に結合された低用量（2.5 μg ）のH e t I L 1 2 プロドラッグは、130-150 mm^3 の腫瘍体積を有するM C 3 8 腫瘍を完全に除去し、腫瘍は再発しなかった。I L 1 2 受容体に結合されなかったI L 1 2 - F c の同じ用量と比較して、前者（I L 1 2 受容体に結合したH e t I L 1 2 - F c プロドラッグ）は、全身注射の間により少ない毒性を生成し、このことは、体重減少の有意な低減、および血液中のより低い炎症性サイトカインレベルに反映された。H e t - R 2 は、とりわけ、最も安全な構築物であった。

【0242】

本明細書に開示される様々なI L 1 5 融合タンパク質およびプロドラッグの類似したヒトバージョンも、インビトロで産生し試験した。ヒトタンパク質の産生は、上に記載された同じクローニング、トランスフェクション、および精製プロトコルに従った。

10

【0243】

M M P 1 4 を用いて、あるいはM M P 1 4 なしで、37 ° C で24時間インキュベートされた、精製されたヒト融合タンパク質のS D S - P A G E 電気泳動の結果を図13に示す。

【0244】

ヒトH e t - R 1 およびH e t - R 1 / R 2 の機能を、H E K - B l u e （商標）I L 1 2 レポーター細胞株アッセイ（I n v i v o g e n ）を使用して測定した。H E K - B l u e （商標）I L - 1 2 細胞を、S T A T 4 誘導性S E A P レポーター遺伝子を発現させることによって、生理活性のヒトI L - 1 2 を検出するように設計した。H E K - B l u e （商標）I L - 1 2 細胞の表面上でI L - 1 2 がI L - 1 2 R に結合することにより、シグナル伝達カスケードを引き起こし、S E A P のその後の産生を伴うS T A T - 4 の活性化をもたらす。Q U A N T I - B l u e （商標）を使用して、H E K - B l u e （商標）I L - 1 2 細胞活性化を測定し、細胞上清中のS E A P を検出した。

20

【0245】

以下のH E K - B l u e （商標）I L - 1 2 細胞レポーター細胞株アッセイを使用した：

（1）H E K - B l u e （商標）I L - 1 2 細胞をP B S において優しくすすぎ、あらかじめ温められた新しい試験液（D M E M 、 4 . 5 g / l のグルコース、2 m M のL - グルタミン、10 % （v / v ）の熱失活したP B S （30分、56 ° C 、 ~ 1 x 10⁶ 細胞 / m l ））において懸濁した。

30

（2）サンプルを平底96ウェルプレート中で段階希釈し、1つのウェル当たり50 μl の細胞懸濁液（~ 50,000細胞）を有するC O₂ インキュベーターにおいて、37 ° C で20-24時間インキュベートした。

（3）100 μL の再攪拌されたQ U A N T I - B l u e （商標）溶液を有する平底96ウェルプレートの1つのウェル当たり20 μL の誘導されたH E K - B l u e （商標）I L - 1 2 細胞上清を、37 ° C のインキュベーターにおいて15分~1時間インキュベートする。

（4）650 nm で分光光度計を使用して、S E A P レベルを決定する。

【0246】

結果：図14のAは、M M P 1 4 消化後のH e t - R 1 のプロドラッグのI L 1 2 活性が、H e t I L 1 2 に匹敵するか、またはH e t I L 1 2 よりも大きいことを示す。これに対して、M M P 1 4 消化がないH e t - R 1 はそれほど活性ではなく、このことは、プロドラッグの遮断メカニズムが予想通りに機能することを示している。図14のBは、M M P 1 4 消化後のH e t - R 1 / R 2 プロドラッグの活性化が、H e t I L 1 2 および組換えI L 1 2 に匹敵することを示す。これに対して、M M P 1 4 消化がないH e t - R 1 / R 2 はそれほど活性ではなく、このことは、プロドラッグ遮断メカニズムが予想通りに機能することを示している。

40

< S E Q リスト >

50

SEQ ID No. 1 : マウスP40サブユニット (シグナルペプチドなし)

MWELEKDVYV VEVDWTPDAP GETVNLTCDT PEEDDIT
WTS DQRHGVIGSG KTLTITVKEF
LDAGQYTCHK GGETLSHSHL LLHKKENG I W STEILKN
FKN KTF LKCEAPN YSGRFTCSWL
VQRNMDLKFN IKSSSSSSPDS RAVTCGMASL SAEKVTL
DQR DYEKYSVSCQ EDVTCPTAEE
TLP IELALEA RQQNKYENYS TSFFIRDI IK PDPPKNL
QMK PLKNSQVEVS WEYPDSWSTP
HSYFSLKFFV RIQRKKEKMK ETEEGCNQKG AFLVEKT
STE VQCKGGNVCV QAQDRYYNSS
CSKWACVPCR VRS

10

SEQ ID No. 2 : ヒトP40サブユニット (シグナルペプチドなし)

WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL D
QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL
LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRC EAKNYSGRFTCW
WLTTISTDLTFSVKSSRGSSSDPQGVTCGAATLSAERV RGD
NKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLP I EVMVD AVHKLKYENY
TSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWS
TPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN
ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

20

SEQ ID No. 3 : マウスP35サブユニット (シグナルペプチドなし)

RVIPVSGPAR CLSQSRNLLK TTDDMVKTAR EKLKHYS
CTA EDIDHEDITR DQTSTLKTCL
PLELHKNE SC LATRETSSTT RGSC LPPQKT SLMMTLC
LGS IYEDLKMYQT EFQAINAALQ
NHNHQQIILD KGMLVAIDEL MQSLNHNGET LRQKPPV
GEA DPYRVKMKLC ILLHAFSTRV
VTINRVMGYL SSA

30

SEQ ID No. 4 : ヒトP35サブユニット (シグナルペプチドなし)

RNLPVATPDPGMFPC LHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY
PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET
SFITNGSCLASRKTSFMMA LCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNM L AVIDELMQALNFNSETVPQKSS
LEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

SEQ ID No. 5 : ヒトFc-hole

DKTHTCPCP APELLGGPSV FLFPKPKKDT LMIS RTP
EVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGK
EYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDI
AVE WESNGQPENN YKTTTPPV L DS
DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYT
QKS LSLSPGK

