(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-539139
(P2024-539139A)
(43)公表日　令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*14/54*	*(2006.01)*	C07K	14/54	ZNA	4B064	
C12N	*15/24*	*(2006.01)*	C12N	15/24		4B065	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C084	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		4C085	
A61K	*38/20*	*(2006.01)*	A61K	38/20		4C087	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全155頁）　最終頁に続く

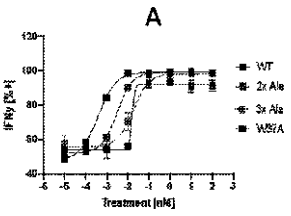
(21)出願番号　特願2024-523624(P2024-523624)
(86)(22)出願日　令和4年10月20日(2022.10.20)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月14日(2024.6.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/078465
(87)国際公開番号　WO2023/070056
(87)国際公開日　令和5年4月27日(2023.4.27)
(31)優先権主張番号　63/257,913
(32)優先日　令和3年10月20日(2021.10.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

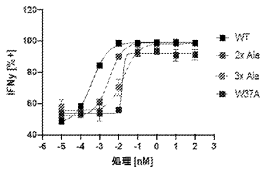
(71)出願人　522232064
シンセカイン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ９４０２５ カリフォルニア州 メンロ パーク オブライエン ドライブ １５０５ スイート ディー
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ヘテロ二量体ＦＣサイトカインおよびその使用

(57)【要約】
本開示は、ヒトp35(hP35)およびヒトP19(hP19)と会合して、改変されたhIL-12およびIL23部分アゴニストを形成する、改変されたヒトp40分子を含む部分アゴニストとしてのIL12およびIL23ムテインを提供し、ここで、IL12およびIL23ムテインの個々の成分は、操作されたFcドメインに連結されている。





【特許請求の範囲】
【請求項１】
式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、
式中、
hP35は、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%、あるいは少なくとも91%、あるいは少なくとも92%、あるいは少なくとも93%、あるいは少なくとも94%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも96%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、またはあるいは少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドであり、
hP40Mは、野生型プレヒトP40(SEQ ID NO:3)に従って番号付けられた位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトP40ムテインであり、
L1およびL2はGSAリンカーであり、aおよびbは、独立して、0(存在しない)または1(存在する)より選択され、
UH1およびUH2はそれぞれ、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、
Fc1は、Fc2とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
FC2は、Fc1とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
ここで、式1のポリペプチドおよび式2のポリペプチドが少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合によって連結されている、
前記ヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２】
hP40Mが、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%の配列同一性(例えば、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有する、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３】
hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４】
hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたP39A、D40A、E81A、F82A、K106A、D109A、K217A、K219Aからなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項3記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項５】
hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81A、F82A、K106A、およびK217Aからなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項4記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項６】

hP40Mが、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む、請求項3記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:
SEQ ID NO:3に従って番号付けられた、E81A/F82A、E81K/F82A、E81L/F82A、E81H/F82A、E81S/F82A、W37A/E81A/F82A;E81A/F82A/K106A;E81A/F82A/K106A/K219A、E81A/F82A/K106N、E81A/F82A/K106Q、E81A/F82A/K106T、E81A/F82A/K106R、E81A/F82A/K106A/K217A、81A/F82A/K106A/E108A/D115A、およびP39A/D40A/E81A/F82A。

【請求項７】

hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A(SEQ ID NO:6)を含む、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項８】

hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A/K106A(SEQ ID NO:8)を含む、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項９】

hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A/K106A/K217A(SEQ ID NO:10)を含む、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１０】

表面プラズモン共鳴によって決定された時、IL12Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対するヘテロ二量体hIL12Fcの結合親和性が、IL12Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対する野生型hIL12の結合親和性と比べて少なくとも5%、任意で少なくとも10%、任意で少なくとも20%、任意で少なくとも30%、任意で少なくとも40%、任意で少なくとも50%、任意で少なくとも60%、任意で少なくとも70%低減している、請求項1～9のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１１】

GSAリンカーが、グリシン、セリン、およびアラニンからなる群より選択されるアミノ酸で構成される4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸を有するポリペプチドである、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１２】

GSAリンカーが、構造$(GGGGS_m)_n$、$(GGGS_m)_n$、$(GGGA_m)_n$、および$(GGGGA_m)_n$、ならびにその組み合わせのグリシン-セリンポリマーであり、ここで、m、n、およびoが1、2、3、または4よりそれぞれ独立して選択される、請求項11記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１３】

GSAリンカーが、SEQ ID NO:27～79からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１４】

GSAリンカーが、SEQ ID NO:36、37および65からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１５】

Fc1およびFc2が、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4上部ヒンジドメインのUH領域より選択されるヒト免疫グロブリンの天然上部ヒンジ領域である、請求項1～14のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１６】

上部ヒンジ領域が、EPKSC(SEQ ID NO:11)およびEPKSS(SEQ ID NO:12)からなる群より選択される、請求項15記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１７】

(a)位置447のリジン残基の欠失、または(b)位置446のグリシンおよび位置447のリジン残基の両方の欠失をさらに含む、請求項1～16のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項１８】
Ｆｃ1およびＦｃ2が、Ｆｃ1とＦｃ2との間のヘテロ二量体化を促進するアミノ酸置換を含む、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項１９】
Ｆｃ1およびＦｃ2の一方がアミノ酸置換Ｓ３６４Ｈ/Ｔ３９４Ｆ、他方がアミノ酸置換Ｙ３４９Ｔ/Ｆ４０５Ａを含む、請求項18記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２０】
Ｆｃ1およびＦｃ2の一方がアミノ酸置換Ｔ３５０Ｖ/Ｌ３５１Ｙ/Ｆ４０５Ａ/Ｙ４０７Ｖを含み、他方がアミノ酸置換Ｔ３５０Ｖ/Ｔ３６６Ｌ/Ｋ３９２Ｌ/Ｔ３９４Ｗを含む、請求項18記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２１】
Ｆｃ1およびＦｃ2の一方がアミノ酸置換Ｋ３６０Ｅ/Ｋ４０９Ｗを含み、他方がアミノ酸置換Ｑ３４７Ｒ/Ｄ３９９Ｖ/Ｆ４０５Ｔを含む、請求項18記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２２】
Ｆｃ1およびＦｃ2の一方が、ノブを設けるためのアミノ酸置換を含み、Ｆｃ1およびＦｃ2の他方がホールを設けるアミノ酸置換を含む、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２３】
ノブを設けるための酸置換がＴ３６６Ｗであり、ホールを設けるための酸置換がアミノ酸置換のセットＴ３６６Ｓ/Ｌ３６８Ａ/Ｙ４０７Ｖである、請求項22記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２４】
Ｆｃ1およびＦｃ2が、以下のシステインペアの群の側鎖間の、1つまたは複数の、任意で2つ以上の、任意で3つ以上のジスルフィド結合、任意で4つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結されている、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:(a)hＰ３５のＣ９６とhＰ４０ＭのＣ１９９;(b)第1のＦｃ単量体のＣ２２６と第2のＦｃ単量体のＣ２２６の間、(c)第1のＦｃ単量体のＣ２２９と第2のＦｃ単量体のＣ２２９の間;および(d)Ｓ３５４Ｃアミノ酸置換を含む第1のＦｃドメインのＳ３５４Ｃと、Ｙ３４９Ｃアミノ酸置換を含む第2のＦｃドメインのＹ３４９Ｃの間。
【請求項２５】
Ｆｃ1およびＦｃ2が、エフェクター機能を低減するための1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２６】
Ｆｃ1およびＦｃ2の一方または両方が、Ｌ２３４Ｅ;Ｌ２３４Ａ/Ｌ２３５Ａ;Ｌ２３４Ａ/Ｌ２３５Ａ/Ｐ３２９Ａ;およびＬ２３４Ａ/Ｌ２３５Ａ/Ｐ３２９Ｇからなる群より選択される、エフェクター機能を低減するためのアミノ酸置換を含む、請求項25記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２７】
Ｆｃ1およびＦｃ2がアミノ酸置換Ｍ４２８ＬおよびＮ４３４Ｓを含む、請求項1～26のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２８】
Ｆｃ1および/またはＦｃ2が、ＮまたはＯ結合型グリコシル化部位を排除するための1つの、または複数の改変を含む、請求項1～27のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項２９】
前記改変が、Ｎ２９７ＱおよびＮ２９７Ｇからなる群より選択される、ＮまたはＯ結合型グリコシル化部位を排除するためのアミノ酸置換である、請求項28記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３０】
ＰＥＧ化されている、請求項1～29のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

【請求項３１】
PEGが、約5kDa超、約10kDa超、約15kDa超、約20kDa超、約30kDa超、約40kDa超、または約50kDa超の分子量を有する、請求項30記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３２】
PEGが、hP35Fcおよび/またはhP40MFcの上部ヒンジ領域のC220残基(EUナンバリング)の一方または両方に共有結合的に連結されている、請求項31記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３３】
式#1のポリペプチドが、SEQ ID NO:80、83、85、86、88、90、92、121、129、132、135、138、141、144、147、150、および153からなる群より選択される、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３４】
式#2のポリペプチドが、SEQ ID NO:81、82、84、87、89、91、93、および124からなる群より選択される、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３５】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:80であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:81である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３６】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:121であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:124である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３７】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:83であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:82である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３８】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:141であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:124である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項３９】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:144であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:124である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４０】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:129であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:124である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４１】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:147であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:82である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４２】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:150であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:82である、 請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４３】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:153であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:82である、 請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４４】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:135であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:124である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４５】
式#1のポリペプチドがSEQ ID NO:138であり、式#2のポリペプチドがSEQ ID NO:124である、請求項1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
【請求項４６】
式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
のポリペプチドをコードする核酸配列であって、
式中、
hP40Mは、野生型プレヒトP40(SEQ ID NO:3)に従って番号付けられた位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトP40ムテインであり、
L1はGSAリンカーであり、aは0(存在しない)または1(存在する)より選択され、
UH1は、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、
Fc1は、ヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドである、
前記核酸配列。
【請求項４７】
式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
のポリペプチドをコードする核酸配列であって、
式中、
hP35は、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%、あるいは少なくとも91%、あるいは少なくとも92%、あるいは少なくとも93%、あるいは少なくとも94%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも96%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、またはあるいは少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するポリペプチドであり、
L2はGSAリンカーであり、bは0(存在しない)または1(存在する)より選択され、
UH2は、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、
Fc2は、ヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドである、
前記核酸配列。
【請求項４８】
請求項46記載の核酸配列を含む、ベクター。
【請求項４９】
請求項47記載の核酸配列を含む、ベクター。
【請求項５０】
請求項46および47記載の核酸配列を含む、ベクター。
【請求項５１】
請求項48記載のベクターによって形質転換された組換え宿主細胞。
【請求項５２】
請求項49記載のベクターによって形質転換された組換え宿主細胞。
【請求項５３】
請求項48記載のベクターおよび請求項49記載のベクターによって形質転換された組換え宿主細胞。
【請求項５４】
哺乳動物細胞である、請求項50～53のいずれか一項記載の組換え宿主細胞。
【請求項５５】
293細胞およびCHO細胞より選択される哺乳動物細胞である、請求項54記載の組換え

宿主細胞。
【請求項５６】
有効成分として、請求項1～45のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン、請求項46もしくは47記載の核酸、請求項48、49、および50のいずれか一項記載のベクター、または請求項54記載の組換え宿主細胞を含む、薬学的に許容される製剤。
【請求項５７】
新生物疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法であって、哺乳動物を、請求項56記載の薬学的製剤と接触させる工程を含む、前記方法。
【請求項５８】
有効成分が、請求項1～45のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインである、請求項57記載の方法。
【請求項５９】
前記哺乳動物に提供されるヘテロ二量体hIL12Fcムテインの用量が、10ug/kg～500ug/kg、あるいは10ug/kg～250ug/kg、あるいは10ug/kg～80ug/kg、あるいは10ug/kg～40ug/kg、あるいは10ug/kg～30ug/kg、あるいは10ug/kg～20ug/kg、またはあるいは約15ug/kgである、請求項58記載の方法。
【請求項６０】
前記哺乳動物を、1種または複数種の補助治療剤との組み合わせで接触させる工程をさらに含む、請求項56～59のいずれか一項記載の方法。
【請求項６１】
1種または複数種の補助治療剤補助治療剤が、チェックポイントインヒビター、サイトカイン、または治療抗体からなる群より選択される、請求項60記載の方法。
【請求項６２】
チェックポイントインヒビターが、抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体、および抗LAG3抗体からなる群より選択される、請求項61記載の方法。
【請求項６３】
サイトカインが、ヒトインターロイキン-2と少なくとも90%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、あるいは少なくとも99%、またはあるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドである、請求項61記載の方法。
【請求項６４】
サイトカインが、成熟野生型ヒトIL2に従って番号付けられた位置1、2、3、4、5、6、18、22、125、および126において1つまたは複数のアミノ酸置換または欠失を含むヒトIL2ムテインである、請求項63記載の方法。
【請求項６５】
ヒトIL2ムテインが、成熟野生型ヒトIL2に従って番号付けられた位置18、22および126においてアミノ酸置換を含む、請求項64記載の方法。
【請求項６６】
ヒトIL2ムテインがアミノ酸置換L18R、Q22E、およびQ126Kを含む、請求項65記載の方法。
【請求項６７】
hIL2またはhIL2ムテインがPEG化されている、請求項63～66のいずれか一項記載の方法。
【請求項６８】
新生物疾患が、T細胞浸潤を伴う腫瘍を特徴とする、請求項57～67のいずれか一項記載の方法。
【請求項６９】
新生物疾患が、メラノーマ、腎細胞癌(RCC)、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部癌、膵臓癌、および高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI)がんからなる群より選択される、請求項57～67のいずれか一項記載の方法。

【請求項７０】
式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP19-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインであって、
式中、
hP19は、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%、あるいは少なくとも91%、あるいは少なくとも92%、あるいは少なくとも93%、あるいは少なくとも94%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも96%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、あるいは少なくとも99%、またはあるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドであり、
hP40Mは、野生型プレヒトP40(SEQ ID NO:3)に従って番号付けられた位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトP40ムテインであり、
L1およびL2はGSAリンカーであり、aおよびbは、独立して、0(存在しない)または1(存在する)より選択され、
UH1およびUH2はそれぞれ、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、
Fc1は、Fc2とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
FC2は、Fc1とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
ここで、式1のポリペプチドおよび式2のポリペプチドが少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合によって連結されている、
前記ヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７１】
hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７２】
hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81A/F82A、E81K/F82A、E81L/F82A、E81H/F82A、E81S/F82A、W37A/E81A/F82A;E81A/F82A/K106A;E81A/F82A/K106A/K219A、E81A/F82A/K106N、E81A/F82A/K106Q、E81A/F82A/K106T、E81A/F82A/K106R、E81A/F82A/K106A/K217A、81A/F82A/K106A/E108A/D115A、およびP39A/D40A/E81A/F82Aからなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７３】
hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A(SEQ ID NO:6)を含む、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７４】
hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A/K106A(SEQ ID NO:8)を含む、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７５】

hP40MがアミノSEQ酸置換のセットE81A/F82A/K106A/K217A(SEQ ID NO:10)を含む、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７６】
表面プラズモン共鳴によって決定された時、IL23Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対するヘテロ二量体hIL23Fcの結合親和性が、IL23Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対する野生型hIL23の結合親和性と比べて少なくとも5%、任意で少なくとも10%、任意で少なくとも20%、任意で少なくとも30%、任意で少なくとも40%、任意で少なくとも50%、任意で少なくとも60%、任意で少なくとも70%低減している、請求項70～75のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７７】
GSAリンカーが、
SEQ ID NO:27～79からなる群より選択される、グリシン、セリン、およびアラニンからなる群より選択されるアミノ酸で構成される4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸を有するポリペプチド
である、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７８】
Fc1およびFc2が、Fc1とFc2との間のヘテロ二量体化を促進するアミノ酸置換を含む、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項７９】
Fc1およびFc2が、以下のシステインペアの群の側鎖間の、1つまたは複数の、任意で2つ以上の、任意で3つ以上のジスルフィド結合、任意で4つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結されている、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン:(a)hP19のC96とhP40MのC199;(b)第1のFc単量体のC226と第2のFc単量体のC226の間、(c)第1のFc単量体のC229と第2のFc単量体のC229の間;および(d)S354Cアミノ酸置換を含む第1のFcドメインの S354Cと、Y349Cアミノ酸置換を含む第2のFcドメインのY349Cの間。
【請求項８０】
Fc1およびFc2が、エフェクター機能を低減するための1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項８１】
Fc1およびFc2がアミノ酸置換M428LおよびN434Sを含む、請求項70～81のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項８２】
Fc1および/またはFc2が、NまたはO結合型グリコシル化部位を排除するための1つの、または複数の改変を含む、請求項70～81のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項８３】
PEG化されている、請求項70～81のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
【請求項８４】
請求項70～82のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテインの1つまたは複数のFcサブユニットをコードする、核酸配列。
【請求項８５】
請求項84記載の核酸配列を含む、ベクター。
【請求項８６】
請求項85記載のベクターによって形質転換された、宿主細胞。
【請求項８７】
有効成分として、請求項70～83記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン、請求項84記載の核酸、請求項85記載のベクター、または請求項86記載の宿主細胞を含む、薬学的製

剤。
【請求項８８】
炎症性疾患または自己免疫疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法であって、哺乳動物を、請求項87記載の薬学的製剤と接触させる工程を含む、前記方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連特許出願の相互参照
本願は、2021年10月20日に出願された米国仮特許出願第63/257,913号に係る優先権の恩典を主張する。米国仮特許出願第63/257,913号は全ての目的のために参照により組み入れられる。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
サイトカイン受容体は、典型的には、細胞内ドメインの相互作用を介してシグナル伝達を刺激する細胞表面発現タンパク質の多量体である。サイトカインはサイトカイン受容体サブユニットの細胞外ドメインに対する特異的リガンドとして作用し、細胞内シグナル伝達が起こり得るように、このようなサイトカイン受容体サブユニットの細胞内ドメインを近接するために、このような受容体サブユニットの多量体化を容易にする。異なるサイトカインの間で、ある特定のサイトカイン受容体サブユニットが共有され、サイトカインの性質によって、どの受容体サブユニットが多量体化して、サイトカイン受容体複合体と、結果として生じる細胞内シグナル伝達パターンを形成するのかが決まる。従って、サイトカインは個々の受容体サブユニットを架橋して、細胞内シグナル伝達を起こす受容体複合体になるように作用する。
【０００３】
サイトカイン受容体サブユニット細胞内ドメインは、典型的に、細胞膜の内面の近くにある、サイトカイン受容体サブユニット細胞内ドメインのbox1/box2領域に位置するJAK結合ドメインを有する。これらのJAK結合ドメインには細胞内JAKキナーゼが会合する。典型的には、受容体に対するコグネイトリガンドと受容体サブユニット細胞外ドメインとの結合によって受容体サブユニットの細胞内ドメインが近接されると、JAKは互いをリン酸化する。哺乳動物細胞では4種類のJanusキナーゼ:JAK1、JAK2、JAK3、およびTYK2が特定されている。Ihle, et al. (1995) Nature 377(6550):591-4, 1995（非特許文献1）; O'Shea and Plenge (2012) Immunity 36(4):542-50（非特許文献2）。JAKリン酸化によってJAKのコンホメーション変化が誘導され、それによって、その受容体に関連する細胞内シグナルを伝達する複数の細胞内因子を活性化するカスケードを開始する他の細胞内タンパク質をさらにリン酸化できるようになる。結果として生じる、遺伝子転写などの細胞内応答は、しばしば、総称して下流シグナル伝達と呼ばれる。
【０００４】
多くの場合、JAKによってリン酸化されるタンパク質はシグナル伝達性転写因子(STAT)タンパク質ファミリーのメンバーである。現在まで、哺乳動物STATファミリーの7つのメンバー:STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a STAT5b、およびSTAT6が特定されている。Delgoffe, et al., (2011) Curr Opin Immunol. 23(5):632-8（非特許文献3）; Levy and Darnell (2002) Nat Rev Mol Cell Biol. 3(9):651-62（非特許文献4）、およびMurray, (2007) J Immunol. 178(5):2623-9（非特許文献5）。活性化JAKおよびSTATタンパク質の選択的相互作用は総称してJAK/STAT経路と呼ばれ、サイトカイン結合に応答して観察される多種多様な細胞内応答を提供する。
【０００５】
ヒトIL-12(hIL-12)はヒトp35サブユニット(hIL-12Aとも呼ばれる。Uniprot Ref.

29459)とヒトp40サブユニット(hIL-12Bとも呼ばれる。Uniprot Ref. 29460)で構成されるヘテロ二量体サイトカインである。hIL-12ヘテロ二量体はp70とも呼ばれる。hIL-12は樹状細胞、マクロファージ、および好中球によって産生される。hIL-12は、典型的には、T細胞の増殖と活性化を刺激することができるT細胞刺激因子として特定される。hIL12はIFNγとTNFαの産生を刺激し、NK細胞とCD8+細胞傷害性T細胞の細胞傷害活性を調整する。hIL12は細胞傷害性リンパ球成熟因子として最初に特定および言及された。Stern, et al (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:6808-6812（非特許文献6）およびGatelyら、2004年1月27日に発行された米国特許第6,683,046号（特許文献1）。hIL-12はまた免疫細胞の分化、特に、ナイーブT細胞からTh1(CD4+)細胞への分化にも関与する。hIL-12はまた抗血管新生活性をもたらすことも報告されている。30年以上前にhIL-12が発見されてから、様々な新生物疾患、ウイルス感染症および細菌感染症の処置における使用について提案および評価されている。例えば、Lasek, et al (2014) Cancer Immunol Immunother (2014) 63:419-435（非特許文献7）を参照されたい。

【０００６】

hIL-12は、hIL12受容体サブユニットβ-1(IL-12Rβ1、科学文献においてIL-12RB1またはCD212、Uniprot Ref. P42701とも呼ばれる)と、hIL-12受容体サブユニットβ-2(hIL-12Rβ2、科学文献においてhIL-12RB2、Uniprot Ref. Q99665とも呼ばれる)のヘテロ二量体複合体であるhIL-12受容体に結合する。hIL12Rβ1およびhIL12Rβ2はクラスIサイトカイン受容体ファミリーのメンバーであり、gp130と相同性を有する。hIL12Rβ1とhIL12Rβ2の発現はhIL-12に応答してアップレギュレートされ、hIL12Rβ2の大多数は活性化T細胞において見出される。

【０００７】

hIL12Rβ1は、ヘモポイエチン受容体スーパーファミリーに属する構成的に発現されるI型膜貫通タンパク質である。hIL12Rβ1はhIL-12に低い親和性で結合する。hIL12Rβ1はhIL-12p40サブユニットとの結合に必要とされ、Janusキナーゼ(Jak)ファミリーのメンバーであるTyk-2と関連付けられる。IL12のIL12p40サブユニットがIL12Rβ1に結合し、IL12p35サブユニットがIL12Rβ2に結合すると、IL-12Rβ1とIL-12Rβ2の二量体化が起こる。IL-12Rβ1とIL-12Rβ2の二量体化に応答してJak-2およびTyk-2はトランスリン酸化され、Jak2およびTyk2キナーゼ活性がさらに活性化され、その結果、IL12Rβ1およびIL12Rβ2細胞内ドメインがリン酸化される。IL12Rβ2のリン酸化された細胞内シグナル伝達ドメインはSTAT4に結合部位を提供する。STAT4は、リン酸化されたIL-12Rβ2に結合し、その後にリン酸化される。リン酸化されたSTAT4は、別のリン酸化されたSTAT4分子との二量体化を誘導する。リン酸化されたSTAT4ホモ二量体は核に移動し、その結果、活性の中でも特にIFN-γ遺伝子転写の促進をもたらす。IFN-γはマクロファージ、NK細胞、およびT細胞の活性および増殖を誘導し、マクロファージ、NK細胞、およびT細胞もIL-12を分泌する。

【０００８】

hIL-12受容体の成分の1つを形成することに加えてhIL-12Rβ1はhIL-23受容体の一成分でもある。hIL-23受容体はhIL-23R(Uniprot Ref. Q5VWK5)とhIL-12Rβ1のヘテロ二量体である。hIL-23はhIL-23Rに44ナノモル濃度(nM)の親和性で結合するが、hIL-12Rβ1には2マイクロモル濃度(μM)というかなり低い親和性で結合する。hIL-23RとhIL12Rβ1との明白な直接結合はなく、hIL-23h:IL-23R:hIL-12Rβ1複合体の完成は、最初にhIL-23:hIL-23R複合体が形成し、次にIL12Rβ1に結合することで媒介される。IL23は、p40サブユニットとp19サブユニットで構成されるヘテロ二量体サイトカインである。IL12受容体とIL23受容体はIL12Rβ1受容体サブユニットを共有するが、別個の下流シグナル伝達パターンを誘導する。IL12は様々な新生物疾患の処置において有用だと意味付けられてきたが、IL23インヒビター(例えば、ウステキヌマブ、グセルクマブ、チルドラキズマブ、およびリサンキズマブ)は、主として、自己免疫障害、例えば、乾癬性関節炎および中程度から重度の尋常性乾癬(placque psoriasis)を処

置するのに指示される。

【０００９】

IL12およびIL23のサブユニットを形成することに加えてp40は重要な生理活性を有する。P40は単量体としてもジスルフィド連結ホモ二量体(p80)としても存在することが報告されており、ジスルフィド連結ホモ二量体(p80)は、IL12Rβ1のみで媒介されるマクロファージに対する化学誘引物質的な役割を有し、これらの受容体において競合することでIL-12およびIL-23アンタゴニストとして作用する可能性がある。Holscher, C. (2004) Med Microbiology and Immunology 193(1)1-17（非特許文献8）。

【００１０】

IL12には、NK細胞によるIFNγ産生の刺激、NK細胞および細胞傷害性T細胞の細胞溶解特性の強化、ならびに血管形成の阻害を含む、癌の処置におけるその使用を示唆した多くの特性がある。IL12は動物モデルにおいて有意な抗腫瘍活性を示し、このことが1990年代末期に様々な癌の処置における第I相臨床試験および第II相臨床試験での評価につながった。Lasek, et al., 前記。有益な効果が観察されたが、重大な有害事象が観察されたため、これらの臨床試験は終了した。その後、hIL12分子およびhIL12をコードする遺伝子療法ベクターの使用について様々なアプローチが評価されてきたが、これらの剤に関連する毒性のために、第I相臨床試験および第II相臨床試験への進展は今までのところ制限されてきた。IL12を含む市販の治療剤は無い。

【００１１】

異なる細胞タイプが異なる感受性でリガンドとそのコグネイト受容体との結合に応答するので、野生型hIL-12(すなわち、野生型p35およびp40を含む)と比べてhIL-12受容体(またはその個々の成分)に対するヘテロ二量体hIL-12リガンド(またはその個々の成分)の親和性を調整することで、非標的細胞に対して望ましくない活性を低減しながら、標的細胞に対して望ましい活性を刺激することができる。一部の態様では、本開示のhIL-12部分アゴニストは、望ましくない細胞タイプに対して有意に小さい細胞内シグナル伝達をもたらしながら、望ましい細胞タイプに対してwthIL12の細胞内シグナル伝達特徴をもたらす、改変されたp40サブユニットポリペプチドを含む。これは、例えば、細胞を、hIL-12Rβ1に対して改変された結合親和性を有するヘテロ二量体hIL12Fcムテインを含むIL12部分アゴニストと接触させることによって、またはhIL-12Rβ1に対する野生型または親hIL-12p40ポリペプチドの結合親和性と比較してhIL-12Rβ1に対して異なるE_{max}を引き起こすことによって成し遂げられる。

【００１２】

Glassman, et al. (2021) Cell 184(4):983-999（非特許文献9）はIL12受容体およびIL23受容体の結晶構造について述べており、IL12Rβ1受容体と相互作用するp40の残基について述べている。特に、Glassmanらは、CD8+T細胞のIFNγ誘導および腫瘍細胞の死滅を保っているが、NK細胞からの活性化およびサイトカイン産生の低減を示す、改変されたp40サブユニットを含むIL12部分アゴニストについて述べている。NK細胞の刺激は毛細血管漏出症候群などの重大な全身副作用と関連する。NK細胞を大幅にアップレギュレーションすることなくCD8+T細胞を選択的に活性化するIL12部分アゴニストはNK細胞の活性化に関連する全身毒性を軽減しながら、IL12の有益な抗腫瘍効果を保持している。このIL12部分アゴニストは前臨床マウス腫瘍モデルにおいてIL-12と比べて強力な抗腫瘍免疫と低い毒性を生じた。

【００１３】

IL12の抗腫瘍効果を最大にするために、持続的なサイトカイン全身レベルを提供することが望ましい。組換えヒトIL12(rhIL12)のインビボ半減期は、IL2などの他のサイトカインよりも長いが、依然として比較的短い。この研究における最大耐量である単一500ng/kg用量のrhIL12を静脈内大量瞬時投与した後の野生型rhIL-12の半減期は5.3時間～10.3時間であることが観察された。Atkins, et al (1997) Clinical Cancer Research 3:409-417（非特許文献10）。しかしながら、wt hIL12処置に関連する毒性が長期送達型IL12を開発する妨げとなっていた。以前に述べられたように、IL12の持

続的な、かつ標的化された送達が評価されてきたが、成功したIL12治療剤をもたらしていない。

【００１４】

Fc融合コンジュゲートは生物製剤の全身半減期を延ばすことが示されており、従って、その生物製剤製品は頻繁な投与を必要としない。操作されたFcドメインは、治療抗体、特に、二重特異性抗体という面に関して大規模に調査されており、非常に多くのFc操作抗体が開発および商品化されている。例えば、Czajkowsky, et al. (2012) EMBO Mol Med 4:1015-1028（非特許文献11）を参照されたい。Fcは、血管を裏打ちする内皮細胞の表面にある胎児性Fc受容体(FcRn)に結合し、結合すると、Fc融合分子は分解から保護され、循環に再放出され、それにより、この分子はさらに長く循環中に保たれる。これらのFcドメイン特性は、内因性IgGがその長い血漿半減期を保持する機構だと考えられている。もっと最近のFc融合技術では、従来のFc融合コンジュゲートと比較して生物製剤の薬物動態学的特性および薬力学的特性を最適化するために1コピーの生物製剤を抗体のFc領域に連結する。エフェクター機能の調整としてFcドメインに特定の有益な特徴をもたらす、Fcエンジニアリング(Fc engineerin)と呼ばれるFcドメインへの様々な改変が開発されてきた(Wang, et al. (2018) Protein Cell 9(1):63-73（非特許文献12）)。例えば、Zalevskyらは、半減期を延ばすために、しばしば「LS」改変と呼ばれるアミノ酸置換M428LおよびN434S(EUナンバリング)について述べている。Zalevsky, et al. (2010) Nature Biotechnology 28:157-159（非特許文献13）。

【００１５】

IL12のFcコンジュゲートは文献に記載されている。例えば、Gilliesらは、野生型p35と野生型P40サブユニットのそれぞれがFcサブユニットとの融合タンパク質として発現されたIL12 Fcコンジュゲートについて述べた。Gillies, et al.(1998) J. Immunol. 160:6195-6203（非特許文献14）およびGilliesら、2005年1月4日に発行された米国特許第6,838,260号（特許文献2）。同様に、Kimら(WO/2018/030806として2018年2月15日に公開されたPCT/KR2017/008676（特許文献3）;2021年8月3に発行された米国特許第11,078,249号（特許文献4）;2020年6月30に発行された米国特許第10,696,722号（特許文献5）)は、p35サブユニットとP40サブユニットがFcドメインとの融合タンパク質として発現され、Fcドメインがヘテロ二量体化を促進するように改変されているIL12 Fcコンジュゲートについて述べている。Cheungら(WO/2020/086758として2020年4月30日に公開されたPCT国際特許出願番号PCT/US2019/057721（特許文献6）)およびBigelowら(WO/2021/216916として2021年10月28日に公開されたPCT国際特許出願PCT/US2021/028701（特許文献7）)はIL12 Fcコンジュゲートについて述べている。Bernettら(WO/2020/072821として2020年4月9日に公開されたPCT国際特許出願PCT/US19/54570（特許文献8）、2020年7月9に公開された米国特許出願公開番号US2020/0216509（特許文献9）;2022年6月14日に発行された米国特許第11,358,999号（特許文献10）)は、野生型および改変されたp35サブユニットおよびP40サブユニットを含むIL2 Fcコンジュゲートについて述べている。Epsteinら、2016年5月4日に公開された中国特許出願番号CN201410597561.4A（特許文献11）も参照されたい。

【００１６】

本開示は、ヒトp35(hP35)およびヒトP19(hP19)と会合して、改変されたhIL-12およびIL23部分アゴニストを形成する、改変されたヒトp40分子を含む部分アゴニストとしてのIL12およびIL23ムテインを提供し、ここで、IL12およびIL23ムテインの個々の成分は、操作されたFcドメインに連結されている。本開示のIL12およびIL23アゴニストは、これらが由来する野生型親分子の多くの有益な特性を保持する一方で、野生型IL12およびIL23に付随する関連毒性を軽減している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１７】

【特許文献１】米国特許第6,683,046号
【特許文献２】米国特許第6,838,260号
【特許文献３】PCT/KR2017/008676
【特許文献４】米国特許第11,078,249号
【特許文献５】米国特許第10,696,722号
【特許文献６】PCT国際特許出願番号PCT/US2019/057721
【特許文献７】PCT国際特許出願PCT/US2021/028701
【特許文献８】PCT国際特許出願PCT/US19/54570
【特許文献９】米国特許出願公開番号US2020/0216509
【特許文献１０】米国特許第11,358,999号
【特許文献１１】中国特許出願番号CN201410597561.4A
【非特許文献】
【００１８】
【非特許文献１】Ihle, et al. (1995) Nature 377(6550):591-4, 1995
【非特許文献２】O'Shea and Plenge (2012) Immunity 36(4):542-50
【非特許文献３】Delgoffe, et al., (2011) Curr Opin Immunol. 23(5):632-8
【非特許文献４】Levy and Darnell (2002) Nat Rev Mol Cell Biol. 3(9):651-62
【非特許文献５】Murray, (2007) J Immunol. 178(5):2623-9
【非特許文献６】Stern, et al (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:6808-6812
【非特許文献７】Lasek, et al (2014) Cancer Immunol Immunother (2014) 63:419-435
【非特許文献８】Holscher, C. (2004) Med Microbiology and Immunology 193(1)1-17
【非特許文献９】Glassman, et al. (2021) Cell 184(4):983-999
【非特許文献１０】Atkins, et al (1997) Clinical Cancer Research 3:409-417
【非特許文献１１】Czajkowsky, et al. (2012) EMBO Mol Med 4:1015-1028
【非特許文献１２】Wang, et al. (2018) Protein Cell 9(1):63-73
【非特許文献１３】Zalevsky, et al. (2010) Nature Biotechnology 28:157-159
【非特許文献１４】Gillies, et al.(1998) J. Immunol. 160:6195-6203
【発明の概要】
【００１９】
開示の概要

本開示は、他の細胞サブタイプまたは組織サブタイプにおける望ましくない活性および/または細胞内シグナル伝達を最小限にしながら、望ましい治療シグナル伝達が起こるように、特に望ましい細胞サブタイプまたは組織サブタイプにおいて起こるように、hIL-12結合の複数の効果を調整する方法および組成物に関する。一部の態様では、本開示は、哺乳動物対象においてインビボで長期の作用期間を有するヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【００２０】
一部の態様では、本開示は、
第1の融合タンパク質と第2の融合タンパク質を含むヘテロ二量体タンパク質を含むヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、
第1の融合タンパク質が、
SEQ ID NO:2(野生型成熟hP35)に対して90％以上、あるいは91％以上、あるいは92％以上、あるいは93％以上、あるいは94％以上、あるいは95％以上、あるいは96％以上、あるいは97％以上、あるいは98％以上、あるいは99％以上、あるいは100％の配列同一性を有するヒトp35ポリペプチドと、
ヒト免疫グロブリン分子の第1の上部ヒンジ領域と、
ヒト免疫グロブリン分子の第1のFcドメイン(「hP35Fc」)と
を含み、

第2の融合タンパク質が、
SEQ ID NO:4(野生型成熟hP40)に対して90%以上、あるいは91%以上、あるいは92%以上、あるいは93%以上、あるいは94%以上、あるいは95%以上、あるいは96%以上、あるいは97%以上、あるいは98%以上、あるいは99%以上の配列同一性を有するヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドであって、ヒトp40ムテインが(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される1つまたは複数の位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、ヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドと、
ヒト免疫グロブリン分子の第2の上部ヒンジ領域と、
ヒト免疫グロブリン分子の第2のFcドメイン(「hP40MFc」)と
を含み、第1のFcドメインと第2のFcドメインがヘテロ二量体化を促進するように改変されている、
ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0021】

一部の態様では、本開示は、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、K219、およびK282からなる群より選択される1つまたは複数の位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、本開示は、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)E81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される1つまたは複数の位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、本開示は、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)E81A/F82A;E81A/F82A/K106A;およびE81A/F82A/K106A/K217Aからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含むヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0022】

一部の態様では、本開示は、E81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される1つまたは複数の位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含み、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)位置K282においてアミノ酸置換をさらに含むヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、本開示は、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)E81A/F82A/K282A;E81A/F82A/K282G;E81A/F82A/K282N;E81A/F82A/K282Q;E81A/F82A/K106A;E81A/F82A/K106A/K282A;E81A/F82A/K106A/K282G;E81A/F82A/K106A/K282N;E81A/F82A/K106A/K282Q;E81A/F82A/K106A/K217A/K282A;E81A/F82A/K106A/K217A/K282Q;E81A/F82A/K106A/K217A/K282N;およびE81A/F82A/K106A/K217A/K282Gからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含むヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0023】

一部の態様では、本開示は、ヒトp40ムテイン(「hP40M」)ポリペプチドを含むヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、hP40ムテインがSEQ ID NO:4、6、8、10、155、156、157、158、159、160、161、および162からなる群より選択される、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0024】

一部の態様では、ヘテロ二量体化を促進するための、ヘテロ二量体hIL12Fcムテイン

のFcドメインへの改変。一部の態様では、ヘテロ二量体化を促進するための、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインの Fcドメインへの改変は、相補的な「ノブイントゥホール(knob-into-hole)」変異である。一部の態様では、hP35FcおよびhP40MFcドメインの、ヘテロ二量体化を促進するためのFcドメインの改変は、第1のドメインにあるアミノ酸置換T366W(「ノブ」)と、第2のドメインにあるアミノ酸置換T366S/L368A/Y407V(「ホール」)を含む。

【００２５】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35Fcポリペプチドとh P40MFcポリペプチドが、1つのジスルフィド結合、任意で2つのジスルフィド結合、任意で3つのジスルフィド結合、または任意で4つのジスルフィド結合を介して共有結合的に連結されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、hP35FcおよびhP40MFcは、hP35FcのhP35ドメインのアミノ酸C96のスルフヒドリル基と、hP40MFcのhP40Mドメインのアミノ酸C199のスルフヒドリル基との間のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される。一部の態様では、hP35FcおよびhP40MFcは、hP35Fcの下部ヒンジドメインのアミノ酸C226のスルフヒドリル基と、hP40MFcの下部ヒンジドメインのアミノ酸C226のスルフヒドリル基との間のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される。一部の態様では、hP35FcおよびhP40MFcは、hP35Fcの下部ヒンジドメインのアミノ酸C229のスルフヒドリル基と、hP40MFcの下部ヒンジドメインのアミノ酸C229のスルフヒドリル基との間のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される。一部の態様では、第1のFcドメインはアミノ酸置換S354Cを含み、第2のFcドメインはアミノ酸置換Y349Cを含む。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、アミノ酸置換S354Cを含む第1のFcドメインと、アミノ酸置換Y349Cを含む第2のFcドメインを含み、hP35FcおよびhP40MFcドメインは、第1のFcドメインのS354Cと第2のFcドメインのY349Cとの間のジスルフィド結合を介して連結される。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35FcおよびhP40MFcは、以下のシステイン残基ペア:(a)hP35のC96とhP40MのC199;(b)第1のFc単量体のC226と第2のFc単量体のC226、(c)第1のFc単量体のC229と第2のFc単量体のC229;および(d)S354Cアミノ酸置換を含む第1のFcドメインのS354Cと、Y349Cアミノ酸置換を含む第2のFcドメインのY349Cの側鎖間の、1つまたは複数の、任意で2つ以上の、任意で3つ以上のジスルフィド結合、任意で4つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される。