40

50

10

20

SEQ ID No. 6 : ヒトFc-knob
DKTHTCPCPCP APELLGGPSV FLFPKPKKDT LMISRTPEVT
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGK
EYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK
GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDI
AVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYT
QKS LSLSPGK

30

SEQ ID No. 7 : IgG1のヒトFc
DKTHTCPCPCP APELLGGPSV FLFPKPKPKDQ LMISRTPEVT
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGK
EYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK
GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDI
AVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVLHEA LHNHYTQ
KSL SLSPGK

40

SEQ ID No. 8 : マウスRβ1
MDMMGLAGTS KHITFLLLCQ LGASGPGDGC CVEKTSF
PEG ASGSPLGPRN LSCYRVSKTD
YECSWQYDGP EDNVSHVLWC CFVPPNHTHT GQERCRI
FSS GPDRTVQFWE QDGIPLVLSKV
NFWVESRLGN RTMKSQKISQ YLYNWTKTTP PLGHIKV
SQS HRQLRMDWNV SEEAGAEVQF
RRRMPTTNWT LGDCGPQVNS GSGVLGDIRG SMSESL
CPS ENMAQEIQIR RRRRLSSGAP
GGPWSDWSMP VCVPPPEVLP

50

SEQ ID No. 9: ヒト R β 1

MEPLVTWVVP LLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDAD
SGSASGPRDLRCYRISSDRYEC SWQYEGPTAGVSHFLRCC
LSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWAR
NQTEKSP E VTLQLYNSVKYEPPLGDIK VSKLAGQLRMEWE
TPDNQVGAEVQFRHRT P S S P W K L G D C G P Q D D D T E S C L C P L
EMNVAQEFQLRRRRLG S Q G S S W S K W S S P V C V P P E N

SEQ ID No. 10: マウス R β 2

MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQP
APV IPLGSAANIS CSLNPKQGCS
HYPSSNELIL LKFVNDV LVE NLHGKKKVHDDH TGHSSSTF
QVT NLSLGMTL FV CKLNC S N S Q K
KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISC V Q E G E NGTVACS
WNS GKVTYLKTNY TLQLSGPNNL
TCQKQCFSDN RQNCNRLDLG INLS PDLAES RFIVRVT
AIN DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQP
LNS TSWNMVNATN AKGKYDLRDL
RPFTEYEFQI SSKLHLSGGS WSNWSESLRT RTPEEEEP

10

20

SEQ ID No. 11: ヒト R β 2

MAHTFRGCSLAFMFI ITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHV
ILLGSTVNITCSLKPRQGC FHYSRRNKLILYKFDRRINFH
HGHSLSNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFV
GVAPEQPQNLS C I Q K G E Q G T V A C T W E R G R D T H L Y T E Y T L Q
LSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLD F G I N L T P E S P E S N F T A K V
TAVNSLGS S S S L P S T F T F L D I V R P L P P W D I R I K F Q K A S V S
RCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVT KAKGRHD
LLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEE
P

30

SEQ ID No. 12: リンカーセグメント L 1

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID No. 13: リンカーセグメント L 2 (MMP 1 4)

GGGGSSGARYRWLTAGGGGS

40

SEQ ID No. 14: リンカーセグメント L 2

GGGGSSGRSENI RTAGGGGS

SEQ ID No. 15: リンカーセグメント L 2 (MMP 1 4)

GGGGSSGRAMHMYTAGGGGS

SEQ ID No. 16: リンカーセグメント L 2 (MMP 1 4)

GGGGSSGAAMHMYTAGGGGS

SEQ ID No. 17: リンカーセグメント L 2 (MMP 1 4)

50

GGGGSSGAIGFLRTAGGGGS

SEQ ID No. 18: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGASENIRTAGGGGS

SEQ ID No. 19: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGRPENIRTAGGGGS

SEQ ID No. 20: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGAPENIRTAGGGGS

10

SEQ ID No. 21: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGLISHSITAGGGGS

SEQ ID No. 22: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGNLRSKLTAGGGGS

SEQ ID No. 23: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGVFSIPLTAGGGGS

20

SEQ ID No. 24: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGICKYHSLTAGGGGS

SEQ ID No. 25: リンカーセグメント L2 (MMP14)

SEQ ID No. 26: リンカーセグメント L2 (MMP14)
GGGGSSGRIGFLRTAGGGGS

SEQ ID No. 27: マウス P35 シグナルペプチド SP1
MCQSRYLFL ATLA LLNHLS LA

30

SEQ ID No. 28: ヒト P35 シグナルペプチド SP1
MCPARSL LLVATLVLLDHLS LA

SEQ ID No. 29: マウス P40 シグナルペプチド SP2
MCPQKLTISW FAIVLLVSP L MA

SEQ ID No. 30: ヒト P40 シグナルペプチド SP2
MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAI

40

SEQ ID No. 31: マウス Homo IL-12
MCPQKLTISW FAIVLLVSP L MAMWELEKDV YVVEVDW
TPD APGETVNLT C DTPEEDDITW
TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETL
SHS HLL LHK KENG I WSTEILKNF
KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WL VQRNM DLK FNIKSSS
SSP DSRVAVTCGMA SLSAEKVTL D
QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA EETLP IELAL EARQQNK
YEN YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ
MKPLKNSQVE VSW EYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRK

50

KEK MKETEEGCNQ KGAFLEKTS
 TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRS GG
 GGS GGGGSGGGGS RVIPVSGPAR
 CLSQSRNLLK TTDDMVKTAR EKLKHYSCTA EDIDHED
 ITR DQTSTLKTCL PLELHKNES C
 LATRETSSTT RGSCLP PPKT SLMMTLC LGS IYEDLKM
 YQT EFQAINAALQ NHNHQQIILD
 KGMLVAIDEL MQSLNHNGET LRQKPPVGEA DPYRVKM
 KLC ILLHAFSTRV VTINRVMGYL
 SSAGGGGSGG GSGGGGGSDK THTCPCPCPAP ELLGGPS 10
 VFL FPPKPKDQLM ISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNST
 YRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK
 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P PSRDEL T
 KNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFLYSKLTVD KSRWQQG
 NVF SCSVLHEALH NHYTQKSLSL
 SPGK

SEQ ID No. 32: ヒト Homo IL12 20
 MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPD
 APGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVK
 EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKKEDGIWSTDILKDQ
 KEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKSSR
 GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVE CQEDSACP
 AAEEESLP I EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKN
 LQLKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK
 SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS
 EWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPD PGMFPC LH
 HSQNLLRAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDHEDITKDKT 30
 STVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFM
 MALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM
 LAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL
 HAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTH T
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDQLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS
 VLHEALHNHYTQKSLSLSPGK 40

SEQ ID No. 33: マウス Het IL-12サブユニット1
 MCPQKLTISW FAIVLLV SPL MAMWELEKDV YVVEVDW
 TPD APGETVNLT CDTPEEDDITW
 TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETL
 SHS HLLLHKKENG IWSTEILKNF
 KNKTFCLKCEA PNYSGRFTCS WLVRNMDLK FNIKSSS
 SSP DSRAVTCGMA SLSAEKVTL D
 QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA EETLPIELAL EARQQNK
 YEN YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ 50

MKPLKNSQVE VSW EYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRK
 KEK MKETEEGCNQ KGAFLEKTS
 TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRS GG
 GGS GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP
 APELLGGPSV FLFPKPKKDT LMISRTPEVT C V V V D V S
 HED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKA
 LPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPCRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQP
 ENN YKTTTPPV LDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

10

SEQ ID No. 34: ヒトHet IL12サブユニット1
 MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPD
 APGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVK
 EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQ
 KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLT TISTDLTFSVKSSR
 GSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECEQEDSACP
 AAEEESLP I EVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDI IKPDPPKN
 LQLKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK
 SKREKKDRVFTDKTSATV ICRKNASISVRAQDRYYSSWS
 EWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPKPKKDTLMISRTPEVTC V V V D V SHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE
 LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

20

30

SEQ ID No. 35: マウスHet IL12サブユニット2
 MCQSRYL LFL ATLALLNLHLS LARVIPVSGP ARCLSQS
 RNL LKTTDDMVKT AREKLKHYS C
 TAEDIDHEDI TRDQTSTLKT CLPLELHKNE SCLATRE
 TSS TTRGSCLP PQ KTS LMMTLCL
 GSIYEDLKMY QTEFQA INAA LQNHNHQQII LDKGMLV
 AID ELMQSLNHNG ETLRQKPPVG
 EADPYRVKMK LCILLHAFST RVVTINRVMG YLSSAGG
 GGS GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP
 APELLGGPSV FLFPKPKKDT LMISRTPEVT C V V V D V S
 HED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKA
 LPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT
 LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQP
 ENN YKTTTPPV LDS DGSFFLVSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

40

SEQ ID No. 36: ヒトHet IL12サブユニット2
 MCPARSLLLVATLVLLDHLS LARNLPVATPDPGMFPC LHH

50

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

10

SEQ ID No. 37 : マウス Homo-R1

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

20

30

40

SEQ ID No. 38 : ヒト Homo-R1

50

MEPLVTWVVP LLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDAD
 SSGASGPRDLRCYRISSDRYEC SWQYEGPTAGVSHFLRCC
 LSSGRCCYFAAGS ATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWAR
 NQTEKSP E VTLQLYNSVKYEPPLGDIKVS KLAGQLRMEWE
 TPDNQVGA EVQFRHRT P S S P W K L G D C G P Q D D D T E S C L C P L
 EMNVAQEFQLRRRRLG S Q G S S W S K W S S P V C V P P E N G G G G S
 SGRSENI RTAGGGGSWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL
 TCDTPEEDGITWTL D Q S S E V L G S G K T L T I Q V K E F G D A G Q Y
 TCHKGGEVLSHSL L L L H K K E D G I W S T D I L K D Q K E P K N K T F
 LRCEAKNYSGRFTCWWLT T I S T D L T F S V K S S R G S S D P Q G V 10
 TCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVE C Q E D S A C P A A E E S L P I
 EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKN
 SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR
 VFTDKTSATV I C R K N A S I S V R A Q D R Y Y S S S W S E W A S V P C S
 GGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPD P G M F P C L H H S Q N L L R A
 VSNMLQKARQTLEFY P C T S E E I D H E D I T K D K T S T V E A C L P
 LELTKNESCLNSRET S F I T N G S C L A S R K T S F M M A L C L S S I
 YEDLKMYQVEFKTMNAKL L M D P K R Q I F L D Q N M L A V I D E L M
 QALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC I L L H A F R I R A V
 TIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSGDKTHTCPPCPAPE 20
 LLGGPSVFLFP PKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V L H E A L H N
 HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 39: マウスHomo-R2
 MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQP
 APV IPLGSAANIS CSLNPKQGCS 30
 HYPSSNELIL LK FVNDVLVE NLHGKKVHDH TGHSSSTF
 QVT NLSLGMTL FV CKLNC SN S Q K
 KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISC V Q E G E N G T V A C S
 WNS GKVTYLKTNY TLQLSGPNNL
 TCQKQCFS DN RQNCNRLDLG INLS P D L A E S R F I V R V T
 AIN DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
 LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQP
 LNS TSWNMVNATN AKGKYDLRDL
 RPFTEYEFQI SSKLHL S G G S W S N W S E S L R T R T P E E E P
 GGG GSSGRSENI R TAGGGGSMWE 40
 LEKDVYVVEV DWTPDAPGET VNLTCDTPEE DDITWTS
 DQR HGVIGSGKTL TITVKEFLDA
 GQYTCHKGGE T L S H S H L L L H K K E N G I W S T E I L K N F K N
 KTF LKCEAPNYSGRFTCSWLVR
 NMDLKFN I K S S S S P D S R A V T C G M A S L S A E K V T L D Q R
 DYE KYSVSCQEDV TCPTAEETLP
 IELALEARQQ NKYENYSTSF FIRDIIKPDP PKNLQMK
 PLK NSQVEVSWEY PDSWSTPHSY
 FSLKFFVRIQ RKKEKMKETE EGCNQKGAF L V E K T S T E
 VQC KGGNV CVQAQ DRYYNSSCSK 50

WACVPCRVRSGGGGSGGGGS GGGGSRVIPV SGPARCL
 SQS RNLLKTTDDM VKTAREKCLKH
 YSCTAEDIDH EDITRDQTST LKTCLEPLELH KNESCLA
 TRE TSSTTRGSC L PPQKTS LMMT
 LCLGSIYEDL KMYQTEFQAI NAALQNHNHQ QIILDKG
 MLV AIDELMQSLN HNGETLRQKP
 PVGEADPYRV KMKLCILLHA FSTRVVTINR VMGYLSS
 AGG GSGSGGGSGG GGS DKTHTCP
 PCPAPELLGG PSVFLFPKPK KDQLMISRTPEVTCVVV
 DVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVS
 NKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESN
 GQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFLYS
 KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVL HEALHNHYTQ KSLSLSP
 GK