【００２６】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が、エフェクター機能を低減するための1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、hP35Fcおよび/またはhP40MFcポリペプチドは、(a)L234A/L235A/P329A(「LALAPA」);L234A/L235A/P329G(「LALAPG」);L234A/L235E/G237A/A330S/P331S(「AEASS」);およびL234F/L235E/P331S(「FES」)からなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む。

【００２７】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が、上部ヒンジドメインの位置C220(EUナンバリング)において、スルフヒドリル側鎖を排除するためのアミノ酸置換を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、位置C220における置換はC220S(EUナンバリング)置換である。

【００２８】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が、Fcドメインの位置M428および/またはN434(EUナンバリング)にアミノ酸置換を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、位置M428および/またはN434におけるアミノ酸置換はM428Lおよび/

またはN434Sである。

【００２９】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が、Fcドメインの位置G446および/またはK447(EUナンバリング)においてアミノ酸欠失を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【００３０】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方がPEG化されている、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、hP35FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が上部ヒンジのアミノ酸C220のスルフヒドリル側鎖を介してPEG化されている。

【００３１】

一部の態様では、本開示は、1つまたは複数のアミノ酸置換を欠いているp40ポリペプチドを含む野生型hIL-12と比較して、(i)CD8+T細胞においてhIL-12シグナル伝達を誘導し、(ii)NK細胞においてhIL-12シグナル伝達が減少している(例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%減少している)、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【００３２】

一部の態様では、本開示は、このようなアミノ酸置換を欠いているp40サブユニットを含む野生型IL12と比較して、CD8+T細胞においてインターフェロンγ(IFNγ)を活性化し、CD8+T細胞におけるIFNγシグナル伝達が減少している、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%減少しているヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【００３３】

一部の態様では、本開示は、野生型IL12の結合親和性と比較して、hIL-12Rβ1に対する結合親和性が低減している、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%低減しているヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【００３４】

一部の態様では、本開示は、哺乳動物細胞ベースのアッセイにおいて評価された時、野生型hIL12と比較してSTAT-4によって媒介されるシグナル伝達が減少している、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%減少しているヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【００３５】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:178に対して90%以上、あるいは91%以上、あるいは92%以上、あるいは93%以上、あるいは94%以上、あるいは95%以上、あるいは96%以上、あるいは97%以上、あるいは98%以上、あるいは99%以上、あるいは100%の配列同一性を有するヒトp19ポリペプチドと、ヒト免疫グロブリン分子の第1の上部ヒンジ領域と、ヒト免疫グロブリン分子の第1のFcドメイン(「hP19Fc」)とを含む第1の融合タンパク質と、SEQ ID NO:4(野生型成熟hP40)に対して90%以上、あるいは91%以上、あるいは92%以上、あるいは93%以上、あるいは94%以上、あるいは95%以上、あるいは96%以上、あるいは97%以上、あるいは98%以上、あるいは99%以上の配列同一性を有し、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)W37、P39、D40、A41、Q64、K80、E81、F82、A85、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される1つまたは複数の位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトp40ムテインポリペプチドと、ヒト免疫グロブリン分子の第2の上部ヒンジ領域と、ヒト免疫グロブリン分子の第2のFcドメイン(「hP40MFc」)とを含む第2の融合タンパク質を含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインであって、第1のFcドメインおよび第2のFcドメインがヘテロ二量体化を促進するように改変されている、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。

【００３６】

一部の態様では、ヘテロ二量体化を促進するための、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインのドメインへの改変は、相補的な「ノブイントゥホール」変異である。一部の態様では、hP19FcおよびhP40MFcドメインの、ヘテロ二量体化を促進するためのFcドメインの改変は、第1のドメインにあるアミノ酸置換T366W(「ノブ」)と、第2のドメインにあるアミノ酸置換T366S/L368A/Y407V(「ホール」)を含む。

【００３７】

一部の態様では、本開示は、hIL23のhP19FcポリペプチドとhP40MFcポリペプチドが、1つのジスルフィド結合、任意で2つのジスルフィド結合、任意で3つのジスルフィド結合、または任意で4つのジスルフィド結合を介して共有結合的に連結された、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。一部の態様では、hP19FcおよびhP40MFcは、hP19FcのhP19ドメイン(シグナルペプチドを含むプロhP19配列に従って番号付けられた。Uniprot Refernce No. Q9NPF7)のアミノ酸C76のスルフヒドリル基と、hP40MFcのhP40Mドメインのアミノ酸C199のスルフヒドリル基との間のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される。一部の態様では、hP19FcおよびhP40MFcは、hP19Fcのアミノ酸C226のスルフヒドリル基と、hP40MFcのアミノ酸C226のスルフヒドリル基との間のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される。一部の態様では、hP35FcおよびhP40MFcは、hP19Fcのアミノ酸C229のスルフヒドリル基と、hP40Mドメインのアミノ酸C229のスルフヒドリル基との間のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される。一部の態様では、第1のFcドメインはアミノ酸置換S354Cを含み、第2のFcドメインはアミノ酸置換Y349Cを含む。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインは、アミノ酸置換S354Cを含む第1のFcドメインと、アミノ酸置換Y349Cを含む第2のFcドメインを含み、hP19FcおよびhP40MFcドメインは、第1のFcドメインのS354Cと第2のFcドメインのY349Cとの間のジスルフィド結合を介して連結される。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP19FcおよびhP40MFcは、以下のシステインペアの群の側鎖間の、1つまたは複数の、任意で2つ以上の、任意で3つ以上のジスルフィド結合、任意で4つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される:(a)hP19のC76とhP40MのC199;(b)第1のFc単量体のC226と第2のFc単量体のC226、(c)第1のFc単量体のC229と第2のFc単量体のC229;および(d)S354Cアミノ酸置換を含む第1のFcドメインのS354Cと、Y349Cアミノ酸置換を含む第2のFcドメインのY349C。

【００３８】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP19FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が、エフェクター機能を低減するための1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。一部の態様では、hP19Fcおよび/またはhP40MFcポリペプチドは、(a)L234A/L235A/P329A(「LALAPA」);L234A/L235A/P329G(「LALAPG」);L234A/L235E/G237A/A330S/P331S(「AEASS」);およびL234F/L235E/P331S(「FES」)からなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む。

【００３９】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP19FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が、上部ヒンジドメインの位置C220(EUナンバリング)において、スルフヒドリル側鎖を排除するためのアミノ酸置換を含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。一部の態様では、位置C220における置換はC220S(EUナンバリング)置換である。

【００４０】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP19FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が、Fcドメインの位置M428および/またはN434(EUナンバリング)においてアミノ酸置換を含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。一部の態様では、位置M428および/またはN434におけるアミノ酸置換はM428Lおよび/またはN434Sである。

【００４１】
一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP19FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方がPEG化されている、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。一部の態様では、hP35FcおよびhP40MFcサブユニットの一方または両方が上部ヒンジのアミノ酸C220のスルフヒドリル側鎖を介してPEG化されている。
【００４２】
一部の態様では、本開示は、hP19FcポリペプチドとhP40MFcポリペプチドが、1つのジスルフィド結合、任意で2つのジスルフィド結合、任意で3つのジスルフィド結合、または任意で4つのジスルフィド結合を介して共有結合的に連結されたヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。
【００４３】
一部の態様では、本開示は、式#1:
$hP40M\text{-}L1_a\text{-}UH1\text{-}Fc1$ [1]
のポリペプチドをコードする核酸配列であって、
式中、
hP40Mが、野生型プレヒトP40(SEQ ID NO:3)に従って番号付けられた位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトp40ムテインであり、L1がGSAリンカーであり、aが0(存在しない)または1(存在する)より選択され、UH1が、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、Fc1が、ヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドである、
核酸配列を提供する。
【００４４】
一部の態様では、本開示は、式#2:
$hP35\text{-}L2_b\text{-}UH2\text{-}Fc2$ [2]
の核酸配列であって、
式中、
hP35が、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%、あるいは少なくとも91%、あるいは少なくとも92%、あるいは少なくとも93%、あるいは少なくとも94%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも96%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、またはあるいは少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するポリペプチドであり、L2がGSAリンカーであり、bが0(存在しない)または1(存在する)より選択され、UH2が、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、Fc2が、ヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドである、
核酸配列を提供する。
【００４５】
一部の態様では、本開示は、1つまたは複数の異種核酸配列に機能的に連結された、hP35FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする発現カセットであって、hP35FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列が、(a)1種類のプロモーターの制御下にあり、(b)同時発現を容易にする介在配列を介して連結されている、発現カセットを提供する。hP35FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列が、同時発現を容易にする介在配列を介して連結されている、一部の態様では、p35Fc

ポリペプチドをコードする核酸配列は、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列に対して5’側にある。hP35FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列が、同時発現を容易にする介在配列を介して連結されている、一部の態様では、p40MFcポリペプチドをコードする核酸配列は、hP35Fcポリペプチドをコードする核酸配列に対して5’側にある。一部の態様では、同時発現を容易にする介在配列はIRESエレメントまたはT2A配列である。

【００４６】

一部の態様では、本開示は、1つまたは複数の異種核酸配列に機能的に連結された、hP19FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする発現カセットであって、hP19FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列が、(a)1種類のプロモーターの制御下にあり、(b)同時発現を容易にする介在配列を介して連結されている、発現カセットを提供する。hP19FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列が、同時発現を容易にする介在配列を介して連結されている、一部の態様では、p19Fcポリペプチドをコードする核酸配列は、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列に対して5’側にある。hP19FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列が、同時発現を容易にする介在配列を介して連結されている、一部の態様では、p40MFcポリペプチドをコードする核酸配列は、hP19Fcポリペプチドをコードする核酸配列に対して5’側にある。一部の態様では、同時発現を容易にする介在配列はIRESエレメントまたはT2A配列である。

【００４７】

一部の態様では、本開示は、1つまたは複数の異種核酸配列に機能的に連結された、hP19FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする発現カセットであって、hP19FcポリペプチドおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列が、(a)1種類のプロモーターの制御下にあり、(b)哺乳動物細胞において同時発現を容易にする介在配列を介して連結されている、発現カセットを提供する。

【００４８】

本開示は、hP35Fcポリペプチドをコードする第1の発現カセットを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする組換えベクターと、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む第2の発現カセットを含む、同じ、または第2のベクターをさらに提供する。一部の態様では、前記ベクターはウイルスベクターである。一部の態様では、前記ベクターは非ウイルスベクターである。

【００４９】

本開示は、hP19Fcポリペプチドをコードする第1の発現カセットを含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする組換えベクターと、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む第2の発現カセットを含む、同じ、または第2のベクターをさらに提供する。一部の態様では、前記ベクターはウイルスベクターである。一部の態様では、前記ベクターは非ウイルスベクターである。

【００５０】

本開示の核酸分子またはベクターを含む、組換えにより改変された細胞がさらに提供される。一部の態様では、前記細胞は、細菌細胞などの原核細胞である。一部の態様では、前記細胞は、哺乳動物細胞などの真核細胞である。本開示の少なくとも1つの組換えにより改変された細胞と培養培地を含む細胞培養物も提供される。

【００５１】

一部の態様では、組換えにより改変された細胞は、hP35Fcポリペプチドをコードする第1の発現カセットと、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む第2の発現カセットを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする組換えベクターによって形質転換されている。一部の態様では、組換えにより改変された細胞は、hP19FcポリペプチドをコードするP1の発現カセットと、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配

列を含むおよび第2の発現カセットを含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする組換えベクターによって形質転換されている。

【００５２】

一部の態様では、組換えにより改変された細胞は、1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結された、hP35Fcポリペプチドをコードする核酸配列を含む第1のベクターと、1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結された、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現カセットを含む第2のベクターによって形質転換されている。一部の態様では、組換えにより改変された細胞は、1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結された、hP19Fcポリペプチドをコードする核酸配列を含む第1のベクターと、1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結された、hP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現カセットを含む第2のベクターによって形質転換されている。一部の態様では、前記細胞は、細菌細胞などの原核細胞である。一部の態様では、前記細胞は、哺乳動物細胞などの真核細胞である。本開示の少なくとも1つの組換えにより改変された細胞と培養培地を含む細胞培養物も提供される。

【００５３】

本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを組換え産生、単離、精製、および特徴付けするための方法をさらに提供する。従って、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを産生するための方法が本明細書において提供される。一部の態様では、前記方法は、a)本明細書において開示された、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列を含む核酸分子またはベクターを含む1つまたは複数の組換えにより改変された細胞を準備する工程;およびb)細胞が、核酸配列によってコードされるヘテロ二量体hIL12Fcムテインを産生するように、培養培地中で1つまたは複数の細胞を培養する工程を含む。一部の態様では、前記方法は、(c)改変されたhIL-12p40ポリペプチドを単離および/または精製する工程をさらに含む。上記の方法によって産生されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインも提供される。

【００５４】

本開示は、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む薬学的組成物をさらに提供する。一部の態様では、薬学的組成物は、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインと、薬学的に許容される担体を含む。一部の態様では、薬学的組成物は、本開示の核酸分子またはベクターを含む。一部の態様では、薬学的組成物は、本開示の組換えにより改変された細胞を含む。一部の態様では、組換えにより改変された細胞は哺乳動物細胞である。

【００５５】

本開示は、新生物疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法であって、哺乳動物を、本明細書において開示されたヘテロ二量体hIL23Fcムテインの薬学的製剤と接触させる工程を含む、方法をさらに提供する。本開示は、新生物疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法であって、哺乳動物を、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインの薬学的製剤と接触させる工程を含み、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインが表8のヘテロ二量体hIL23Fcムテインである、方法をさらに提供する。

【００５６】

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインの薬学的製剤を用いて新生物疾患を処置する方法において、哺乳動物に提供されるヘテロ二量体hIL12Fcムテインの用量は、10ug/kg～500ug/kg、あるいは10ug/kg～250ug/kg、あるいは10ug/kg～80ug/kg、あるいは10ug/kg～40ug/kg、あるいは10ug/kg～30ug/kg、あるいは10ug/kg～20ug/kg、またはあるいは約15ug/kgである。

【００５７】

本開示は、新生物疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法であって、哺乳動物を、1種または複数種の補助治療剤と組み合わせた、本明細書において開示されたヘテロ二量体hIL23Fcムテインの薬学的製剤と接触させる工程を含む、方法をさらに提供する。一

部の態様では、1種または複数種の補助治療剤補助治療剤は、チェックポイントインヒビター、サイトカイン、または治療抗体からなる群より選択される。本開示の方法の一部の態様では、1種または複数種の補助治療剤補助治療剤は、抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗CTLA4抗体、および抗LAG3抗体からなる群より選択されるチェックポイント(chekpoint)インヒビターである。本開示の方法の一部の態様では、1種または複数種の補助治療剤補助治療剤は、ヒトインターロイキン-2と少なくとも90%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、あるいは少なくとも99%、またはあるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドである。

【００５８】

本開示の方法の一部の態様では、1種または複数種の補助治療剤補助治療剤は、成熟野生型ヒトIL2に従って番号付けられた位置1、2、3、4、5、6、18、22、125、および126において1つまたは複数のアミノ酸置換または欠失を含むヒトIL2ムテインである。本開示の方法の一部の態様では、1種または複数種の補助治療剤補助治療剤は、Emmerichら、WO2021/146436A2として2021年7月22日に公開されたPCT国際出願番号PCT/US2021/013456;Emmerichら、WO2021/146481Alとして2021年7月22日に公開されたPCT/US2021/013514、およびGarciaら、WO2019/104092A1として2019年5月31日に公開されたPCT/US2018/062122に記載のように、IL2受容体のCD132サブユニットに対する親和性が低減している、偏りがある(biased)IL2ムテインである。これらの全開示が参照により本明細書に組み入れられる。

【００５９】

本開示の方法の一部の態様では、1種または複数種の補助治療剤補助治療剤は、成熟野生型ヒトIL2に従って番号付けられた位置18、22、および126においてアミノ酸置換を含む、偏りがあるヒトIL2ムテインである。本開示の方法の一部の態様では、1種または複数種の補助治療剤補助治療剤は、アミノ酸置換18R、Q22EおよびQ126Kを含む、偏りがあるヒトIL2ムテインである。本開示の方法の一部の態様では、1種または複数種の補助治療剤は、PEG化された成熟野生型ヒトIL2に従って番号付けられた位置18、22、および126においてアミノ酸置換を含む、偏りがあるIL2ムテインである。

【００６０】

一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを単独で、または1種もしくは複数種の補助剤と組み合わせて用いて新生物疾患を処置する方法であって、新生物疾患が、T細胞浸潤を伴う腫瘍を特徴とする、方法を提供する。一部の態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを単独で、または1種もしくは複数種の補助剤と組み合わせて用いて新生物疾患を処置する方法であって、新生物疾患が、メラノーマ、腎細胞癌(RCC)、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部癌、膵臓癌、および高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI)がんからなる群より選択される、方法を提供する。

【００６１】

別の局面では、本開示は、対象においてhIL12によって媒介されるシグナル伝達を調整するための方法であって、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインを含む、有効量の薬学的組成物を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一部の態様では、hIL12によって媒介されるシグナル伝達は、STAT4によって媒介されるシグナル伝達を含む。一部の態様では、STAT4によって媒介されるシグナル伝達は、遺伝子発現アッセイ、ホスホフロー(phospho-flow)シグナル伝達アッセイ、および酵素結合免疫測定法(ELISA)からなる群より選択されるアッセイによって決定される。一部の態様では、対象における、STAT4によって媒介されるシグナル伝達は参照レベルと比較して約20%、あるいは約30%、あるいは約40%、あるいは約50%、あるいは約60%、あるいは約70%、あるいは約80%、あるいは約90%、あるいは約100%低減する。一部の態様では、投与された組成物は、野生型hIL12と比べて、IFN-γ発現を誘導する能力を低減させる。

【００６２】

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインは哺乳

動物対象における疾患の処置および/または予防において有用である。従って、別の局面では、本開示は、健康状態の処置を必要とする対象において健康状態を処置するための方法であって、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン;ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列を含む核酸分子もしくはベクター;本明細書に記載の核酸分子もしくはベクターを含む組換えにより改変された細胞;または本明細書に記載の前述の1つもしくは複数を含む薬学的組成物を含む、治療有効量の組成物を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

【００６３】

別の局面では、本開示は、新生物疾患、感染性疾患、または自己免疫疾患の処置を必要とする対象において新生物疾患、感染性疾患、または自己免疫疾患を処置する方法であって、治療有効量の改変されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列を含む核酸分子もしくはベクター;本明細書に記載の核酸分子もしくはベクターを含む組換えにより改変された細胞、または本明細書に記載の薬学的組成物を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一部の態様では、本開示は、治療有効量の本開示のヘテロ二量体hIL23Fcムテインの投与による、哺乳動物対象における自己免疫疾患の処置または予防を提供する。一部の態様では、本開示は、治療有効量の本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインの投与による、哺乳動物対象における新生物疾患の処置または予防を提供する。

【００６４】

一部の態様では、本開示は、1種または複数種の補助治療剤と組み合わせた、治療有効量の本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインの投与による、哺乳動物対象における新生物疾患の処置または予防を提供する。

【００６５】

対象において、hIL-12によって媒介されるシグナル伝達またはhIL-23シグナル伝達を調整するための、または健康状態の処置を必要とする対象において健康状態を処置するためのキットも提供される。一部の態様では、キットは、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む。一部の態様では、キットは、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列を含む核酸分子もしくはベクター、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよび/もしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列を含む核酸分子もしくはベクター、または核酸分子を含む。一部の態様において、キットは、本明細書に記載の核酸分子もしくはベクターを含む組換えにより改変された細胞、または本明細書に記載の薬学的組成物を含む。

【図面の簡単な説明】

【００６６】

【図１】図1は、CD8細胞、CD4細胞、およびNK細胞における、漸増濃度の試験剤(横軸)についてのインターフェロンγ誘導(縦軸)の評価の結果を示す。パネルA、B、およびCは、それぞれ、CD8細胞、CD4細胞、およびNK細胞に対する、「2xAla」で示されたアミノ酸置換E81A/F82Aを含むhIL12ムテイン、「3xAla」で示されたE81A/F82A/K106Aを含むhIL12ムテイン、および置換W37Aを含むhIL12ムテインと比較した野生型hIL12の効果を示す。パネルD、E、およびFは、それぞれ、CD8細胞、CD4細胞、およびNK細胞に対する、「2xAla Fc」で示されたアミノ酸置換E81A/F82Aを含むKiHヘテロ二量体hIL12Fcムテイン、「3xAla Fc」で示されたE81A/F82A/K106Aを含むKiHヘテロ二量体hIL12Fcムテイン、および置換W37Aを含むKiHヘテロ二量体hIL12Fcムテイン(W37A Fc)と比較した、hIL12を含むKiHヘテロ二量体hIL12FcムテインのIFNγ誘導の結果を示す。