10

SEQ ID No. 40: ヒトHomo-R2

MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHV
 ILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFH
 HGHSLSNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFV
 GVAPEQPQNLS C IQKGEQGTVA CTW ERGRDTHLYTEYTLQ
 LSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLD FGINLTPE SPESNFTAKV
 TAVNSLGSSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFKKASVS
 RCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHD
 LLDLKPFTYEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEE
 PGGGGSSSGRSENI RTAGGGGSWELKKDVYVVELDWYPDAP
 GEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
 GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQKE
 PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKSSRG S
 SDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAA
 EESLP I EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ
 LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSK
 REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
 ASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSGRNLPVATPDPGMFPC LHHS
 QNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTST
 VEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMA
 LCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LA
 VIDE LMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHA
 FRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSGDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPKPKKDQLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESN GQP
 ENNYKTTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

30

40

SEQ ID No. 41: マウスHet-R1/R2サブユニット1

MDMMGLAGTS KHITFLLLCQ LGASGPGDGC CVEKTSF
 PEG ASGSPLGPRN LSCYRVSKTD

50

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

10

20

SEQ ID No. 42: ヒトHet-R1/R2サブユニット1

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

30

40

50

SEQ ID No. 43: マウスHet-R1/R2サブユニット2

MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQP
 APV IPLGSAANIS CSLNPKQGCS
 HYPSSNELIL LKFVNDVLE NLHGKKVHDH TGHSSSTF
 QVT NLSLGMTLFLV CKLNCSSNSQK
 KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISCVEGE NGTVACS
 WNS GKVTYLKTNY TLQLSGPNNL
 TCQKQCFS DN RQNCNRDLG INLSPDLAES RFIVRV
 AIN DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
 LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQP 10
 LNS TSWNMVNATN AKGKYDLRDL
 RPFTEYEFQI SSKLHLSGGS WSNWSESLRT RTPEEEP
 GGG GSSGRSENIR TAGGGGSRVI
 PVSGPARCLS QSRNLLKTTD DMVKTAREKL KHYSCTA
 EDI DHEDITRDQT STLKTCLE
 LHKNESCLAT RETSSTTRGS CLPPQKTS LM MTLCLGS
 IYE DLKMYQTEFQ AINAALQNH
 HQQIILDKGM LVAIDELMQS LNHNGETLRQ KPPVGEA
 DPY RVKMKLCILL HAFSTRVVTI
 NRVMGYLSSA GGGGSGGGGS GGGGSDKTHT CPPCPAP 20
 ELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPR
 EEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLP
 PSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDS DGSFF LVSKLTV
 DKS RWQQGNVFS SVMHEALHNH
 YTQKSLSLSP GK

SEQ ID No. 44: ヒトHet-R1/R2サブユニット2

mahtfrgcs lafmfiitwllikaKIDACKRGDVTVKPSHV 30
 ILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFH
 HGHSLSNSQVTGLPLGTTL FVCKLACINSDEIQICGAEIFV
 GVAPEQPQNLS C IQKGEQGT VACTW ERGRDTHLYTEYTLQ
 LSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLD FGINLTPE SPESNFTAKV
 TAVNSLGSSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFKKASVS
 RCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMNVNVT KAKGRHD
 LLDLKPFTYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEE
 PGGGGSSGRSENIRTAGGGGSRNLPVATPD PGMFPC LHHS
 QNLLRAVSNMLQKARQTFEY PCTSEEIDHEDITKDKTST 40
 VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMA
 LCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM
 LAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHA
 FRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 50

SEQ ID No. 45: マウスHet-R1サブユニット1

MDMMGLAGTS KHITFLLLCQ LGASGPGDGC CVEKTSF
 PEG ASGSPLGPRN LSCYRVSKTD
 YEC SWQYDGP EDNVSHVLWC CFVPPNHTHT GQERCY
 FSS GPDRTVQFWE QDGI PVLSKV
 NFWVESRLGN RTMKSQKISQ YLYNWTKTTP PLGHIKV
 SQS HRQLRMDWNV SEEAGAEVQF
 RRRMPTTNWT LGDCGPQVNS GSGVLGDIRG SMSESC
 CPS ENMAQEIQIR RRRRLSSGAP
 GGPWSDWSMP VCVPPPEVLPG GGGSSGRSEN IRTAGGG
 GSM WELEKDVYVV EVDWTPDAPG
 ETVNLTC DTP EEDDITWTS D QRHGVIGSGK TLTITVK
 EFL DAGQYTCHKG GETLSHSHLL
 LHKKEGNIWS TEILKNFKNK TFLKCEAPNY SGRFTCS
 WLQV QRNMDLKFN KSSSSSPDSR
 AVTCGMASLS AEKVTLDQRD YEKYSVSCQE DVTCTPA
 EET LPIELALEAR QQNKYENYST
 SFFIRDIIKP DPPKNLQMKP LKNSQVEVSW EYPDSWS
 TPH SYFSLKFFVR IQRKKEKMK
 TEEGCNQKGA FLVEKTSTEV QCKGGNVCVQ AQDRYYN
 SSC SKWACVPCRVR RSGGGGSGGG
 GSGGGGSDKT HTCPCPCAPE LLGGPSVFLF PPKPKDT
 LMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLH
 QDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP CRDELTKNQV SLWCLVK
 GFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHE
 ALH NHYTQKSLSL SPGK

10

20

30

SEQ ID No. 46: ヒトHet-R1サブユニット1

MEPLVTWVPLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDAD
 SGSASGPRDLRCYRISSDRYEC SWQYEGPTAGVSHFLRCC
 LSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWAR
 NQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVS KLQGLRMEWE
 TPDNQVGA EVQFRHRTPSSPWKLGDGCPQDDDTESCLCPL
 EMNVAQEFQLRRRRRLGSQGS SWSKWSSPVCVPPENGSGGS
 SGRSEN IRTAGGGGSGWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL
 TCDTP EEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY
 TCHKGG EVLSHSLLL LHKKEGDIWSTDILKDQKEPKNKTF
 LRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV
 TCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLPI
 EVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIIKPPDKNLQLKPLKN
 SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR
 VFTDKTSATV ICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
 GGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPCPCAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL

40

50

WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

SEQ ID No. 47: マウスHet-R1サブユニット2

MCQSRYLFL ATLLNLHLS LARVIPVSGP ARCLSQS
 RNL LKTDDMVKT AREKLKHYSC
 TAEDIDHEDI TRDQTSTLKT CLPLELHKNE SCLATRE
 TSS TTRGSCLP PQ KTSLMMTLCL
 GSIYEDLKMY QTEFQAINAA LQNHNHQQII LDKGMLV 10
 AID ELMQSLNHNG ETLRQKPPVG
 EADPYRVKMK LCILLHAFST RVVTINRVMG YLSSAGG
 GGS GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT C V V V D V S
 HED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKA
 LPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT
 LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQP
 ENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK 20

SEQ ID No. 48: ヒトHet-R1サブユニット2

MCPARSLLLVATLVLLDHL SLARNLPVATPDPMFPC LHH
 SQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTS
 TVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM
 ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM L
 AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH
 AFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGGSGGGGGSDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC V V V D V 30
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 49: マウスHet-R2サブユニット1

MCPQKLTISW FAIVLLV SPL MAMWELEKDV YVVEVDW
 TPD APGETVNLT C DTPEEDDITW
 TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETL 40
 SHS HLLLHKKENG IWSTEILKNF
 KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WLVRNMDLK FNIKSSS
 SSP DSRAVTCGMA SLSAEKVTL D
 QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA EETLPIELAL EARQQNK
 YEN YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ
 MKPLKNSQVE VSWEYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRK
 KEK MKETEEGCNQ KGAFLEKTS
 TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRS GG
 GGS GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT C V V V D V S 50

HED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKA
 LPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPCRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQP
 ENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID No. 50: ヒトHet-R2サブユニット1

MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD VYVVELDWYPD 10
 APGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVK
 EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQ
 KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSR
 GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYESVECEQEDSACP
 AAEEESLP I EVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDI IKPDPPKN
 LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GK
 SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW S
 EWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSGDKTHTCPCPCPAPELLGG
 PSVFLFPKPKPKDTLMISRTP E VTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK 20
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE
 LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ ID No. 51: マウスHet-R2サブユニット2

MAQTVRECSL ALLFLFMWLL IKANIDVCKL GTVTVQP
 APV IPLGSAANIS CSLNPKQGCS
 HYPSSNELIL LKFVNDVLVE NLHGKKKVHDDH TGHSSSTF 30
 QVT NLSLGMTL FV CKLNCSSNSQK
 KPPVPVCGVE ISVGVAPEPP QNISC VQEGE NGTVACS
 WNS GKVTYLKTNY TLQLSGPNNL
 TCQKQCFSDN RQNCNRLDLG INLSPD LAES RFIVRVT
 AIN DLGNSSSLPH TFTFLDIVIP
 LPPWDIRINF LNASGSRGTL QWEDEGQVVL NQLRYQP
 LNS TSWNMVNATN AKGKYDLRDL
 RPFTEYEFQI SSKLHLSGGS WSNWSESLRT RTPEEEEP
 GGG GSSGRSENIR TAGGGGSRVI
 PVS GPARCLS QSRNLLKTTD DMVKTA REKL KHYSCTA 40
 EDI DHEDITRDQT STLKTC LPLE
 LHKNESCLAT RETSSTTRGS CLPPQKTS LM MTLCLGS
 IYE DLKMYQTEFQ AINAALQNHN
 HQQI ILDKGM LVAIDELMQS LNHNGETLRQ KPPVGEA
 DPY RVKMKLCILL HAFSTRVVTI
 NRVMGYLSSA GGGGSGGGGGS GGGGSDKTHT C PPCPAP
 ELL GGPSVFLFPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPR
 EEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLP
 PSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS 50

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

SEQ ID No. 52: ヒトHet-R2サブユニット2

MAHTFRGCSLAFMFIIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHV
ILLGSTVNIITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFH
HGHSLSNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFV
GVAPEQPQNLSICIQKGEQGTVACTWERGDRDTHLYTEYTLQ
LSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDLFGINLTPESPESNFTAKV
TAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFKQKASVS
RCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHD
LLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEE
PGGGGSSGRSENI RTAGGGGSRNLPVATPDPGMFPC LHHS
QNLLRAVSNMLQKARQTFEFYPC TSEEIDHEDITKDKTST
VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMMA
LCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMALA
VIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHA
FRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGGSGGGGGSDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPKPKKDTLMISRTP EVT C V V D V S
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ
VCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPPVLDS DGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

【0247】

出願人の開示は、図を参照して好ましい実施形態において本明細書に記載されており、同様の数字は同一または類似の要素を表す。本明細書を通じて「一実施形態（one embodiment）」「実施形態（an embodiment）」、あるいは同様の用語への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書の全体にわたる「一実施形態では（in one embodiment）」、「一実施形態では（in an embodiment）」、および、同様の用語のフレーズの出現は、必ずしもそうではないが、すべて同じ実施形態を指す場合がある。

【0248】

本出願の開示の記載される機能、構造、または特徴は、1つ以上の実施形態における任意の適切な様式で組み合わせられてもよい。本明細書の説明では、本発明の実施形態の完全な理解を提供するために、多数の特定の詳細が記載されている。しかし、当業者ならば、特定の詳細の1つ以上なしに、あるいは他の方法、構成要素、物質などを用いて、出願人の組成物および／または方法が実施され得ることを認識するだろう。他の例では、本開示の態様を不明瞭にするのを避けるために、周知の構造、物質、または操作は示されていないか、あるいは詳細に記載されていない。

【0249】

他に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術的および科学的用語は、当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものに類似する、ならびに同等である任意の方法および材料も、本開示の実施または試験において使用され得るが、好ましい方法と材料が本明細書に記載される。本明細書に詳述される方法は、開示される特定の順序に加えて、論理上可能な任意の順序で実施されてもよい。

【0250】

引用による組み込み

50

特許、特許出願、特許公報、雑誌、本、論文、ウェブコンテンツなどの他の文献への言及あるいは引用が本開示で行われる。これらの全ての文献は、あらゆる目的のために、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。参照によって本明細書に組み込まれると述べられているが、明示的に本明細書に記載される既存の定義、陳述、または他の開示材料と矛盾が生じる任意の材料あるいはその一部は、その組み込まれた材料と本開示の材料との間に矛盾が生じない範囲でのみ組み込まれる。矛盾が生じる場合、その矛盾は、本開示を好ましい開示として支持し、解決されることとなっている。