【図２】図2は、CD8+T細胞(パネルA)、CD4+T細胞(パネルB)、ならびに2人の異なるヒトドナーに由来するNK細胞(パネルCおよびD)に対する、示された漸増濃度の試験剤についてのインターフェロン-γおよびSTAT4誘導(縦軸)の評価の結果を示す。

【図３】図3は、以下でさらに完全に説明されるMC38腫瘍モデル研究における様々なマウスIL12剤およびマウスIL12Fcムテインで処置したマウスの経時的な腫瘍体積のスパイダープロットを示す。腫瘍体積をY軸に示し、時間をX軸に示した。
【図４】図4は、以下でさらに完全に説明されるMC38腫瘍モデル研究における様々なマウスIL12剤およびマウスIL12Fcムテインで処置したマウスの経時的(x軸)な処置マウスの体重(y軸)を示す。
【図５】図5は、以下でさらに完全に説明されるMC38腫瘍モデル研究における様々なマウスIL12剤およびマウスIL12Fcムテインで処置したマウスの経時的(x軸)な処置マウスの生存データ(y軸上の生存の確率)を示す。
【図６】図6は、パネルAではmIL12タンパク質、パネルBではヘテロ二量体Fc形式のIL12タンパク質サブユニットによる、処置を開始した後の日数(x軸)に対する腫瘍体積(y軸)についてのデータを示す。
【図７】図7は、強調したシグナルペプチド配列を有する野生型マウスおよびヒトp40(IL12Ra)タンパク質のアミノ酸配列アラインメントを示す。
【図８】図8は、野生型マウスおよびヒトp35(IL12Rb)タンパク質のアミノ酸配列アラインメントを示す。
【図９】図9は、MC38腫瘍モデルにおいて経時的(x軸)に採取した血液試料から入手した血清中で測定したピコグラム/ミリリットル(pg/mL)単位のマウスインターフェロンγの濃度(y軸)のグラフ表示を示す。このデザインを表12に示した。パネルAは、0時間(処置前)、ならびに試験剤で処置して4時間後、1日後、および7日後の、表12の処置群A～Eの血清中にあるピコグラム/ミリリットル(pg/mL)単位のマウスインターフェロンγの濃度を示す。パネルBは、0時間(処置前)、ならびに試験剤で処置して4時間後、1日後、および7日後の、表12の処置群F、G、およびHの血清中にあるマウスインターフェロンγのレベルに関する。
【図１０】図10は、脾臓および腫瘍組織における、表12の処置群(x軸)のそれぞれについて、FACS分析によって決定したリンパ球のパーセント(y軸)のグラフ表示である。
【図１１】図11は、表12に記載の処置群および研究における脾臓から入手したNK細胞の表現型FACS分析の結果を示す。T-betを縦軸に測定し、細胞内グランザイムBを横軸に測定した。グラフに処置群(表12のA、F、G、およびH)を表示した。
【図１２】図12は、本明細書に記載のCT26腫瘍研究から得られた一連のスパイダープロットを示す。腫瘍体積を縦軸に示し、時間(研究日)を横軸に示した。図のそれぞれのパネルは、表13に示した研究デザインに従う提供された試験剤と試験剤の投与計画を示す。
【図１３】図13は、CT26腫瘍研究において評価したマウスの体重測定の結果を示す。体重のパーセント変化を縦軸に示し、時間(研究日)を横軸に示した。
【図１４】図14は、矢印で示した様々なマーカーの存在と、図の説明文によって示した様々な用量の試験剤によって選別した、CT26腫瘍研究研究から入手した細胞のFACS分析の結果を示す。
【図１５】図15は、表14にまとめた研究におけるNK細胞枯渇に応答した、図の説明文によって示した様々な試験剤の効力の結果を示す。
【図１６】図16は、本明細書において詳述されるようにNKおよびCD8細胞枯渇の効果を評価するためのMC38腫瘍研究において提供された様々な試験剤条件に応答した、研究の過程(横軸)を通じた体重のパーセント変化(縦軸)の評価の結果を示す。この研究デザインを表15にまとめた。
【図１７】図17は、表15において特定される様々な試験条件に応答した、研究の過程(横軸)を通じた抗腫瘍効力(縦軸に腫瘍体積)についての一連のスパイダープロットを示す。
【図１８】図18は、様々なタイプのマウス、1番目の縦列の2つの図ではB6マウス、2番目の縦列の2つの図ではRAG2ノックアウトマウス、3番目の縦列ではRAG2/CD132二重ノックアウトマウスにおけるMC38腫瘍に対するIL12試験剤の抗腫瘍効力の結果を示す。研究の過程(横軸)を通じた腫瘍体積を縦軸に示した。図の説明文は、表15に示した様々な試験条件を特定する。

【図１９】図19は、マウス中のＭＣ38腫瘍を処置した際の、ＰＤ1インヒビターと組み合わせたヘテロ二量体mIL12 Fc p40Mポリペプチドの抗腫瘍効力を評価した研究の結果を示す。研究の過程(横軸)を通じた腫瘍体積を縦軸に示した。図の説明文は、本明細書中の表16にまとめた処置群に対応する。
【図２０】図20は、マウス中のＭＣ38腫瘍を処置した際の、mIL2ムテインポリペプチドと組み合わせたヘテロ二量体mIL12 Fc p40Mポリペプチドの抗腫瘍効力を評価した研究の結果を示す。研究の過程(横軸)を通じた腫瘍体積を縦軸に示した。図の説明文は、本明細書中の表17にまとめた処置群に対応する。
【発明を実施するための形態】
【００６７】
発明の詳細な説明
本開示の理解をさらに容易にするために、ある特定の用語および句が以下で、ならびに本明細書全体を通して定義される。本明細書において示される定義は非限定的であり、当業者の知識を考慮して解釈しなければならない。
【００６８】
本方法および組成物を説明する前に、本発明は、説明される特定の方法または組成物に限定されず、従って、もちろん、変化してもよいことを理解すべきである。本明細書において使用される専門用語は態様を説明する目的のためのみのものであり、限定を意図するものではないことも、理解すべきである。
【００６９】
値の範囲が定められている場合、その範囲の上限と下限との間の、間のそれぞれの値も、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り、下限の単位の1/10まで、詳細に開示されることが理解される。述べられた範囲内の任意の述べられた値または間の値と、その述べられた範囲内の他の任意の述べられた値または間の値との間のそれぞれの狭い範囲が本発明に包含される。これらの狭い範囲の上限および下限は独立してこの範囲に含まれても、排除されてもよく、狭い範囲において一方の限界を含む、またはいずれの限界も含まない、または両方の限界を含む、それぞれの範囲も、述べられた範囲においてはっきり限定して排除される任意の限界に応じて本発明に包含される。述べられた範囲が限界の一方または両方を含む場合、含まれる限界のいずれかまたは両方を排除する範囲も本発明に含まれる。
【００７０】
特に定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載の方法および材料に類似する、または等価な任意の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、いくつかの可能性のある、かつ好ましい方法および材料を今から説明する。本明細書において言及される全ての刊行物、特許、公開特許出願、GenBankアクセッション番号、およびUniProt参照番号は、引用された刊行物に記載されている方法および/または材料を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる。
【００７１】
本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り複数の指示物を含むことに留意しなければならない。従って、例えば、「1個の細胞」についての言及は複数のこのような細胞を含み、「そのペプチド」についての言及は、1個または複数のペプチドおよび当業者に公知のその等価物、例えば、ポリペプチドなどについての言及を含む。
【００７２】
本明細書において議論される刊行物は、本願の出願日前の刊行物の開示のためだけに提供される。本明細書から、先行発明によって本発明がこのような刊行物に先行する権利がないことが認められると解釈してはならない。さらに、提供された刊行物の日付は実際の

発行日とは異なることがあり、実際の発行日を別途に確認する必要がある場合がある。本明細書において引用される刊行物およびそれらが引用される目的となった資料は、その全文が参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

【００７３】

特に定めのない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏(℃)であり、圧力は大気圧であるか、または大気圧に近い。以下を含む標準的な略語が用いられる:bp=塩基対;kb=キロベース;pl=ピコリットル;sまたはsec=秒;min=分;hまたはhr=時間;AAまたはaa=アミノ酸;kb=キロベース;nt=ヌクレオチド;pg=ピコグラム;ng=ナノグラム;μg=マイクログラム;mg=ミリグラム;g=グラム;kg=キログラム;dlまたはdL=デシリットル;μlまたはμL=マイクロリットル;mlまたはmL=ミリリットル;lまたはL=リットル;μM=マイクロモル濃度;mM=ミリモル濃度;M=モル濃度;kDa=キロダルトン;i.m.=筋肉内(筋肉内に);i.p.=腹腔内(腹腔内に);SCまたはSQ=皮下(皮下に);QD=1日1回;BID=1日2回;QW=週1回;QM=月1回;HPLC=高速液体クロマトグラフィー;BW=体重;U=ユニット;ns=統計的に有意でない;PBS=リン酸緩衝食塩水;PCR=ポリメラーゼ連鎖反応;HSA=ヒト血清アルブミン;MSA=マウス血清アルブミン;DMEM=ダルベッコ変法イーグル培地;EDTA=エチレンジアミン四酢酸。

【００７４】

本開示全体を通して、アミノ酸は一文字表記または三文字表記に従って言及されると理解されよう。読者の便宜を図って、アミノ酸の一文字表記および三文字表記を表1に示した。

【００７５】

（表１）天然アミノ酸および略称

アミノ酸	1文字略称	3文字略称
グリシン	G	Gly
プロリン	P	Pro
アラニン	A	Ala
バリン	V	Val
ロイシン	L	Leu
イソロイシン	I	Ile
メチオニン	M	Met
システイン	C	Cys
フェニルアラニン	F	Phe
チロシン	Y	Tyr
トリプトファン	W	Trp
ヒスチジン	H	His
リジン	K	Lys
アルギニン	R	Arg
グルタミン	Q	Gln
アスパラギン	N	Asn
グルタミン酸	E	Glu
アスパラギン酸	D	Asp
セリン	S	Ser
スレオニン	T	Thr

【００７６】

分子生物学における標準的な方法が科学文献に記載されている(例えば、Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;およびAusubel, et al. (2001) Curre

nt Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y. を参照されたい。これらは、細菌細胞におけるクローニングおよびDNA変異誘発(第1巻)、哺乳動物細胞および酵母におけるクローニング(第2巻)、グリココンジュゲートおよびタンパク質発現(第3巻)、ならびにバイオインフォマティクス(第4巻)について述べている)。科学文献は、免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、および結晶化、ならびに化学分析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の生成、およびタンパク質のグリコシル化を含むタンパク質精製方法について説明する(例えば、Coligan, et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vols. 1-2, John Wiley and Sons, Inc., NYを参照されたい)。

【００７７】

アミノ酸置換および欠失の命名法

本開示は、野生型または親ポリペプチドと比べてアミノ酸置換を含むバリアントポリペプチドを提供する。置換、欠失、または挿入を指すために本明細書において以下の命名法が用いられる。本明細書において残基は、野生型分子中で見出される天然アミノ酸の一文字アミノ酸コードまたは三文字アミノ酸コードによって指定されることがある。

【００７８】

P19残基の番号付け:

本開示において、ヒトP19のアミノ酸残基の番号付けは、SEQ ID NO:177に示されるhP19の「プロ」型の数を基準として付けられている。

【００７９】

P35残基の番号付け:

本開示において、ヒトP35のアミノ酸残基の番号付けは、SEQ ID NO:1に示されるhP35の「プロ」型の数を基準として付けられている。

【００８０】

P40残基の番号付け:

本開示において、ヒトP40のアミノ酸残基の番号は、(SEQ ID NO:3)に示されるhP40の「プロ」型の数を基準として付けられている。hP40ムテインを基準として、本明細書中において置換は一文字アミノ酸コードに続いて、プロhp40(SEQ ID NO:3)アミノ酸位置に続いて、置換された一文字アミノ酸コードによって指定される。例えば、改変「E81A」を有するhp40ムテインは、この位置において、(SEQ ID NO:3)の位置81にあるグルタミン酸(E)残基がアラニン(A)残基で置換されていることを指す。アミノ酸残基の欠失は「des」または記号「Δ」に続いてアミノ酸残基およびその位置で示される。

【００８１】

免疫グロブリン、上部ヒンジ、およびFc残基の番号付け:

Kabatナンバリング、Chothiaナンバリング、EUナンバリング、およびIMGTナンバリング規則を含む、免疫グロブリンのアミノ酸残基の番号付けに関して使用される様々な番号付けの規則がある。本開示の文脈において、上部ヒンジおよびFcドメイン(下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含む)を含む、免疫グロブリン分子のドメインを含む免疫グロブリン分子のアミノ酸残基の番号付けはEUナンバリング規約に従って付けられている。本明細書において使用するEUナンバリングからKabatナンバリング、Chothiaナンバリング、またはIMGTナンバリング規約への変換は当業者によって容易に理解される。Dondelinger, et al. (2018) Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition Frontiers in Immunology Volume 9 Article #:2278。

【００８２】

さらに、本明細書において、ある特定の場合では、ポリペプチドを、シグナルペプチドを含有する前駆体分子と区別する目的で、このような配列を、シグナル配列を欠いている「成熟」分子として識別するために、ポリペプチド番号に接尾語「M」が加えられる場合がある(例えば、DR1535M)。この前駆体型はDR1535Pのように接尾語「P」によって識別されることがある。

【００８３】

定義

特に定めのない限り、以下の用語は、以下に示された意味を有することが意図される。他の用語は本明細書全体を通して他の箇所で定義される。

【００８４】

「約」という用語は、本明細書に記載の数値のプラスまたはマイナス１０％、例えば、本明細書に記載の数値のプラスまたはマイナス１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、または１０％である値を指す。「約」という用語はまた、本明細書に記載の全ての数値範囲にも適用される。「約」という用語が、ある特定の値に関して明示的に列挙されていても、列挙されていなくても、本明細書に記載の全ての値が「約」という用語によって修飾されると理解される。

【００８５】

活性化する:

本明細書で使用する「活性化する」という用語は、受容体または受容体複合体について、直接的に、および/またはアゴニストリガンドと、リガンド結合に応答する受容体との結合から生じた多成分シグナル伝達カスケードへの関与によって生物学的効果を反映するために用いられる。活性化するという用語はまた、このような受容体に対するリガンドの結合に応答して、細胞のもう1つの生物学的活性が調整される(例えば、ＳＴＡＴ４シグナル伝達のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション)、受容体を発現する細胞について用いられる。

【００８６】

活性:

本明細書で使用する「活性」という用語は、分子について、試験系(例えば、アッセイ)に関する分子の特性、あるいは材料もしくは細胞の生物学的性質もしくは化学的性質(例えば、分子と別の分子の結合の程度)または物理的性質(例えば、細胞膜電位の改変)を説明するために用いられる。このような生物学的機能の例には、生物学的剤の触媒活性、細胞内シグナル伝達、遺伝子発現、細胞増殖を刺激する能力、および、炎症応答などの免疫学的活性を調整する能力が含まれるが、これに限定されない。「活性」は、典型的に、試験剤の単位あたりの生物学的活性レベル、例えば、[触媒活性]/[ｍｇタンパク質]、[免疫学的活性]/[ｍｇタンパク質]、活性の国際単位(ＩＵ)、[ＳＴＡＴ３リン酸化]/[ｍｇタンパク質]、[ＳＴＡＴ４リン酸化]/[ｍｇタンパク質]、[増殖]/[ｍｇタンパク質]、プラーク形成単位(ｐｆｕ)などで表される。本明細書で使用する増殖活性という用語は、調節不全になった細胞分裂、例えば、新生物疾患、炎症性疾患、線維症、異形成、細胞トランスフォーメーション、転移、および血管形成において観察される、調節不全になった細胞分裂を含む、細胞増殖および複製を促進する活性を指す。

【００８７】

投与する/投与:

「投与」および「投与する」という用語は、インビトロ、インビボ、またはエクスビボで対象の細胞、組織、臓器、または生物学的液体を、剤(例えば、改変されたｈＩＬ-１２ｐ４０ポリペプチド、ヘテロ二量体ｈＩＬ１２Ｆｃムテインを含むｈＩＬ-１２ムテイン、または改変されたｈＩＬ-１２ｐ４０ポリペプチドを含むｈＩＬ-２３ムテイン；改変されたｈＩＬ-１２ｐ４０ポリペプチドを発現する操作された細胞、改変されたｈＩＬ-１２ｐ４０ポリペプチドを含むｈＩＬ-１２ムテインを発現する操作された細胞、または改変されたｈＩＬ-１２ｐ４０ポリペプチドを含むｈＩＬ-２３ムテインを発現する操作された細胞；あるいは、化学療法剤、抗体、または前述の1つもしくは複数を含む薬学的製剤)と、単独でのまたは1つもしくは複数の補助剤と組み合わせての接触を含む、対象に接触する行為を指すために本明細書において互換的に用いられる。剤の投与は、局部投与、血管内注射(静脈内注入または動脈内注入を含む)、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、頭蓋内注射、腫瘍内注射、経皮送達、経粘膜送達、イオントフォレーシス送達、リンパ内注射、胃内注入、前立腺内注射、膀胱内注入(例えば、膀胱)、吸入(例えば、ドライパウダー吸入器を含む呼吸器用吸入器)、眼内注射

、腹腔内注射、病巣内注射、卵巣内注射、脳内注入または脳内注射、脳室内注射(ICVI)などを含むが、これに限定されない、当技術分野において認められている様々な方法のどれでも成し遂げることができる。「投与」という用語は、剤と細胞、組織、または臓器との接触、ならびに剤と、細胞、組織、または臓器と接触している液体との接触を含む。

【００８８】

親和性:

本明細書で使用する「親和性」という用語は、第1の分子(例えば、リガンド)と第2の分子(例えば、受容体)との特異的結合の程度を指し、分子とその標的の解離速度定数(Koff)と、分子とその標的の会合速度定数(Kon)の比である平衡解離定数(KD)によって測定される。

【００８９】

アゴニスト:

本明細書で使用する「アゴニスト」という用語は、第2の剤(「標的」)に特異的に結合し、標的と相互作用して標的の活性化の増加を引き起こすか、または促進する第1の剤を指す。場合によっては、アゴニストは、細胞活性化を調整する、活性化を強化する、第2の剤による活性化に対する細胞の感受性を増加させる、あるいは細胞増殖または経路または細胞周期の改変をもたらす可能性のある1つもしくは複数の遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、生物学的経路、の発現をアップレギュレートする、受容体タンパク質のアクチベーターである。一部の態様では、アゴニストは、天然コグネイトリガンドとそのコグネイト受容体との相互作用の生物学的効果を模倣する生物学的応答において、そのコグネイト受容体に結合し、かつ、コグネイト受容体の状態を変える、コグネイトリガンドの改変型である。「アゴニスト」という用語は、部分的アゴニスト、完全アゴニスト、およびスーパーアゴニストを含む。アゴニストは、このようなアゴニストが、研究中の受容体によって誘導される実質的に完全な生物学的応答(すなわち、天然リガンド/受容体結合相互作用に関連する応答)につながる時に「完全アゴニスト」と呼ばれてもよく、部分的アゴニストと呼ばれてもよい。「スーパーアゴニスト」は、標的受容体に対して内因性アゴニストを超える最大応答を生じることができ、従って、ネイティブリガンドの100％超の活性を有するアゴニストの一種である。スーパーアゴニストは、典型的には、比較可能なアッセイにおいて類似濃度で評価された時、天然型分子の評価可能な定量パラメータまたは定性パラメータの応答の110％超、あるいは120％超、あるいは130％超、あるいは140％超、あるいは150％超、あるいは160％超、またはあるいは170％超を示す合成分子である。完全アゴニストに関連する生物学的効果は、程度および/または種類の点で、部分的アゴニストまたはスーパーアゴニストの生物学的効果と異なる場合があることに留意すべきである。アゴニストとは対照的に、アンタゴニストは受容体に特異的に結合し得るが、シグナルカスケード、典型的には、受容体によって始まるシグナルカスケードを引き起こさず、その受容体におけるアゴニスト作用を改変してもよい。インバースアゴニストは、アゴニストの薬理学的応答とは向きが逆の薬理学的応答を生じる剤である。