【0251】

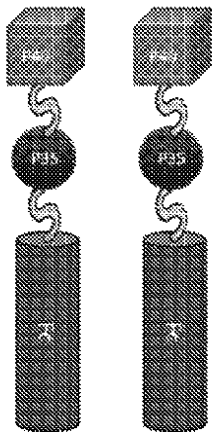
同等物

代表的な実施例は、本発明を例示するのを助けるように意図されるものであって、本発明の範囲を限定するように意図されるものではなく、そのように解釈されるべきではない。実際に、本明細書に示され記載されるものに加えて、本発明の様々な変更ならびにその多くのさらなる実施形態は、実施例および本明細書に含まれる科学的文献および特許文献への参照を含む本明細書の全内容から、当業者に明らかになるだろう。その実施例は、その様々な実施形態ならびにその同等物における、本発明の実施に適合し得る重要な付加的情報、例証、およびガイダンスを含んでいる。

10

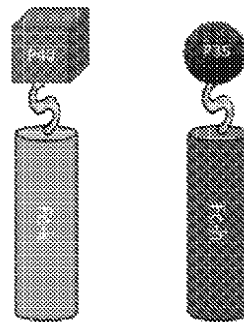
【図 1】

FIG. 1



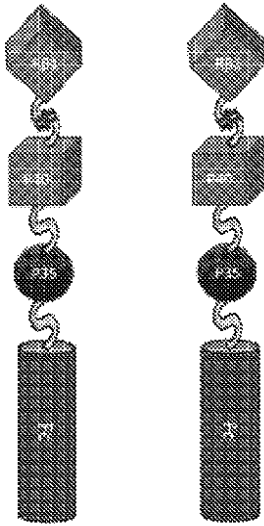
【図 2】

FIG. 2



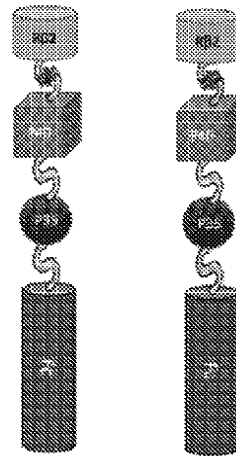
【図 3】

FIG. 3



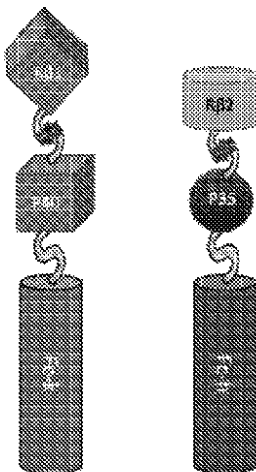