【００９０】

アンタゴニスト:

本明細書で使用する「アンタゴニスト」または「インヒビター」という用語は、アゴニストの作用に対抗する分子を指す。アンタゴニストはアゴニストの活性を阻止する、低減する、阻害する、または中和し、特定されたアゴニストがない場合でも、アンタゴニストは標的、例えば、標的受容体の構成的活性も阻止する、阻害する、または低減することもできる。インヒビターは、例えば、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、免疫チェックポイント経路を含む生物学的経路、または細胞の活性化を減少させる、ブロックする、阻止する、遅延するか、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、免疫チェックポイント経路を含む生物学的経路、または細胞を不活化する、脱感作する、またはダウンレギュレートする分子である。場合によっては、受容体への結合は維持されるが下流シグナル伝達は存在しないように、アンタゴニストが天然リガンドのムテインであることがある。

【００９１】

生物学的試料:
本明細書で使用する「生物学的試料」または「試料」という用語は、対象から得られた(または対象に由来する)試料を指す。例として、生物学的試料は、体液、血液、全血、血漿、血清、粘液分泌物、唾液、脳脊髄液(CSF)、気管支肺胞洗浄液(BALF)、眼の液体(例えば、硝子体液、眼房水)、リンパ液、リンパ節組織、脾臓組織、骨髄、腫瘍組織からなる群より選択される材料を、このような組織の1つまたは複数に由来する免疫グロブリンが濃縮された画分または細胞タイプ特異的な、濃縮された画分を含めて含む。
【００９２】
同等の:
本明細書で使用する「同等の」という用語は、評価可能な定量パラメータまたは定性パラメータの2つの測定値の違いの程度を説明するために用いられる。例えば、評価可能な定量パラメータの第1の測定値と、評価可能なパラメータの第2の測定値が、この状況で2つの結果の間で効果の統計的有意差を生じないと当業者が認識する範囲を超えて逸脱しない場合、2つの測定値は「同等」だとみなされるだろう。場合によっては、ある測定値が、別の測定値から35％未満、あるいは30％未満、あるいは25％未満、あるいは20％未満、あるいは15％未満、あるいは10％未満、あるいは7％未満、あるいは5％未満、あるいは4％未満、あるいは3％未満、あるいは2％未満、または1％未満逸脱すれば、測定値は「同等」だとみなされることがある。特定の態様では、ある測定値が標準品から15％未満、あるいは10％未満、またはあるいは5％未満逸脱すれば標準品と同等になる。
【００９３】
保存的アミノ酸置換:
本明細書で使用する「保存的アミノ酸置換」という用語は、ある特定のアミノ酸が、同様の生化学的特性(例えば、電荷、疎水性、およびサイズ)を有する別のアミノ酸に変化するアミノ酸交換を指す。例えば、以下の各グループにあるアミノ酸:(1)疎水性アミノ酸:アラニン、イソロイシン、ロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン、バリン、プロリン、およびグリシン;(2)極性アミノ酸:グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、チロシン、メチオニン、およびシステイン;(3)塩基性アミノ酸:リジン、およびアルギニン;ならびに(4)酸性アミノ酸:アスパラギン酸およびグルタミン酸は互いの保存的アミノ酸とみなされる。
【００９４】
～に対応する:
アミノ酸配列または核酸配列の文脈において本明細書で使用する「対応」または「～に対応する」という用語は、配列同一性のパーセントを最大にするように1つまたは複数の他の配列とアラインメントされた参照配列の同等の位置を指す。例えば、指定されたhIL-12p40ポリペプチドの「アミノ酸位置[X]に対応するアミノ酸位置」は、アラインメントに基づいた、構造的ホモログおよびバリアントを含む他のhIL-12p40ポリペプチドにおける同等の位置を指す。対応する位置は、参照、野生型、または親配列、例えば、SEQ ID NO:4の野生型成熟hp40アミノ酸配列に基づいてもよい。
【００９５】
～に由来する:
本明細書で使用する「～に由来する」という用語はアミノ酸配列または核酸の文脈では、ポリペプチドまたは核酸が、参照ポリペプチドまたは核酸の配列に基づいた配列を有することを示すために使用され、タンパク質または核酸を作製する供給源または方法に関して限定するものであることを目的としない。例として、「～に由来する」という用語は参照アミノ酸配列またはDNA配列のホモログまたはバリアントを含む。
【００９６】
有効濃度(EC):
本明細書で使用する「有効濃度」という用語またはその略称「EC」は、試験系において、ある特定のパラメータを変えるのに十分な量の剤濃度を指すために互換的に用いられる。略称「E」は、試験系が試験剤に暴露された時に、この試験系において観察された、

ある特定の生物学的効果の大きさを指す。応答の大きさが試験剤の濃度(「C」)の因子として表される場合、略称「EC」が用いられる。生物系の文脈では、Emaxという用語は、活性化試験剤の飽和濃度に応答して観察された、ある特定の生物学的効果の最大の大きさを指す。略称ECが下付き文字と共に示された場合(例えば、EC_{40}、EC_{50}など)、下付き文字は、この濃度で観察された、生物学的応答のEmaxのパーセントを指す。例えば、このような試験剤に応答した、このような測定可能な生物学的パラメータの最大レベルの30%である、試験系において測定可能な生物学的パラメータを誘導するのに十分な試験剤の濃度は、このような生物学的パラメータについて試験剤の「EC_{30}」と呼ばれる。同様に、「EC_{100}」という用語は、このような剤に応答して、測定可能なパラメータの最大(100%)応答をもたらす剤の有効濃度を示すのに用いられる。同様に、(薬物動力学の分野で一般的に用いられる)EC_{50}という用語は、測定可能なパラメータの最大半量(約50%)変化をもたらすのに十分な剤の濃度を指す。「飽和濃度」という用語は、温度および圧力の標準的な条件下で標準的な体積の特定の溶媒(例えば、水)に溶解することができる、試験剤の最大限の量を指す。薬物動力学では、薬物の飽和濃度は、典型的には、全ての利用可能な受容体が薬物によって占有されるような、薬物の十分な濃度を示すために用いられ、EC_{50}は、最大半量効果を生じる薬物濃度である。

【００９７】

濃縮された:

本明細書で使用する「濃縮された」という用語は、(a)関心対象の種が、出発試料、例えば、生物学的試料(例えば、分子が天然に存在する試料、もしくは投与後に存在する試料)中にある種の濃度よりも高い(例えば、少なくとも3倍、あるいは少なくとも5倍、あるいは少なくとも10倍、あるいは少なくとも50倍、あるいは少なくとも100倍、またはあるいは少なくとも1000倍の)濃度で、または(b)分子が作られた環境(例えば、組換えにより改変された細菌細胞もしくは哺乳動物細胞)よりも高い濃度で存在するように非天然に操作された、関心対象の種（例えば分子または細胞）を含む試料を指す。

【００９８】

細胞外ドメイン:

本明細書で使用する「細胞外ドメイン」という用語またはその略称「ECD」は、表面でそれが発現している細胞の原形質膜の外側にある細胞表面タンパク質の部分を指す。細胞表面タンパク質およびECDは、膜貫通タンパク質、細胞表面タンパク質、または、細胞膜に結合しているが細胞内ドメインを欠いているドメインを含む膜結合タンパク質でもよい。

【００９９】

同一性:

ポリペプチド配列またはDNA配列に関して本明細書で使用する「同一性」という用語は、2つの分子間のサブユニット配列同一性を指す。両分子のサブユニット位置が同じアミノ酸またはヌクレオチドによって占有される場合、この分子は、その位置で同一である。2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間の類似性は、同一の位置の数の一次関数である。一般的に、これらの配列は最高次数のマッチが得られるようにアラインメントされる。必要に応じて、同一性は、公開された技法と、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410およびAltschul, et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されているBLAST 2.0 アルゴリズムなどの広く利用可能なコンピュータプログラムを用いて計算することができる。BLAST解析を行うためのソフトウェアは米バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)のウェブサイトを通じて公的に入手することができる。このアルゴリズムは、最初に、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインメントした時に正の値の閾値スコア「T」にマッチまたは適合する、クエリー配列中の長さWの短いワードを特定することによって、高スコア配列対(high scoring sequence pair)(HSP)を特定することを伴う。Tは隣接ワードスコア閾値(neighborhood word score threshold)(Altschul et.al.,前出)と呼ばれる。これらの最初の隣接ワードヒットは、それ

らを含むさらに長いHSPsを発見する検索を開始するためのシードとして働く。次いで、このワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加する限り、それぞれの配列に沿って両方向に延長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列の場合、パラメータ「M」(一対のマッチ残基のリワードスコア;常に、〉0)および「N」(ミスマッチ残基のペナルティースコア;常に、〈0)を用いて計算される。アミノ酸配列の場合、累積スコアを計算するためにスコアリング行列が用いられる。(a)累積アラインメントスコアが、その達成される最大値から量Xだけ減少した時に;1つもしくは複数の負のスコアの残基アラインメントの蓄積のために累積スコアが0もしくはそれ以下になった時に;または(b)いずれかの配列の端部に到達した時に、各方向でのワードヒットの延長は止まる。BLASTアルゴリズムパラメータ「W」、「T」、および「X」はアラインメントの感度と速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列の場合)は同じように機能するが、デフォルトとして、28のワードサイズ(「W」)、10の期待値(「E」)、M=1、N=-2、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワードサイズ(W)、10の期待値(E)、およびBLOSUM62スコアリング行列(Henikoff & Henikoff, (1989) PNAS(USA) 89:10915-10919を参照のこと)を使用する。

【０１００】

応答をもたらすのに十分な量で:

本明細書で使用する「応答を引き起こすのに十分な量で」という句は、試験剤を試験系に適用する前に測定された指標のレベル(例えば、ベースラインレベル)と、適用した後に測定された指標のレベルの検出可能な変化をもたらすのに十分な剤の量に関して用いられる。一部の態様では、試験系は、細胞、組織、または生物である。一部の態様では、試験系は、蛍光アッセイなどのインビトロ試験系である。一部の態様では、試験系は、試験剤を細胞、組織、または生物に適用する前の生物学的機能と、適用した後の生物学的機能を反映する、細胞、組織、または生物のパラメータレベルの変化の測定を伴うインビボ系である。一部の態様では、指標は、ある量の試験剤の投与に応答した、アッセイにおいて評価された細胞の生物学的機能または発達状態を反映する。一部の態様では、試験系は、1種または複数種の試験剤を細胞、組織、または生物に適用する前の生物学的状態と、適用した後の生物学的状態を反映する細胞、組織、または生物の指標レベル変化の測定を伴う。「応答をもたらすのに十分な量で」という用語は治療有効量で十分な場合があるが、治療有効量よりも多くてもよく、少なくてもよい。

【０１０１】

処置を必要とする:

本明細書で使用する「処置を必要とする」という用語は、対象が必要とするか、または処置から潜在的に利益を得る、対象に対して医師または他の介護者が下した判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の範囲内にある様々な要因に基づいて下される。一部の態様では、処置を必要とする対象は、疾患または状態、例えば、癌、自己免疫性障害、または感染症と診断されたことがある。

【０１０２】

予防を必要とする:

本明細書で使用する「予防を必要とする」という用語は、対象が必要とするか、または予防的ケアから潜在的に利益を得る、対象に対して医師または他の介護者が下した判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の範囲内にある様々な要因に基づいて下される。一部の態様では、予防とは、特定の疾患の開始を低減するか、未然に防ぐか、または遅延すること、あるいは、例えば、その疾患の処置後に、特定の疾患の再発を低減するか、未然に防ぐか、または遅延することを指す。再発は、必ずしも、疾患の治癒または軽快の後である必要はない。症状が無い期間の後に、例えば、癌、自己免疫疾患、または感染症に対する処置後の期間に、1つまたは複数の臨床症状が再出現することが十分条件である。

【０１０３】

インヒビター:

本明細書で使用する「インヒビター」という用語は、例えば、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、または細胞の活性化を減少させる、ブロックする、阻止する、遅延するか、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、または細胞を不活性化する、脱感作する、またはダウンレギュレートする分子を指す。インヒビターはまた、細胞または生物の構成的活性を低減する、ブロックする、または不活性化する分子と定義することもできる。

【０１０４】

細胞内ドメイン:

本明細書で使用する「細胞内ドメイン」という用語またはその略語「ICD」は、細胞の原形質膜の内側にある、細胞表面タンパク質(例えば、細胞表面受容体)の部分を指す。ICDを含む細胞表面タンパク質は、膜貫通タンパク質、細胞膜に結合するドメインを含むが細胞外ドメインを欠く細胞表面タンパク質または膜結合タンパク質でもよい。ICDは膜貫通タンパク質もしくは膜結合タンパク質の細胞質部分全体を含んでもよく、細胞内タンパク質を含んでもよい。細胞表面タンパク質は、膜貫通タンパク質、細胞膜に結合するドメインを含むが細胞内ドメインを欠く細胞表面タンパク質または膜結合タンパク質でもよい。

【０１０５】

単離された:

本明細書で使用する「単離された」という用語は、天然に存在するものであれば、天然に存在する環境とは異なる環境にある関心対象のポリペプチドに関して用いられる。「単離された」とは、関心対象のポリペプチドについて、かなり濃縮された、および/または関心対象のポリペプチドが部分的もしくは実質的に精製されている、試料中のポリペプチドを含むことが意図される。ポリペプチドが天然でない場合、「単離された」とは、ポリペプチドが、合成された環境から分離されていること、例えば、ポリペプチドを発現するように操作された細胞を含む組換え細胞培養物から単離されていること、または固相合成手段に起因する溶液によって単離されていることを示している。

【０１０６】

リガンド:

本明細書で使用する「リガンド」という用語は、受容体に特異的に結合し、受容体の活性、またはその受容体を発現する細胞の応答を変えるような変化を受容体に引き起こす分子を指す。一態様では、「リガンド」という用語は、受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして働くことができる分子またはその複合体を指す。リガンドと受容体の複合体は「リガンド-受容体複合体」と呼ばれる(例えば、およびhIL-12-hIL-12受容体複合体)。一部の例では、「コグネイトリガンド」および「コグネイト受容体」という用語は、天然リガンドと、このようなリガンドが天然の生物系において選択的結合を示す受容体を示すために用いられる。例えば、hIL-12はhIL-12受容体に対するコグネイトリガンドである。別の例では、hIL-23はhIL-23受容体に対するコグネイトリガンドである。

【０１０７】

改変された:

本明細書で使用する「改変された」という用語は、非改変親分子と比べて変化した構造をもつ分子、例えば、ポリペプチドを指す。改変されたポリペプチドは、典型的には、非改変親分子の1つまたは複数の活性または機能を保持している。例えば、改変されたIL-12 p40ポリペプチドは、ヘテロ二量体(すなわち、p35/p40複合体)の一部として、hIL-12受容体を発現している細胞においてhIL-12シグナル伝達を活性化することができるが、改変されていないポリペプチドと比べて改善された特性を有することができる。改変されたという用語は、親または野生型hIL-12に存在しないアミノ酸置換を含み、hIL-12 p40ポリペプチドのバリアントおよび変異体を含む。

【０１０８】

調整する:

本明細書で使用する「調整する」、「調整」などという用語は、剤、例えば、試験剤が、生物系を含む系または生化学的経路においてプラスもしくはマイナスの応答を引き起こ

すことができるか、または直接的もしくは間接的に応答を引き起こすことができることを指す。モジュレーターという用語は、アゴニスト(部分的アゴニスト、完全アゴニスト、およびスーパーアゴニストを含む)とアンタゴニストを両方とも含む。

【０１０９】

ムテイン:

本明細書で使用する「ムテイン」という用語は、野生型ポリペプチドの一次構造(すなわち、アミノ酸配列)に対する改変を含む、このようなポリペプチドの改変バージョンを指すために用いられる。ムテインという用語は、ポリペプチドそれ自体、ポリペプチドを含む組成物、またはポリペプチドをコードする核酸配列を指すことがある。ムテインは、親ポリペプチドに対して少なくとも約９９％同一でもよく、あるいは少なくとも約９８％同一でもよく、あるいは少なくとも約９７％同一でもよく、あるいは少なくとも約９６％同一でもよく、あるいは少なくとも約９５％同一でもよく、あるいは少なくとも約９４％同一でもよく、あるいは少なくとも約９３％同一でもよく、あるいは少なくとも約９２％同一でもよく、あるいは少なくとも約９１％同一でもよく、またはあるいは少なくとも約９０％同一でもよい。場合によっては、本明細書で使用される時に、組成物はｈＰ４０ムテインを含み、ｈＰ４０は、ｗｔｈＰ４０(ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４)に対して少なくとも約９９％同一の、あるいは少なくとも約９８％同一の、あるいは少なくとも約９７％同一の、あるいは少なくとも約９６％同一の、あるいは少なくとも約９５％同一の、あるいは少なくとも約９４％同一の、あるいは少なくとも約９３％同一の、あるいは少なくとも約９２％同一の、あるいは少なくとも約９１％同一の、またはあるいは少なくとも約９０％同一のアミノ酸配列を含む。本明細書で使用する「ムテイン」という用語は、天然のｈＩＬ-１２(すなわち、ｐ３５/ｐ４０複合体)またはｈＩＬ-２３(すなわち、ｐ１９/ｐ４０複合体)のバリアント、すなわち、ｈＰ４０ムテインを含む、供給源となった親の天然ヘテロ二量体ｈＩＬ-１２またはｈＩＬ-２３の１つまたは複数の生物学的活性を保持しているヘテロ二量体を指す。

【０１１０】

核酸:

「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」などという用語は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態、またはその類似体を指すために本明細書において互換的に用いられる。ポリヌクレオチドの非限定的な例には、直鎖核酸および環状核酸、メッセンジャーＲＮＡ(ｍＲＮＡ)、相補的ＤＮＡ(ｃＤＮＡ)、組換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、プライマーなどが含まれる。

【０１１１】

機能的に連結された:

「機能的に連結された」という用語は、成分分子の機能のそれぞれが保持されるように構築物内で並べられている分子、典型的にはポリペプチドまたは核酸の間の関係性を指すために本明細書において用いられるが、機能的に連結されることで構築物の個々の成分の活性をプラスまたはマイナスに調整することができる。例えば、ポリエチレングリコール(ＰＥＧ)分子を野生型タンパク質に機能的に連結すると、そのタンパク質の生物学的活性(例えば、Ｅｍａｘ)が野生型分子に対して減少した構築物が得られる可能性がある。しかしながら、それにもかかわらず2つは機能的に連結されているとみなされる。「機能的に連結された」という用語が、異なる機能をコードする複数の核酸配列の関係性に適用される時、複数の核酸配列が組み合わされて1本の核酸分子になった時に、例えば、この核酸分子が組換え技術を用いて細胞に導入された時に、細胞内で特定の核酸配列を転写および/または翻訳することができる核酸を提供する。例えば、ポリペプチドの分泌を容易にするシグナル配列をコードする核酸配列がプレタンパク質を発現するのであれば、ポリペプチドをコードするＤＮＡに機能的に連結されているとみなされ得る。プロモーターまたはエンハンサーが配列の転写に影響を及ぼすのであればコード配列に機能的に連結されているとみなされる。または、リボソーム結合部位が翻訳を容易にするように配置されているのであれば、コード配列に機能的に連結されているとみなされる。概して、核酸分子の文脈

では、「機能的に連結された」という用語は、連結されている核酸配列は連続しており、分子の分泌リーダーまたは結合されたサブドメインの場合では連続しており、かつリーディングフェーズ(reading phase)にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーなどの、ある特定の遺伝因子は、これらが効果をもたらす配列から離れて機能することがあり、その配列に対して連続している必要はないが、それにもかかわらず機能的に連結されているとみなされ得る。

【０１１２】

親ポリペプチド:

本明細書で使用する「親ポリペプチド」または「親タンパク質」という用語は、第1の「親」ポリペプチドに対して改変されている第2のポリペプチド(例えば、誘導体、変異体またはバリアント)の供給源を指定するために互換的に用いられる。場合によっては、親ポリペプチドは野生型または天然型のタンパク質である。場合によっては、親ポリペプチドは、さらに改変された、天然タンパク質の改変型でもよい。「親ポリペプチド」という用語は、ポリペプチドそのもの、または親ポリペプチド(例えば、グリコシル化型もしくはPEG化型および/または親ポリペプチドを含む融合タンパク質)を含む組成物を指すことがある。親ポリペプチドという用語はまた、「参照ポリペプチド」と互換的に用いられる。