【図 4】

FIG. 4



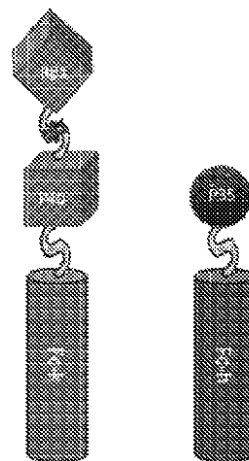
【図 5】

FIG. 5



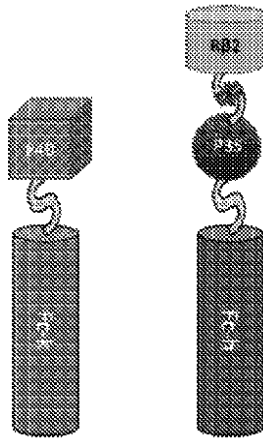
【図 6】

FIG. 6

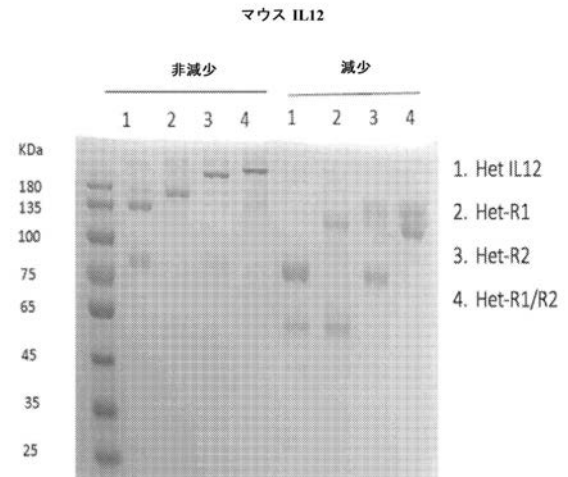


【図 7】

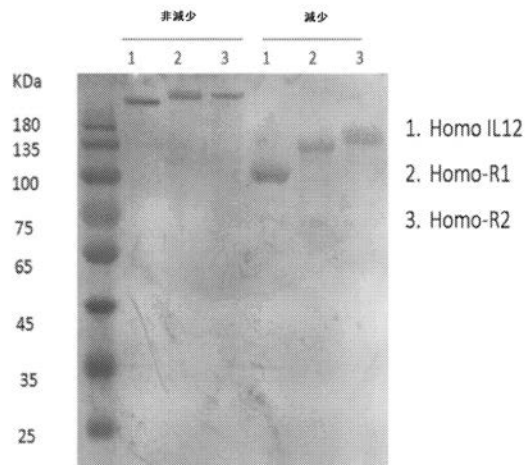
FIG. 7



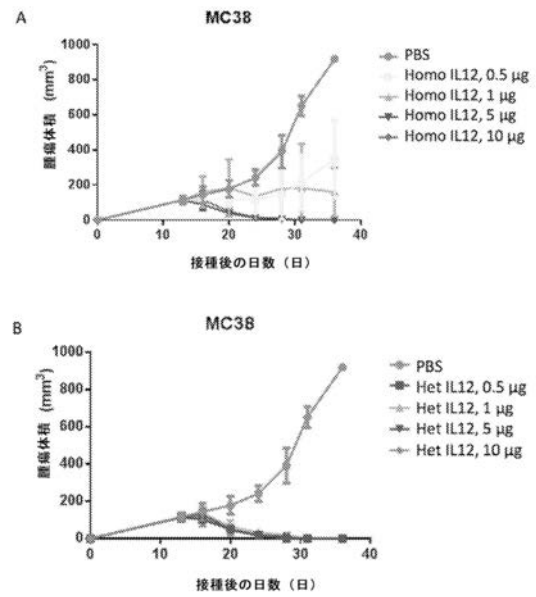
【図 8 A】



【図 8 B】

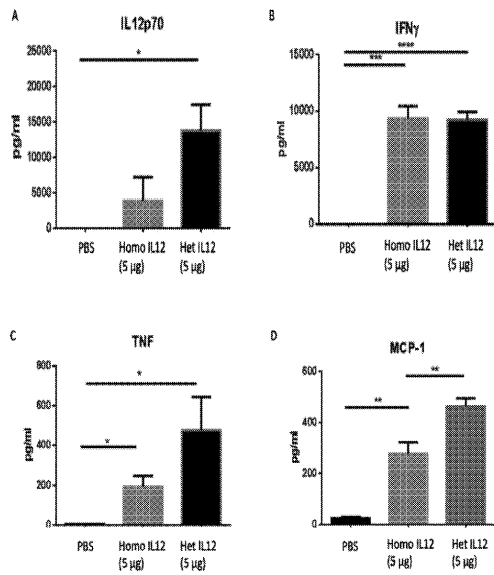


【図 9】



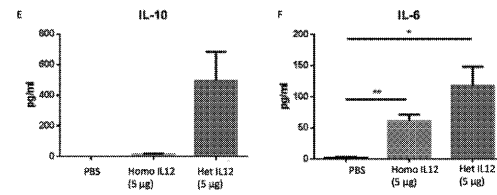
【図 10-1】

FIG. 10

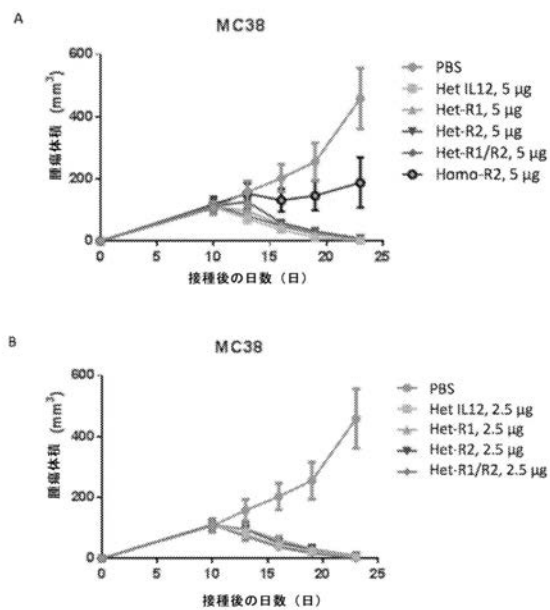


【図 10-2】

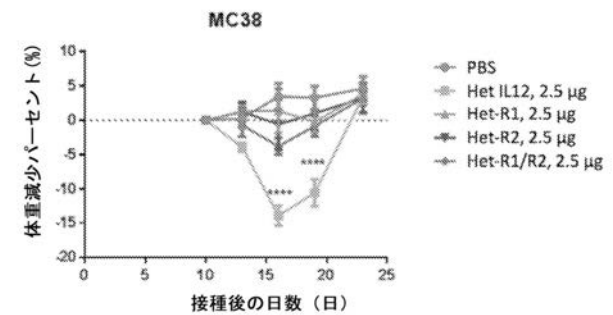
FIG. 10 (Cont'd)