【０１１３】

部分的アゴニスト:

本明細書で使用する「部分的アゴニスト」という用語は、ある特定の受容体に特異的に結合し、活性化するが、完全アゴニストと比べて該受容体の部分的活性化しか有さない、分子(例えば、リガンド)を指す。部分的アゴニストはアゴニスト作用とアンタゴニスト作用を両方とも示すことがある。例えば、完全アゴニストと部分的アゴニストが両方とも存在する時に、部分的アゴニストは、受容体結合において完全アゴニストと競合し、その結果として、部分的アゴニストの非存在下での受容体と完全アゴニストとの接触と比べて受容体活性化を純減少させることによって競合的アンタゴニストとして作用する。不十分な量の内因性リガンドが存在する時に、部分的アゴニストは、対象において望ましい最大下応答を生じるように受容体を活性化するのに使用することができる。または、過剰量の内因性リガンドが存在する時に、部分的アゴニストは受容体の過剰刺激を低減することができる。部分的アゴニストによって生じる最大応答(E_{max})は、その固有活性と呼ばれ、完全アゴニストが100%の応答を生じた場合のパーセントスケールで表されることがある。部分的アゴニストは、ある特定のアッセイ系において類似濃度で評価された時、参照ポリペプチドの活性の10%超であるが100%未満、あるいは20%超であるが100%未満、あるいは30%超であるが100%未満、あるいは40%超であるが100%未満、あるいは50%超であるが100%未満、あるいは60%超であるが100%未満、あるいは70%超であるが100%未満、あるいは80%超であるが100%未満、またはあるいは90%超であるが100%未満を有してもよい。

【０１１４】

ポリペプチド:

本明細書で使用する「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は本明細書において互換的に用いられ、遺伝暗号で指定されたアミノ酸および遺伝暗号で指定されないアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸、ならびに修飾されたポリペプチドバックボーンを有するポリペプチドを含むことができる任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。ポリペプチドという用語には、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質;異種リーダー配列および同種リーダー配列を有する融合タンパク質;N末メチオニン残基を有するか、または有さない融合タンパク質;キレート化ペプチドなどの精製を容易にするアミノ酸配列を有する融合タンパク質;免疫学的にタグ化されたタンパク質を有する融合タンパク質;免疫学的に活性のあるポリペプチド断片(例えば、抗原性ジフテリアまたは破傷風毒素またはトキソイド断片)を有するペプチドを含む融合タンパク質などを含むがこれに限定されない、融合タンパク質が含まれる。

【０１１５】
予防する:
本明細書で使用する「予防する」、「予防する工程」、「予防」などという用語は、一時的または恒久的に、(例えば、臨床症状の非存在によって判定される)疾患、障害、状態などを発症する対象のリスクを予防する、抑制する、阻害する、もしくは低減するか、または疾患、障害、状態などの発生を遅延するように、疾患、障害、状態、またはその症状の発生前に対象に対して始められる行動方針を指す。対象において疾患、障害、または状態を予防するための行動方針は、典型的には、特定の疾患、障害、または状態を発症する遺伝的要因、経験的要因、または環境要因のために疾患、障害、または状態を発症する素因のある対象の状況において適用される。ある特定の場合では、「予防する」、「予防する工程」、「予防」という用語はまた、疾患、障害、または状態が既存の状態から、もっと有害な状態に進行するのを遅らせることも指すために用いられる。
【０１１６】
受容体:
本明細書で使用する「受容体」という用語は、リガンドに特異的に結合するドメインを有するポリペプチドであって、リガンドが結合するとポリペプチドの少なくとも1つの生物学的特性が変化するポリペプチドを指す。一部の態様では、受容体は、細胞外ドメイン(ECD)と、細胞表面にECDを固定するのに役立つ膜結合ドメインを含む細胞膜結合タンパク質である。細胞表面受容体の一部の態様では、受容体は、細胞内ドメイン(ICD)と細胞外ドメイン(ECD)が、膜貫通ドメイン(TM)と呼ばれる細胞膜貫通ドメインによって連結された膜貫通ポリペプチドである。リガンドと受容体が結合すると受容体のコンホメーション変化が起こり、その結果として、測定可能な生物学的効果が生じる。場合によっては、受容体が、ECD、TM、およびICDを含む膜貫通ポリペプチドである場合、リガンドとECDが結合すると、リガンドとECDとの結合に応答して、ICDの1つまたは複数のドメインによって媒介される測定可能な細胞内生物学的効果が生じる。一部の態様では、受容体は、細胞内シグナル伝達を容易にするための多成分複合体の成分である。例えば、リガンドは、単独では、どの細胞内シグナル伝達にも関連しないが、リガンドが結合するとヘテロ多量体(ヘテロ二量体、ヘテロ三量体などを含む)またはホモ多量体(ホモ二量体、ホモ三量体、ホモ四量体などを含む)複合体の形成を促進し、その結果として細胞内で測定可能な生物学的効果、例えば、細胞内シグナル伝達カスケード(例えば、Jak/STAT経路)を活性化する細胞表面受容体に結合することがある。一部の態様では、受容体は、ECD、TMおよびICDドメインを含む膜貫通単鎖ポリペプチドであり、ECD、TM、およびICDドメインは、同じ、または異なる天然受容体バリアントまたはその合成機能的等価物に由来する。
【０１１７】
組換え:
本明細書で使用する「組換え」という用語は、組換えDNA技術を用いてポリペプチド、核酸、または細胞が改変された方法を指す形容詞として用いられる。「組換えタンパク質」とは、組換えDNA技術を用いて産生されたタンパク質であり、タンパク質が産生された方法を示すために、タンパク質名の前にある小文字の「r」を用いて略される(例えば、組換えにより産生されたヒト成長ホルモンは、通常、「rhGH」と略される)。同様に、細胞は、組換えDNA技術を用いた外因性核酸(例えば、ssDNA、dsDNA、ssRNA、dsRNA、mRNA、ウイルスベクターベクターまたは非ウイルスベクター、プラスミド、コスミドなど)の組み込み(例えば、トランスフェクション、形質導入、感染)によって改変されていれば「組換え細胞」と呼ばれる。組換えDNA技術のための技法およびプロトコール、例えば、Sambrook, et al.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)および他の標準的な分子生物学の実験マニュアルに見られる技法およびプロトコールは当技術分野において周知である。
【０１１８】

応答:
例えば、細胞、組織、臓器、または生物の「応答」という用語は、評価可能な生化学的パラメータまたは生理学的パラメータ(例えば、濃度、密度、接着、増殖、活性化、リン酸化、遊走、酵素活性、遺伝子発現レベル、遺伝子発現速度、エネルギー消費速度、分化のレベルまたは状態)の量的変化または質的変化を包含し、この変化は、外因性作用物質もしくは遺伝プログラミングなどの内部機構による活性化、刺激、もしくは処理、または外因性作用物質もしくは遺伝プログラミングなどの内部機構との接触と相関関係がある。ある特定の状況では、「活性化」、「刺激」などという用語は、内部機構によって調節されるような、ならびに外部要因または環境要因によって調節されるような細胞活性化を指すのに対して、「阻害」、「ダウンレギュレーション」などという用語は反対の作用を指す。「応答」は、インビトロで、例えば、アッセイ系、表面プラズモン共鳴、酵素活性、質量分光法、アミノ酸またはタンパク質の配列決定技術を使用することによって評価されてもよい。「応答」は、インビボで、客観的な生理学的パラメータ、例えば、体温、体重、腫瘍量、血圧、X線または他の画像化技術の結果を評価することで量的に評価されてもよく、幸福、鬱状態、興奮、または疼痛の報告された主観的な感情の変化によって質的に評価されてもよい。一部の態様では、試験剤の投与に応答したT細胞活性化レベルは、フローサイトメトリー法によって決定される場合がある。一部の方法では、応答は、STAT(例えば、STAT3、STAT4)リン酸化、またはIFNγ産生のレベルを決定することによって、測定することができる。

【０１１９】

有意に低減した結合:
本明細書で使用する「有意に低減した結合を示す」という用語は、第1の分子の親形態と比べて、第2の分子(例えば、受容体)に対する親和性の有意な低減を示す第1の分子(例えば、リガンド)のバリアントに関して用いられる。バリアントリガンド、例えば、本明細書に記載されるバリアントhIL-12p40ポリペプチドまたはhIL-12ムテインに関して、ムテインが、バリアントリガンドが由来する親リガンドの20％未満、あるいは約10％未満、あるいは約8％未満、あるいは約6％未満、あるいは約4％未満、あるいは約2％未満、あるいは約1％未満、またはあるいは約0.5％未満の親和性で受容体に結合するのであれば、該バリアントリガンドは「有意に低減した結合を示す」。

【０１２０】

特異的に結合する:
本明細書で使用する「特異的に結合する」という用語は、第1の分子が第2の分子に対して示す親和性の程度を指す。結合ペア(例えば、リガンド/受容体)の文脈では、結合ペアの第1の分子が、試料中に存在する他の成分に有意な量で結合しない時には、結合ペアの第1の分子は結合ペアの第2の分子に特異的に結合するといわれる。第2の分子に対する第1の分子の親和性が、試料中に存在する他の成分に対する第1の分子の親和性の少なくとも2倍、あるいは少なくとも5倍、あるいは少なくとも10倍、あるいは少なくとも20倍、またはあるいは少なくとも100倍である時に、結合ペアの第1の分子は結合ペアの第2の分子に特異的に結合するといわれる。特異的結合は、競合ELISAアッセイ、放射性リガンド結合アッセイ(例えば、飽和結合、スキャッチャードプロット、ノンリニアカーブイフィッティングプログラム、および競合結合アッセイ);非放射性リガンド結合アッセイ(例えば、蛍光偏光(FP)、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET);液相リガンド結合アッセイ(例えば、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)、および免疫沈降);ならびに固相リガンド結合アッセイ(例えば、マルチウェルプレートアッセイ、オンビーズリガンド結合アッセイ、オンカラムリガンド結合アッセイ、およびフィルターアッセイ))、ならびに表面プラズモン共鳴アッセイを含むが、これに限定されない、当技術分野において公知の技法を用いて評価することができる(例えば、Drescher et al., (2009) Methods Mol Biol 493:323-343と、市販の計測装置、例えば、Biacore 8K、Biacore 8K+、Biacore S200、Biacore T200(Cytiva, 100 Results Way, Marlborough MA 01752)を参照されたい)。

【０１２１】
対象:
「レシピエント」、「個体」、「対象」、および「患者」という用語は本明細書において互換的に用いられ、診断、処置、または療法が望ましい任意の哺乳動物対象、特に、ヒトを指す。処置の目的で「哺乳動物」は、ヒト、飼育動物および家畜、および動物園、スポーツ、またはペット動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどを含む哺乳動物として分類される任意の動物を指す。一部の態様では、哺乳動物はヒトである。
【０１２２】
実質的に純粋な:
本明細書で使用する「実質的に純粋な」という用語は、組成物の一成分が、組成物の全含有量の約50％超、あるいは約60％超、あるいは約70％超、あるいは約80％超、あるいは約90％超、あるいは約95％超を構成することを示す。「実質的に純粋な」タンパク質は、組成物の全含有量の約50％超、あるいは約60％超、あるいは約70％超、あるいは約80％超、あるいは約90％超、あるいは約95％超を構成する。
【０１２３】
に罹患している:
本明細書で使用する「に罹患している」という用語は、対象が必要とするか、または処理から利益を得る、X線、CTスキャン、従来の診断臨床検査(例えば、血球数など)、ゲノムデータ、タンパク質発現データ、免疫組織化学を含むが、これに限定されない、疾患、障害、または状態を特定するための分野において受け入れられている入手可能な客観的情報または主観的情報に基づいて対象に対して医師が下した決定を指す。に罹患している、という用語は、典型的には、特定の疾患状態と組み合わせて用いられ、例えば、「新生物疾患に罹患している」とは、新生物が存在すると診断された対象を指す。
【０１２４】
T細胞:
本明細書で使用する「T細胞」(「T-cell」または「T cell」)という用語は、胸腺内で分化し、特異的な細胞表面抗原受容体を有し、細胞性免疫および体液性免疫の開始または抑制を制御するものも含み、抗原を有する細胞を溶解するものも含むリンパ球を指すために従来の意味で用いられる。一部の態様では、T細胞には、ナイーブ$CD8^+$T細胞、細胞傷害性$CD8^+$T細胞、ナイーブ$CD4^+$T細胞、ヘルパーT細胞、例えば、T_H1、T_H2、T_H9、T_H11、T_H22、T_{FH};調節性T細胞、例えば、T_R1、Treg、誘導性Treg;メモリーT細胞、例えば、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、NKT細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、ならびにCAR-T細胞、組換え改変TIL、およびTCR操作細胞を含むが、これに限定されない、このようなT-細胞の操作されたバリアントが含まれるが、それに限定されるわけではない。一部の態様では、T細胞は、IL12R細胞、IL12R+細胞、IL12R T細胞、またはIL12R+ T細胞)と互換的に言及される、IL12受容体を発現するT細胞である。
【０１２５】
末端(Terminus)/末(Terminal):
ポリペプチド構造の文脈において本明細書で使用する「N末端」(または「アミノ末端」)および「C末端」(または「カルボキシル末端」)は、それぞれ、ポリペプチドのアミノ最端部およびカルボキシル最端部を指す。これに対して、「N末」および「C末」という用語は、それぞれ、N末端およびC末端に対するポリペプチドアミノ酸配列中での相対位置を指し、それぞれ、N末端およびC末端にある残基を含んでもよい。「すぐN末側」とは、連続したポリペプチド配列中での第2のアミノ酸残基に対する第1のアミノ酸残基の位置を指し、第1のアミノ酸はポリペプチドのN末端に近い。「すぐC末側」とは、連続したポリペプチド配列中での第2のアミノ酸残基に対する第1のアミノ酸残基の位置を指し、第1のアミノ酸はポリペプチドのC末端に近い。核酸の文脈において本明細書で使用する「5'末端」(または「5'末端(five-prime terminus)」)および「3'末端」(また

は「カルボキシル末端」)は、それぞれ、核酸配列の末端を指すが、「5'」および「3'」という用語は、それぞれ、5'末端方向および3'末端方向へのポリペプチドの核酸配列中の相対位置を指し、それぞれ、5'末端および3'末端にある残基を含んでもよい。

【０１２６】

治療有効量:

本明細書で使用する「治療有効量」という句は、単一用量で単独で、または薬学的組成物もしくは処置レジメンの一部として、あるいは一連の用量の一部として対象に投与された時に、疾患、障害、または状態の任意の量的または質的な症状、側面、または特徴に対してプラスの効果をもたらす、剤の量を指す。治療有効量は、関連する生理学的効果を測定することによって確認することができ、投与計画と関連付けて、および対象の状態の診断分析に応答して調整されることがある。剤の治療的有効量を決定する評価のためのパラメータは、年齢、体重、性別、身体全体の健康、ＥＣＯＧスコア、観察可能な生理学的パラメータ、血中濃度、血圧、心電図、コンピュータ断層撮影法、Ｘ線などの特徴を含むが、これに限定されない当技術分野において受け入れられている診断基準を用いて医師によって決定される。代わりに、またはそれに加えて、治療的有効量の剤が対象に投与されたかどうか判定するために、臨床の場で一般的に評価される他のパラメータ、例えば、体温、心拍、血液化学の正常化、血圧の正常化、コレステロールレベルの正常化、または疾患、障害、もしくは状態の任意の症状、側面、もしくは特徴、バイオマーカー(例えば、炎症性サイトカイン、IFN-γ、グランザイムなど)、血清腫瘍マーカーの低下、固形癌効果判定基準(RECIST)の改善、免疫関連効果判定基準(irRC)の改善、生存期間の増加、無増悪生存期間の延長、無増悪期間の延長、治療成功期間の増加、無再発生存期間の延長、次治療開始までの期間(time to next treatment)の延長、客観的奏効率の改善、奏効期間の改善、腫瘍量の低下、完全寛解、部分寛解、安定病態などがモニタリングされることがあり、これらのパラメータは、剤投与に応答した対象状態の改善を評価するための分野の臨床家によって決まる。一態様では、治療有効量は、単独で用いられた時に、または別の剤と組み合わせて用いられた時に、疾患、障害、または状態の任意の量的または質的な症状、側面、または特徴に対してプラスの効果をもたらし、哺乳動物対象への剤投与の経過において不可逆的な重大な有害事象を生じない、剤の量である。

【０１２７】

処置する:

「処置する」、「処置すること」、「処置」などという用語は、対象が疾患、障害、もしくは状態、またはその症状に罹患しているという診断に応答して、対象に対して始められる行動方針(例えば、対象と、hIL-12ムテインを単独で、または補助剤と組み合わせて含む薬学的組成物との接触)を指し、行動方針は、(a)対象を苦しめている、このような疾患、障害、もしくは状態の根底にある原因;および/または(b)このような疾患、障害、もしくは状態と関連する症状の少なくとも1つの少なくとも1つを一時的または恒久的に排除する、低減する、抑制する、緩和する、または寛解させるように始められる。一部の態様では、処置することは、疾患に罹患している対象に対してとられる行動方針を含み、該行動方針が、対象における疾患の阻害をもたらす(例えば、疾患、障害、もしくは状態の発達が抑えられる)か、または対象における疾患の存在に関連する1つもしくは複数の症状を寛解させる。

【０１２８】

バリアント:

「バリアント」、「タンパク質バリアント」、または「バリアントタンパク質」、または「バリアントポリペプチド」という用語は、少なくとも1つのアミノ酸改変、置換、または欠失により親ポリペプチドと異なるポリペプチドを指すために本明細書において互換的に用いられる。親ポリペプチドは天然または野生型(ＷＴ)ポリペプチドでもよく、ＷＴポリペプチドの改変バージョンでもよい。バリアントポリペプチドという用語は、ポリペプチドそのもの、ポリペプチドを含む組成物、またはそれをコードする核酸配列を指すことがある。一部の態様では、バリアントポリペプチドは、親ポリペプチドと比較した約1

～約10、あるいは約1～約8、あるいは約1～約7、あるいは約1～約5、あるいは約1～約4、あるいは約1～約3、あるいは1～2個のアミノ酸の改変、置換、もしくは欠失、またはあるいは1個のアミノ酸アミノ酸の改変、置換、もしくは欠失を含む。バリアントは、バリアントが由来する親ポリペプチドに対して少なくとも約99%同一の、あるいは少なくとも約98%同一の、あるいは少なくとも約97%同一の、あるいは少なくとも約95%同一の、またはあるいは少なくとも約90%同一でもよい。

【0129】

野生型:

本明細書において「野生型」または「WT」または「ネイティブ」とは、対立遺伝子バリエーションを含む、天然で見出されるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を意味する。野生型タンパク質、ポリペプチド、抗体、免疫グロブリン、IgGなどは、人の手によって改変されていないアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を有する。

【0130】

個々の態様は、明瞭かつ簡潔にするために本明細書において個別に説明されており、非限定的に組み合わせることができると理解される。従って、どの組み合わせも個別かつ明示的に開示されるように、本開示は、本明細書に記載の態様の1つもしくは複数の組み合わせ、または全ての組み合わせを含む。どのサブコンビネーション(sub-combination)も個別かつ明示的に開示されるように、本開示が、本明細書に記載の態様の1つもしくは複数のサブコンビネーション、または全てのサブコンビネーションを含むように、このことは、本明細書において開示された態様の任意の、および全てのサブコンビネーションにも当てはまる。

【0131】

野生型hIL12:

野生型ヒトIL12(wt hIL12)は、2つの野生型サブユニット、hP40およびhP35を含む共有結合的にジスルフィド連結されたヘテロ二量体タンパク質である。hIL12の天然型は、p35の残基C96(SEQ ID NO:1に従って番号付けられた)とp40の残基C199(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)との間に鎖間ジスルフィド連結を含む。

【0132】

野生型ヒトP35:

野生型ヒトP35単量体(wt hP35)は、22アミノ酸シグナル配列を含む219アミノ酸プロタンパク質(SEQ ID NO:1)として発現され、22アミノ酸シグナル配列は翻訳後に除去されて197アミノ酸成熟タンパク質(SEQ ID NO:2)になる。野生型hP35(wt hP35)は、2つの鎖内ジスルフィド連結を、1つ目は残基C64とC196との間に、2つ目は残基C85とC123との間に含有する(SEQ ID NO:1に従って番号付けられた)。シグナル配列(下線)を有するヒトプロP35タンパク質の古典的アミノ酸配列(UniProt Reference No. P29459)は、

MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRA
VSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESC
LNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAK
LLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK
IKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 1)

である。22アミノ酸シグナル配列だけ足りない野生型ヒトP35(wt hP35)の成熟型は、

アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID
HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM
MALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL
MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSY
LNAS (SEQ ID NO:2)

を有する197アミノ酸成熟タンパク質として発現される。

【０１３３】

野生型ヒトP40:

野生型ヒトP40(wt hP40)は、22アミノ酸シグナル配列を含む328アミノ酸プロタンパク質(SEQ ID NO:3)として発現され、22アミノ酸シグナル配列は翻訳後に除去されて306アミノ酸成熟タンパク質(SEQ ID NO:4)になる。野生型hP40(wt hP40)は、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)残基C50とC90との間に、C131とC142との間に、C170とC193との間に、C300とC327との間に4つの鎖内ジスルフィドを含有する。シグナル配列(下線)を有するhP40プロタンパク質の古典的アミノ酸配列(UniProt Reference No. P29460)は、

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV
VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG
EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC
WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS
VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPK
NLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK
DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID
NO:3)

である。22アミノ酸シグナル配列だけ足りない野生型ヒトP40(wt hP40)の成熟型は306アミノ酸成熟タンパク質(SEQ ID NO:4)として発現される。

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL
GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDIL
KDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDP
QGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMV
DAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT
WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR
AQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO:4)

【０１３４】

IL12受容体:

IL12受容体はIL12Rβ1サブユニットとIL12Rβ2サブユニットを含む。IL12受容体の活性化は、IL12サイトカインリガンドがIL12Rβ1とIL12Rβ2の両方に結合することに起因する。IL12サイトカインリガンドがIL12受容体複合体に結合すると、Janusチロシンキナーゼである、IL12Rβ1に結合するTyk2と、IL12Rβ2に結合するJak2が活性化されて、受容体の細胞質テールがリン酸化される。これによりシグナル伝達性転写因子4(STAT4)が動員される。STAT4のホモ二量体化によって受容体からSTAT4が放出され、リン酸化されたSTAT4ホモ二量体が核に移動し、そこでIFN-γ遺伝子のSTAT4結合エレメントに結合してIFN-γを産生する。

【０１３５】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:

一部の態様では、本開示は、薬理学的特性または治療特性が改善されている、p40ムテインを含むヘテロ二量体hIL12Fcムテイン、およびこのような組成物を使用する方法を提供する。

【０１３６】

本開示は、式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]

の第1のポリペプチド、および式#2:

hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]

の第2のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、
式中、
●hP35は、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%、あるいは少なくとも91%、あるいは少なくとも92%、あるいは少なくとも93%、あるいは少なくとも94%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも96%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、あるいは少なくとも99%、またはあるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドであり、
●hP40Mは、野生型プレヒトP40(SEQ ID NO:3)に従って番号付けられた位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、任意で、そうでない場合はSEQ ID NO:4に対して同一のヒトp40ムテインであるか、またはSEQ ID NO:4に対して少なくとも90%、あるいは少なくとも91%、あるいは少なくとも92%、あるいは少なくとも93%、あるいは少なくとも94%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも96%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、またはあるいは少なくとも99%の配列同一性であり、
●L1およびL2はGSAリンカーであり、aおよびbは、独立して、0(存在しない)または1(存在する)より選択され、
●UH1およびUH2はそれぞれ、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、
●Fc1は、Fc2とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
●Fc2は、Fc1とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
ここで、式1のポリペプチドおよび式2のポリペプチドが少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合によって連結される、
ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0137】

一部の態様では、式1のポリペプチドは、SEQ ID NO:80、83、85、86、88、90、92、121、129、132、135、138、141、144、147、150、および153、または非公式の配列表にある任意のP40M-Fc配列からなる群より選択される。

【0138】

一部の態様では、式2のポリペプチドは、SEQ ID NO:81、82、84、87、89、91、93、および124のいずれか1つ、または非公式の配列表にある任意のhp35-Fc配列を含む。

【0139】

一部の態様では、L1およびL2は、独立して、SEQ ID NO:27～79からなる群より選択される。一部の態様では、L1およびL2は、独立して、SEQ ID NO:36、37および65からなる群より選択される。

【0140】

一部の態様では、UH1およびUH2はSEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12からなる群より選択される。

【0141】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:80、83、85、86、88、90、92、121、129、132、135、138、141、144、147、150、および153からなる群より選択される第1のポリペプチドと、SEQ ID NO:81、82、84、87、89、91、93、および124からなる群より選択される第2のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０１４２】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:80のポリペプチドとSEQ ID NO:81のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１４３】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:121のポリペプチドとSEQ ID NO:124のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１４４】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:83のポリペプチドとSEQ ID NO:82のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１４５】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:141のポリペプチドとSEQ ID NO:124のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１４６】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:144のポリペプチドとSEQ ID NO:124のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１４７】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:129のポリペプチドとSEQ ID NO:124のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１４８】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:147のポリペプチドとSEQ ID NO:82のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１４９】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:150のポリペプチドとSEQ ID NO:82のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１５０】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:153のポリペプチドとSEQ ID NO:82のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１５１】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:135のポリペプチドとSEQ ID NO:124のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１５２】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:138のポリペプチドとSEQ ID NO:124のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【０１５３】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:80のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:81のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。
【０１５４】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:121のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:124のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。
【０１５５】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:83のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:82のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。
【０１５６】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:141のポリペプチドとSEQ ID NO:124のポリペプチドをコードする第1の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。
【０１５７】
一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:144のポリペプチドをコードする第1の核酸

配列と、SEQ ID NO:124のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０１５８】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:124のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０１５９】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:147のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:82のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０１６０】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:150のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:82のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０１６１】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:153のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:82のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０１６２】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:135のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:124のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０１６３】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:138のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、SEQ ID NO:124のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０１６４】

ヒトP40ムテイン

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、wt hP40の成熟型(SEQ ID NO:4)と比べてIL12Rβ1に対するhp40Mの結合親和性の低減をもたらす、IL12Rβ1の細胞外ドメインとの境界面において1つまたは複数のアミノ酸置換、改変および/または欠失を含む、改変されたヒトP40ポリペプチドまたは「hP40ムテイン」(「hp40M」または「hP40M」とも略される)を含む。一部の態様では、表面プラズモン共鳴(SPR)分光法によって決定された時、hIL12Rβ1の細胞外ドメインに対するhP40ムテインの結合親和性は、参照ポリペプチド(wt hP40)の結合親和性と比較して約10%、あるいは約20%、あるいは約30%、あるいは約40%、あるいは約50%、あるいは約60%、あるいは約60%、あるいは約70%、あるいは約80%、あるいは約900%低減しているか、あるいは約100%まで低減している。一部の態様では、hP40Mは、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%の配列同一性(例えば、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有する、改変された野生型ヒトhp40ポリペプチドである。一部の態様では、hP40Mは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、hP40Mは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219における1つまたは複数のアミノ酸置換は、P39A、D40A、E81A、F82A、K106A、D109A、K217A、K219Aからなる群より選択される。一部の態様では、hP40ムテインは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW

37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において2つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、hP40Mは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される残基において2つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、hP40ムテインは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において3つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、hP40Mは、W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219において2つ以上のアミノ酸置換を含み、2つ以上の置換は、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む:E81A/F82A、E81K/F82A、E81L/F82A、E81H/F82A、およびE81S/F82A。一部の態様では、hP40ムテインは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される残基において3つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、hP40Mは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において3つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、hP40ムテインは、W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219において3つ以上のアミノ酸置換を含み、3つ以上の置換は、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む:W37A/E81A/F82A;E81A/F82A/K106A;E81A/F82A/K106A/K219A、E81A/F82A/K106N、E81A/F82A/K106Q、E81A/F82A/K106T、およびE81A/F82A/K106R。一部の態様では、hP40ムテインは、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において4つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、hP40ムテインは、W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219において4つ以上のアミノ酸置換を含み、4つ以上の置換は、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む:E81A/F82A/K106A/K217A、81A/F82A/K106A/E108A/D115A、およびP39A/D40A/E81A/F82A。

【０１６５】

一部の態様では、hP40MはアミノE81A/F82Aを含み、本明細書において「2xAla」(SEQ ID NO:6)と呼ばれる。一部の態様では、hP40MはアミノE81A/F82A/K106Aを含み、本明細書において「3xAla」(SEQ ID NO:8)と呼ばれる。一部の態様では、hP40MはアミノE81A/F82A/K106A/K217Aを含み、本明細書において「4xAla」(SEQ ID NO:10)と呼ばれる。

【０１６６】

一部の態様では、表面プラズモン共鳴によって決定された時、IL12Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対する、(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において1つまたは複数の、任意で2つ以上の、任意で3つ以上の、または任意で4つ以上のアミノ酸置換を含む本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインの結合親和性は、IL12Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対する野生型hP40(SEQ ID NO:4)の結合親和性と比べて少なくとも5%、任意で少なくとも10%、任意で少なくとも20%、任意で少なくとも30%、任意で少なくとも40%、任意で少なくとも50%、任意で少なくとも60%、任意で少なくとも70%低減している。

【０１６７】

<u>ヘテロ二量体hIL12Fcムテインの特性</u>

一部の態様では、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、参照ポリペプチド(例えば、野生型hIL12)と比較して、IL12受容体によって媒介される下流シグナル

伝達の、細胞タイプに偏りがあるシグナル伝達を提供する。一部の態様では、IL12Rβ1に対する、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP40ムテインの結合親和性の低減は、参照ポリペプチド(wt hIL12)と比較してSTAT4によって媒介されるシグナル伝達の低減をもたらす。一部の態様では、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは部分アゴニストである。一部の態様では、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、STAT3によって媒介されるシグナル伝達(「STAT3シグナル伝達」)および/またはSTAT4によって媒介されるシグナル伝達(「STAT4シグナル伝達」)の部分アゴニストである。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、参照ポリペプチド(wt hIL12)と比較して、STAT3によって媒介されるシグナル伝達が低減している。一部の態様では、STAT3シグナル伝達および/またはSTAT4シグナル伝達は、遺伝子発現アッセイ、ホスホフローシグナル伝達アッセイ、および酵素結合免疫測定法(ELISA)からなる群より選択されるアッセイによって決定される。

【０１６８】

本明細書に記載のhP40ムテインを含むヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、抗炎症特性などの有益な特性を提供する、および/またはwt hIL-12と比較して炎症誘発性副作用などの望ましくない特性が低減している、ある特定の細胞タイプの選択的活性化を提供する。一部の態様では、本明細書に記載のhP40ムテインを含むヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、参照ポリペプチド(例えば、野生型hIL12)と比較して、IL-12受容体によって媒介される下流シグナル伝達の、細胞タイプに偏りがあるシグナル伝達を提供する。例えば、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、CD8+T細胞においてIL-12シグナル伝達を刺激または活性化する野生型hIL12の特性を保持しているが、ナチュラルキラー(NK)細胞において、IFNγおよび/またはSTAT4によって媒介されるシグナル伝達の低減を示す。一部の態様では、本開示の本明細書に記載のhP40ムテインを含むヘテロ二量体hIL12Fcムテインの、細胞タイプに偏りがあるシグナル伝達は、CD8+T細胞におけるwt hIL12活性の実質的なIL12シグナル伝達(例えば、少なくとも30%、あるいは少なくとも40%、あるいは少なくとも50%、あるいは少なくとも60%、あるいは少なくとも70%、あるいは少なくとも80%、あるいは少なくとも90%)を提供する能力を含む。一部の態様では、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、参照ポリペプチド(wt hIL12)と比較して、CD8+T細胞におけるSTAT4シグナル伝達を10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、またはそれより大きく増加させ、NK細胞におけるSTAT4シグナル伝達を減少させる、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%減少させる。一部の態様では、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、参照ポリペプチド(wt hIL12)と比較して、CD8+T細胞におけるインターフェロンγ(IFNγ)を10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%活性化し、NKT細胞におけるIFNγシグナル伝達を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%減少させた。従って、本明細書に記載のhP40ムテインを含むヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、NK細胞の活性化の低減を示すと同時に、CD8+T細胞を刺激する能力を保持している。

【０１６９】

GSAリンカー:

式[1]および[2]のポリペプチドにおいて、p40ムテインおよび/またはp35を組み込んでいるFcドメイン融合は、任意で、p40ムテインと上部ヒンジとの間にGSAリンカー分子を含有してもよい。本明細書で使用する「GSAリンカー」という用語は、グリシン、セリン、およびアラニンからなる群より選択されるアミノ酸で構成される、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸を有するポリペプチドを指す。一部の態様では、ポリペプチドリンカーは、構造$(GGGGS_m)_n$、$(GGGS_m)_n$、$(GGGA_m)_n$、および$(GGGGA_m)_n$、およびその組み合わせのグリシン-セリンポリマーであり、ここで、m、n、およびoは1、2、3、または4よりそれぞれ独立して選択される。このようなポリマーの構築におい

て、潜在的に非天然グリコシル化部位を導入する可能性がある「GSG」配列の繰り返しを回避することが望ましい場合がある。例示的なグリシン-セリンリンカーには、単量体:GGGS(「G4S」と呼ばれる)、GGGGA(「G4A」と呼ばれる)、GGGS(「G3S」と呼ばれる)およびGGGA(「G3A」と呼ばれる)、またはそのホモポリマー(例えば、「GGGGSGGGGS」。$(G4S)_2$とも呼ばれる)もしくはヘテロポリマーが含まれるが、これに限定されない。例示的なGSAリンカーを以下の表2に示した。

【０１７０】

(表２)例示的なGSAリンカー

名称/参照	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
(G3A)2	GGGAGGGA	27
(G3A)4	GGGAGGGAGGGA	28
(G3AG2)2	GGGAGGGGGAGG	29
(G3S)3	GGGSGGGSGGGS	30
(G3SG2)2	GGGSGGGGGSGG	31
(G4A)2	GGGGAGGGGA	32
(G4a)3	GGGGAGGGGAGGGGA	33
(G4AG)2	GGGGAGGGGGAG	34
(G4AG2)2	GGGGAGGGGGGAGG	35
(G4S)2	GGGGSGGGGS	36
(G4S)3	GGGGSGGGGSGGGGS	37
(G4SG)2	GGGGSGGGGGSG	38
(G4SG2)2	GGGGSGGGGGGSGG	39
(G5AG)2	GGGGGAGGGGGGAG	40
(G5SG)2	GGGGGSGGGGGGSG	41
G2AG	GGAG	42

名称/参照	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
G3A	GGGA	43
G3A-G3S	GGGAGGGS	44
G3A-G3S- G3A	GGGAGGGSGGGA	45
G3A-G4S	GGGAGGGGS	46
G3A-G4SA	GGGAGGGGA	47
G3AG2	GGGAGG	48
G3AG2 G4AG	GGGAGGGGGGAG	49
G3S	GGGS	50
G3S-G3A-GGGS	GGGSGGGAGGGS	51
G3SG2-G4SG	GGGSGGGGGGSG	52
G4A	GGGGA	53
G4A-G4S-G4A	GGGGAGGGGSGGGGA	54
G4A-G4S-G4S	GGGGAGGGGSGGGGS	55
G4A-G4AG	GGGGAGGGGAG	56
G4A-G4S	GGGGAGGGGS	57
G4A-G4SG	GGGGAGGGGSG	58
G4AG	GGGGAG	59
G4AG G4SG2	GGGGAGGGGGSG	60
G4AG-G4AG	GGGGAGGGGGAG	61
G4AG-G4SG	GGGGAGGGGGSG	62
G4AG2	GGGGAGG	63
G4AG2 G3SG2	GGGGAGGGGGSGG	64
G4S	GGGGS	65
G4S- G4A- G4A	GGGGSGGGGAGGGGA	66
G4S- G4A- G4S	GGGGSGGGGAGGGGS	67
G4S- G4S- G4A	GGGGSGGGGSGGGGA	68
G4S-G4A	GGGGSGGGGA	69
G4S-G4AG	GGGGSGGGGAG	70
G4S-G4SG	GGGGSGGGGSG	71
G4SG G3AG2	GGGGSGGGGAGG	72
G4SG-G4AG	GGGGSGGGGGAG	73
G4SG-G4SG	GGGGSGGGGGSG	74
G4SG2 G5SG	GGGGSGGGGGGSG	75
G5AG	GGGGGAG	76
G5SG G4AG2	GGGGGSGGGGGAGG	77
GAG2	GAGG	78
GSG2	GAGG	79

【０１７１】

上部ヒンジ:

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、式[1]および[2]のポリペプチドを含むヘテロ二量体であり、式[1]および[2]のポリペプチドはそれぞれがヒト免疫グロブリンの上部ヒンジ領域を組み込んでいる。「上部ヒンジ」または「UH」という用語は、ヒト免疫グロブリン分子のアミノ酸残基216-220(EUナンバリング)に対応するアミノ酸配列を指す。一部の態様では、上部ヒンジ領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4上部ヒンジドメインのLH領域より選択されるヒト免疫グロブリンの天然の上部ヒンジ領域である。一部の態様では、上部ヒンジ領域はヒトIgG1免疫グロブリンの上部

ヒンジ領域である。一部の態様では、上部ヒンジ領域は、五量体アミノ酸配列:EPKSC(SEQ ID NO:11)を含むヒトIgG1免疫グロブリンの上部ヒンジ領域である。

【０１７２】

一部の態様では、上部ヒンジ領域は、典型的に、完全免疫グロブリン分子において軽鎖上のシステインに結合する位置220(EUナンバリング)の不対システイン残基を含有する。ヒンジドメインを含むFcドメインのみが用いられた場合、ヒンジドメイン中にある不対システインは不適当なジスルフィド結合を形成する可能性を生じる。その結果、一部の態様では、位置220にあるシステイン(C220。EUナンバリングに従って番号付けられた)は、ジスルフィド結合を促進しないアミノ酸で置換される。一部の態様では、Fcドメインは、アミノ酸配列EPKSS(SEQ ID NO:12)を有するC220S変異を含む。

【０１７３】

<u>Fc1およびFc2:</u>

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、ヘテロ二量体化を促進するように改変されたヒト免疫グロブリン分子のFc領域(Fc1およびFc2)をそれぞれが組み込んでいる、式[1]および[2]のポリペプチドを含むヘテロ二量体である。

【０１７４】

本明細書で使用する「Fc」および「Fc単量体」という用語は、Fc二量体の単量体ポリペプチドサブユニットを指定するために本明細書において互換的に用いられる。Fcは、(アミノ末端からカルボキシ末端に向かって)ヒト免疫グロブリン分子の下部ヒンジドメインとCH2およびCH3ドメインを含むアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Fc単量体は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4ヒンジドメインのヒト免疫グロブリン分子ドメインの下部ヒンジドメインとCH2およびCH3ドメインを含むポリペプチドである。hIgG1のCH2ドメインはアミノ酸残基231-340(EUナンバリング)に対応し、SEQ ID NO:14に示される。hIgG1のCH3ドメインはアミノ酸残基341-447(EUナンバリング)に対応し、SEQ ID NO:15に示される。

【０１７５】

式[1]および[2]のポリペプチドはそれぞれがヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ領域を組み込んでいる。本明細書で使用する「下部ヒンジ」または「LH」という用語は、ヒト免疫グロブリン分子のアミノ酸残基221-229(EUナンバリング)に対応するアミノ酸配列を指す。一部の態様では、下部ヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4下部ヒンジドメインのLH領域より選択されるヒト免疫グロブリンの天然下部ヒンジ領域である。一部の態様では、下部ヒンジ領域はヒトIgG1免疫グロブリンの下部ヒンジ領域である。一部の態様では、下部ヒンジ領域は、十量体アミノ酸配列:DKTHTCPPCP(SEQ ID NO:13)を含むヒトIgG1免疫グロブリンの下部ヒンジ領域である。

【０１７６】

一部の態様では、Fc1およびFc2は、アミノ酸配列(示されたEUナンバリング、SEQ ID NO:16):

```
       230        240        250        260        270
DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED

       280.       290.       300        310        320
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

       330        340        350        360        370
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK

       380        390        400        410        420
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

       430        440       447
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK  (SEQ ID NO:16)
```