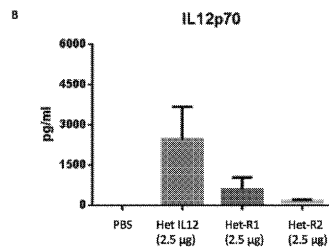
【図 11】



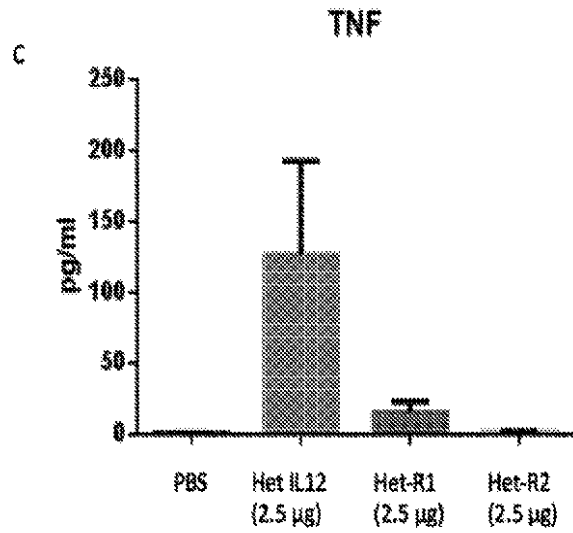
【図 12 A】



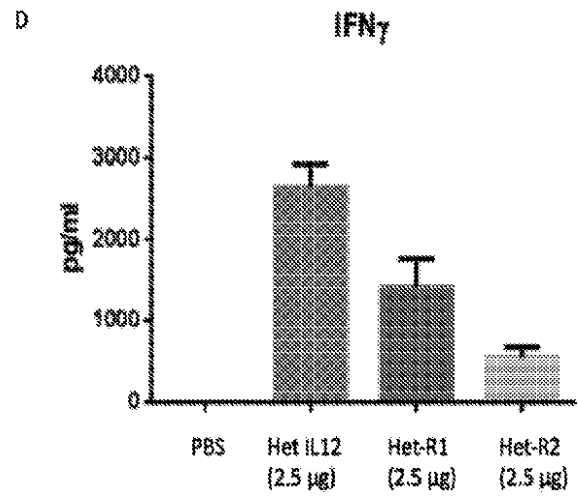
【図 12 B】



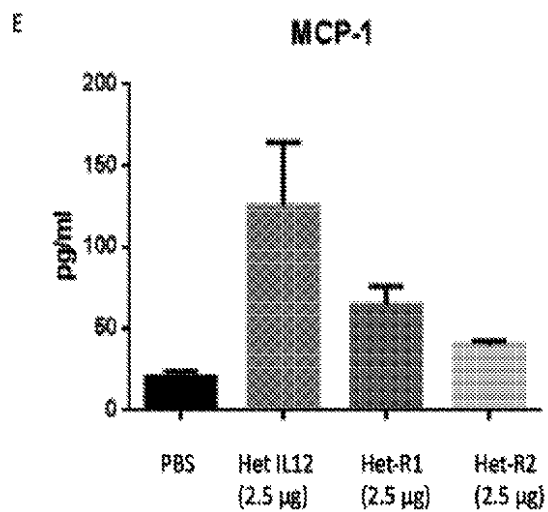
【図 1 2 C】



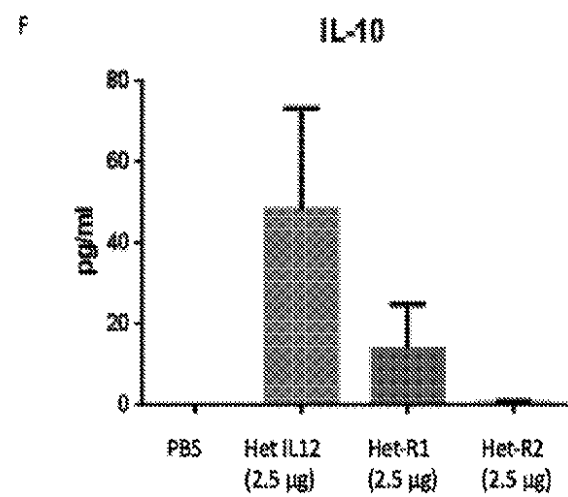
【図 1 2 D】



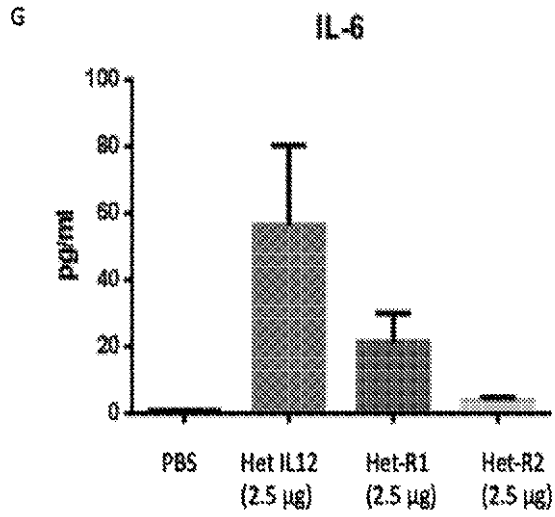
【図 1 2 E】



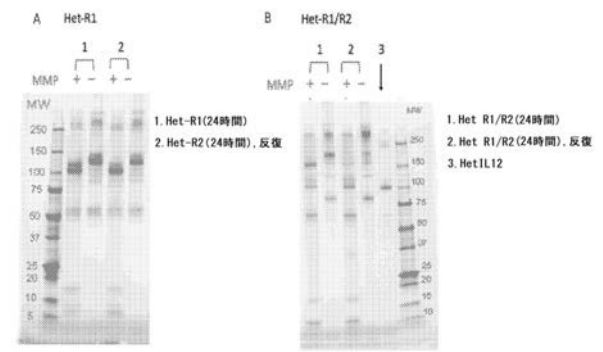
【図 1 2 F】



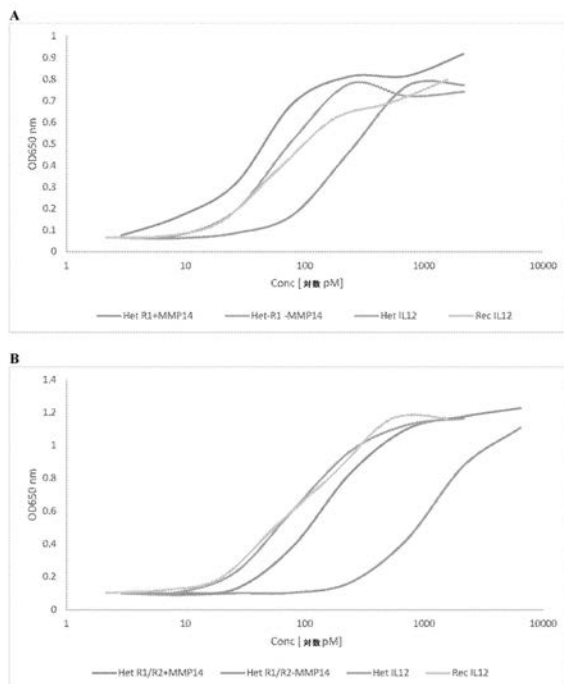
【図 1 2 G】



【図 1 3】



【図 1 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/28933

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

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

- a. ☐ forming part of the international application as filed:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

No electronic sequence listing was submitted in response to the PCT/ISA/225 issued on 26 June 2019. Therefore, the international search was not carried out on the basis of any electronic sequence listing.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/28933

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-66
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 19/28933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 14/54, C07K 16/28, C12N 5/078 (2019.01)
CPC - C07K 14/5434, C07K 16/2818, C07K 2319/00, C07K 2319/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

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

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/20062 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS, et al.) 05 June 1997 (05.06.1997) pg 2, ln 3-13, pg 3, ln 3-18, pg 3, ln 27-35, pg 8, ln 21-26, pg 12, ln 21-28, pg 18, ln 17-29, Fig. 1	1-5
A	WO 2018/030806 A1 (UNIV AJOU IND ACADEMIC COOP FOUND) 15 February 2018 (15.02.2018) abstract, Fig. 10	1-5
A	JUNG et al, "Heterodimeric Fc-fused IL12 shows potent antitumor activity by generating memory CD8+ T cells" Oncoimmunology, 6 March 2018, Vol 7, No 7, page e1438800; abstract, Fig. 1A	1-5
A	US 2008/0311655 A1 (GILLIES et al.) 18 December 2008 (18.12.2008) abstract, Fig. 3	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

23 September 2019

Date of mailing of the international search report

16 OCT 2019

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:
Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68		
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20		
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54		

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

(72)発明者 シェ, ディユアン

中華人民共和国 チャオヤン・ディストリクト ナンバー 6 9 2 3 ダートン・ロード 1 5

Fターム(参考) 4B064 AG03 AG27 CA19 CC24 CE12 DA05
 4B065 AA91X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C076 AA95 BB11 CC27 EE41 FF67 FF70
 4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA17 CA18
 CA19 CA20 CA21 CA22 CA23 DA12 MA16 MA66 NA05 NA14
 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC752
 4C085 AA35 BB36 BB42 DD62 EE01
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA02 DA76 EA28 FA74 GA26