を有する、ヒトIgG1免疫グロブリンのアミノ酸221-447(EUナンバリング)に対応するポリペプチドに由来する。

【０１７７】

上記の配列に示したように、IgG1 Fcドメインの野生型のC末端残基はリジンであり、EUナンバリングに従ってK447と呼ばれる。K447は、首尾一貫せず、組換え産物中に産生細胞によって除去される。結果として、組換えにより産生されたFc単量体の画分の中にはK447を含有するものもあれば、K447を含有しないものもある点で、組換えFc単量体の集団は不均一になることがある。従って、産生細胞による、このような首尾一貫しないタンパク質分解プロセシングによって不均一なhIL12Fc集団が生じる場合がある。典型的に、特にヒト薬学的剤の状況では、活性薬学的成分のこのような不均一性は回避しなければならない。その結果として、ヘテロ二量体化を促進するFc単量体配列への改変に加えて、本開示は、C末端K447の欠失またはG446およびK447の欠失をさらに含むFc単量体、ならびに(a)位置447にあるリジン残基の欠失(K447、EUナンバリング。ΔK447またはdes-K447と略される)、または(b)位置456にあるグリシンの欠失(G446 EUナンバリング。des-G446と略される)とK447の欠失(このG446とK447の二重欠失は本明細書においてdes-G446/des-K447またはΔG446/ΔK447と呼ばれる)を含むFc単量体をコードする核酸配列を提供する。

【０１７８】

<u>タンパク質分解切断を回避するためのhp40 K282の改変</u>

一部の態様では、本開示のヘテロ二量体IL12Fcムテインは、ヒトp40ポリペプチドの成熟型の位置260(SEQ ID NO:4、ヒトp40前駆体ポリペプチドSEQ ID NO:3の位置282に対応する)にあるリジン(K)残基(K260)のアミノ酸置換を含む。Websterら(2011年1月18日に発行された米国特許第7,872,107号)に記載のように、成熟ヒトp40ポリペプチドの位置260における置換はヒトp40ポリペプチドをタンパク質分解切断に対して抵抗性にする。一部の態様では、本開示のヘテロ二量体IL12Fcムテインのヒトp40ポリペプチドは、ポリペプチドの位置K282(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)にあるリジンから非塩基性アミノ酸への置換を含む。一部の態様では、非塩基性アミノ酸は、アラニン、グリシン、アスパラギン、またはグルタミンからなる群より選択される。一部の態様では、本開示のヘテロ二量体IL12Fcムテインのp40ポリペプチドは、K282G、K282A、K282N、K282Q(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)からなる群より選択される位置K282(SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)における変異を含む。

【０１７９】

一部の態様では、本開示のヘテロ二量体IL12Fcムテインは、E81A/F82A/K106A/K282G、E81A/F82A/K106A/K282A、E81A/F82A/K106A/K282N、およびE81A/F82A/K106A/K282Q (SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)からなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含むヒトp40ポリペプチドを含む。一部の態様では、本開示のヘテロ二量体IL12Fcムテインは、E81A/F82A/K282G、E81A/F82A/K282A、E81A/F82A/K282N、およびE81A/F82A/K282Q (SEQ ID NO:3に従って番号付けられた)からなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含むヒトp40ポリペプチドを含む。

【０１８０】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**G**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 155)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８１】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**A**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 156)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８２】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**N**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 157)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８３】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**Q**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 158)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８４】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**G**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 159)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８５】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**A**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 160)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８６】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**N**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 161)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８７】

一態様では、本開示は、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK
TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE
RVR**Q**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR
DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG
REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ
ID NO: 162)

を有するヒトp40ムテインを含む、ヘテロ二量体IL12Fcムテインを提供する。

【０１８８】

ヘテロ二量体化を促進するためのFcサブユニットの改変

上記の式[1]および[2]において示されたように、二量体FcのFc1およびFc2単量体は、Fc1とFc2との間のヘテロ二量体化を促進するアミノ酸置換を含有する。Fcドメインのヘテロ二量体化を促進するための様々な技法が確立している。例えば、Kimら、2021年8月3日に発行された米国特許第11,087,249号を参照されたい。一部の態様では、Fc1およびFc2単量体のヘテロ二量体化を促進する改変は、Moore, et al (2011) mAbs 3(6):546-557に記載のようにHF-TA変異およびHA-TF変異である。HF-TA法では、あるFc単量体上ではS364H/T394F置換を使用し、相補的Fc単量体上ではY349T/F405A置換を使用する。(HA-TF)法では、あるFc単量体上ではS364H/F405A置換を使用し、相補的Fc単量体上ではY349T/T394F置換を使用する。または、Fc1単量体とFc2単量体は、あるFc単量体上ではT350V/L351Y/F405A/Y407V置換を使用し、相補的Fc単量体上ではT350V/T366L/K392L/T394W置換を使用するZW1ヘテロ二量体化法によってヘテロ二量体化を促進するように改変される。Von Kreudenstein, et al (2013) mAbs, 5(5):646-654。または、Fc1単量体とFc2単量体は、あるFc単量体上ではK360E/K409W置換を使用し、相補的Fc単量体上ではQ347R/D399V/F405T置換を使用するEW-RVT ヘテロ二量体化法によってヘテロ二量体化を促進するように改変される。Choi, et al (2015) Molecular Immunology 65(2):377-83。

【０１８９】

一態様では、Fc1およびFc2は、本明細書において例示されるように「ノブイントゥホール」(KiHと略される)改変の使用により、ヘテロ二量体化を促進するように改変されている。KiH改変は、第1のFc上に、かさ高い「ノブ」ドメインを作り出す、第1のFc単量体(例えば、Fc1)の中にある1つまたは複数のアミノ酸置換と、相補的ポケットまたは「ホール」を作り出す、第1のFc単量体の「ノブ」を受け入れるための、第2のFc単量体(例えば、Fc2)上にある1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

【０１９０】

相補的なノブFc単量体とホールFc単量体を作り出すために様々なアミノ酸置換が確立している。例えば、Ridgway, et al (1996) Protein Engineering 9(7):617-921; Atwell, et al (1997) J. Mol. Biol. 270:26-35;Carterら、1998年9月15日に発行された米国特許第5,807,706号; Carterら、2010年4月13日に発行された7,695,936; Zhao et al.「A new approach to produce IgG4-like bispecific antibodies」, Scientific Reports 11: 18630 (2021); Cao et al.「Characterization and Monitoring of a Novel Light-heavy-light Chain Mispair in a Therapeutic Bispecific Antibody」、およびLiu et al.「Fc Engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds」. Frontiers in Immunology. 8: 38. doi:10.3389/fimmu.2017.00038 (2017)を参照されたい。

【０１９１】

一部の態様では、Fcドメインは、位置366にあるスレオニン(EUナンバリング)が、かさ高い残基で改変されている(例えば、T366W)、第1のFc単量体のCH3ドメインが「ノブ」および置換となり、第2のFc単量体のCH3ドメインの相補的残基に1つまたは複数の置換を含む第2のFc単量体が、例えば、T366S、L368A、および/またはY407Vなどのアミノ酸置換により、かさ高い残基を受け入れるためのポケットまたは「ホール」となる、2つのFc単量体を含む。

【０１９２】

一態様では、式1のFc1単量体は、アミノ酸置換T366Wを含む「ノブ」改変Fc単量体であり、式2のFc2単量体は、アミノ酸置換T366S/L368A/Y407Vのセットを含む「ホール」改変Fcである。

【０１９３】

または、式1のFc1単量体は、アミノ酸置換T366S/L368A/Y407Vのセットを含む「ホール」改変Fc単量体であり、式2のFc2単量体は、アミノ酸置換T366Wを含む「ノブ」改変Fc単量体である。

【０１９４】

相補的KiH改変を含む操作されたFcヘテロ二量体ペアの一例を以下の表3に示した。

【０１９５】

(表３)相補的IgG1 KiHヘテロ二量体ペアのアミノ酸置換セット

Fc 二量体 番号	Fc 単量体	アミノ酸置換セット (EUナンバリング)
1	ノブ	T366W
	ホール	T366S/L368A/Y407V

【０１９６】

言及したように、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは式[1]および[2]のポリペプチドの相補的ヘテロ二量体ペアとして提供され、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは少なくとも1つのジスルフィド結合によって連結される。一部の態様では、式[1]と[2]のポリペプチド間のジスルフィド結合の組み込みはFc1ドメインおよびFc2ドメインの中にある特定の場所でのシステイン置換によって成し遂げられてもよい。一態様

では、Fc1のS354CとFc2のY349Cとの間でジスルフィド結合するように、式[1]のポリペプチドのFc1ドメインは、アミノ酸置換S354C(EUナンバリング)を含むhIgG1のFcドメインに由来し、式[2]のポリペプチドのFc2ドメインは、アミノ酸置換Y349C(EUナンバリング)を含むhIgG1のFcドメインに由来する。または、Fc1のS354CとFc2のY349Cとの間でジスルフィド結合するように、式[1]のポリペプチドのFc1ドメインは、アミノ酸置換Y349C(EUナンバリング)を含むhIgG1のFcドメインに由来し、式[2]のポリペプチドのFc2ドメインは、アミノ酸置換S354C(EUナンバリング)を含むhIgG1のFcドメインに由来する。

【０１９７】

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35FcとhP40MFcは、以下のシステインペアの群の側鎖間の、1つまたは複数の、任意で2つ以上の、任意で3つ以上のジスルフィド結合、任意で4つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結される:(a)hP35のC96とhP40MのC199;(b)第1のFc単量体のC226と第2のFc単量体のC226、(c)第1のFc単量体のC229と第2のFc単量体のC229;および(d)S354Cアミノ酸置換を含む第1のFcドメインのS354Cと、Y349Cアミノ酸置換を含む第2のFcドメインのY349C。

【０１９８】

本開示の実施において使用され得る、相補的KiH操作ヘテロ二量体Fcペアのさらなる例を以下の表4に示した。

【０１９９】

(表４)ノブイントゥホールFc二量体ペア

Fc二量体ペア	単量体タイプ	単量体SEQ ID	UH配列*	UH SEQ ID	Fcアミノ酸置換(EUナンバリング)	Fc Seq ID
2	ノブ	19	wt	11	T366W	17
	ホール	20	wt	11	T366S/L368A/Y407V	18
3	ノブ	21	C220S	12	T366W	17
	ホール	22	C220S	12	T366S/L368A/Y407V	18
4	ノブ	23	wt	11	T366W	17
	ホール	24	wt	11	T366S/L368A/Y407V	18
5	ノブ	25	C220S	12	S354C/T366W	17
	ホール	26	C220S	12	Y349C/T366S/L368A/ Y407V	18

*wt=wt hIgG1;C220Sは、位置220(EUナンバリング)においてCからSへの変異を有するwt hIgG1を指す。

【０２００】

<u>エフェクター機能を低減するための改変</u>

一部の態様では、ヘテロ二量体化を促進するように改変されたFc1単量体および/またはFc2単量体のアミノ酸配列はエフェクター機能を低減するようにさらに改変されてもよい。一部の態様では、Fcドメインは、抗体指向性細胞傷害(antibody directed cytotoxicity)(ADCC)エフェクター機能を低減するか、または無くす、Fc受容体(FcyRおよびFcR)への結合を実質的に低減するように改変されてもよい。エフェクター機能を低減するためのFcドメインの改変は当技術分野において周知である。例えば、Wang, et al. (2018) IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions, Protein Cell 9(1):63-73を参照されたい。例えば、位置235(EUナンバリング)にあるリジン残基のロイシン(L)からグルタミン酸(E)への変異はFcgRおよびC1q結合を低減する

ことでエフェクター機能を低減することが知られている。Alegre, et al. (1992) J. Immunology 148:3461-3468。さらに、IgG1ヒンジ領域中の位置234および235(EUナンバリング)にある2つのロイシン(L)残基からアラニン(A)への置換、すなわち、L234AおよびL235Aは補体依存性細胞傷害(CDC)および抗体依存性細胞傷害(ADCC)の減少をもたらす。Hezereh et al., (2001) J. Virol 75(24):12161-68。さらに、位置329(EUナンバリング)にあるプロリンからアラニン(P329A)またはグリシン(P329G)への変異はエフェクター機能を軽減し、L234AおよびL235A置換と組み合わされ得る。一部の態様では、本発明の組成物のFcドメイン(Fc1およびFc2)は、「LALAPA」置換と呼ばれるアミノ酸置換L234A/L235A/P329A(EUナンバリング)または「LALAPG」置換と呼ばれるL234A/L235A/P329G(EUナンバリング)を含んでもよい。一部の態様では、本開示の組成物のFcドメイン(Fc1およびFc2)はアミノ酸置換E233P/L234V/L235A/ΔG237(科学文献ではPVAdelG変異と呼ばれる)を含んでもよい。

【０２０１】

一部の態様では、本開示の組成物のFcドメイン(Fc1およびFc2)はhIgG4に由来する。ヘテロ二量体IL12ムテインおよびIL23ムテインのFcドメインがhIgG4に由来する、このような場合において、エフェクター機能の弱毒化はS228Pおよび/またはL235E変異(EUナンバリング)の導入によって成し遂げられてもよい。

【０２０２】

本開示のhIL12およびヘテロ二量体hIL23Fcムテインに組み込まれ得る、ペアのKiH Fc二量体構築物の例を以下の表5に示した。

【０２０３】

(表５)エフェクター機能を低減するための変異を含む、相補的IgG1 KiH UH/Fcヘテロ二量体ペアのアミノ酸置換セット

Fc二量体番号	UH Fc単量体	アミノ酸置換セット(EUナンバリング)
6	ノブ	L234A/L235A/P329A/T366W/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329A/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
7	ノブ	C220S/L234A/L235A/P329A/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235A/P329A/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
8	ノブ	L234A/L235A/P329A/S354C/T366W/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329A/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
9	ノブ	C220S/L234A/L235A/P329A/S354C/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235A/P329A/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
10	ノブ	L234A/L235A/P329G/T366W/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329G/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
11	ノブ	C220S/L234A/L235G/P329A/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235G/P329A/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
12	ノブ	L234A/L235A/P329G/S354C/T366W/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329G/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
13	ノブ	C220S/L234A/L235A/P329G/S354C/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235A/P329G/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
14	ノブ	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366W/ΔK447
	ホール	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
15	ノブ	C220S L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
16	ノブ	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/S354C/T366W/ΔK447
	ホール	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
17	ノブ	C220S/L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/S354C/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
18	ノブ	L234F/L235E/P331S/T366W/ΔK447
	ホール	L234F/L235E/P331S/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
19	ノブ	C220S/L234F/L235E/P331S/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234F/L235E/P331S//L368A/Y407V/ΔK447
20	ノブ	L234F/L235E/P331S/S354C/T366W/ΔK447
	ホール	L234F/L235E/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
21	ノブ	C220S/S/L234F/L235E/P331S/354C/T366W/ΔK447
	ホール	C220S/L234F/L235E/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447

【０２０４】

作用期間を延長するためのＦｃ配列改変

一部の態様では、ヘテロ二量体化を促進するように改変されたＦｃ１単量体および/またはＦｃ２単量体のアミノ酸配列は、分子の作用期間を延長し、クリアランスを阻止するアミノ酸置換を組み込むようにさらに改変される場合がある。一部の態様では、Ｆｃ単量体に対する、このような改変には、「ＬＳ」改変と呼ばれるアミノ酸置換Ｍ４２８ＬおよびＮ４３４Ｓ(ＥＵナンバリング)が含まれる。ＬＳ改変は、任意で、エフェクター機能を低減し、Ｆｃ１とＦｃ２との間でジスルフィド結合をもたらすためのアミノ酸置換と組み合わされる場合がある。以下の表６は、式[１]および[２]のＦｃ１およびＦｃ２ポリペプチドの設計において使用され得る、ヘテロ二量体化を促進するための相補的な配列改変を有する例示的なＦｃ１およびＦｃ１ヘテロ二量体ペアを示す。

【０２０５】

以下の表6は、本開示のヘテロ二量体hIL12FcムテインのFc1ポリペプチドおよびFc2ポリペプチドの調製において使用され得る例示的なFcヘテロ二量体ペアを示す。

【０２０６】

(表６)エフェクター機能の低減およびLS半減期の延長のための変異を含む、相補的IgG1 KiH UH/Fcヘテロ二量体ペアのアミノ酸置換セット

Fc二量体番号	UH/Fc単量体	アミノ酸置換セット(EUナンバリング)
22	ノブ	L234A/L235A/P329A/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329A/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
23	ノブ	C220S/L234A/L235A/P329A/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235A/P329A/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
24	ノブ	L234A/L235A/P329A/S354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329A/Y349C/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
25	ノブ	C220S/L234A/L235A/P329A/S354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235A/P329A/Y349C/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
26	ノブ	L234A/L235A/P329G/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329G/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
27	ノブ	C220S/L234A/L235G/P329A/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235G/P329A/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
28	ノブ	L234A/L235A/P329G/S354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	L234A/L235A/P329G/Y349C/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
29	ノブ	C220S/L234A/L235A/P329G/S354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235A/P329G/Y349C/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
30	ノブ	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
31	ノブ	C220S L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/T366S/L368A/Y407V/M428L/ N434S/ΔK447
32	ノブ	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/S354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V/M428L/ N434S/ΔK447
33	ノブ	C220S/L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/S354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234A/L235E/G237A/A330S/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V/ M428L/N434S/ΔK447
34	ノブ	L234F/L235E/P331S/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	L234F/L235E/P331S/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
35	ノブ	C220S/L234F/L235E/P331S/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234F/L235E/P331S//L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
36	ノブ	L234F/L235E/P331S/S354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	Y L234F/L235E/P331S/349C/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447
37	ノブ	C220S/S/L234F/L235E/P331S/354C/T366W/M428L/N434S/ΔK447
	ホール	C220S/L234F/L235E/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V/M428L/N434S/ΔK447

【０２０７】

一部の態様では、本開示の組成物のFcドメイン(Fc1およびFc2)はhIgG4に由来する。ヘテロ二量体IL12ムテインおよびIL23ムテインのFcドメインがhIgG4に由来する、このような場合において、ヘテロ二量体Fcドメインを構成する相補的Fc配列における変異K370E、K409WおよびE357N、D399V、F405T(EUナンバリング)の導入による、Fc1ドメインおよびFc2ドメインのヘテロ二量体化。

【０２０８】

グリコシル化部位を排除するためのFc改変

一部の態様では、ヘテロ二量体化を促進するように改変されたFc1単量体および/またはFc2単量体のアミノ酸配列はN結合型またはO結合型グリコシル化部位を排除するようにさらに改変される場合がある。Fcドメイン、特にIgG1サブクラスのFcドメインの無グリコシル(aglycosylated)バリアントはエフェクター機能の不十分なメディエーターであることが知られている。Jefferies et al. 1998, Immol. Rev., vol. 163, 50-76)。位置297(EUナンバリング)におけるグリコシル化はエフェクター機能に寄与することが示されている。Edelman, et al (1969) PNAS (USA) 63:78-85。一部の態様では、本開示の組成物のFcドメインは、NまたはO結合型グリコシル化部位を排除するための1つの、または複数の改変を含む。Fcドメイン中のグリコシル化部位を排除するためのN297における改変の例にはアミノ酸置換N297QおよびN297Gが含まれる。

【０２０９】

PEG化

一部の態様では、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインの式[1]および/または[2]のポリペプチドは1つまたは複数のポリエチレングリコール分子とコンジュゲートすてもよい、すなわち「PEG化」されてもよい。結合分子にPEGを取り付けるための方法または部位は変わることがあるが、ある特定の態様では、PEG化しても結合分子の活性は変化しないか、または最小限しか変化しない。

【０２１０】

本開示は、PEG化されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP35Fcポリペプチドが PEG化される。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP40MFcポリペプチドがPEG化される。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12FcムテインhP35FcとhP40MFcの両方がPEG化される。

【０２１１】

本開示は、PEG化されたヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP19Fcポリペプチドがが PEG化される。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFcポリペプチドがPEG化される。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP19FcとhP40MFcの両方がPEG化される。

【０２１２】

一部の態様では、PEG部分はシステイン残基のスルフヒドリル(-SH)基を介してコンジュゲートされる場合がある。一部の態様では、dヘテロ二量体hIL12FcムテインのPEG化は、hP35Fcおよび/またはhP40MFcヘテロ二量体hIL12Fcムテインの上部ヒンジ領域の位置220(C220、EUナンバリング)にある天然システイン残基の一方または両方に設けられる。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23FcムテインのPEG化は、hP19Fcおよび/またはhP40MFcヘテロ二量体hIL23Fcムテインの上部ヒンジ領域の位置220(C220、EUナンバリング)にある天然システイン残基の一方または両方に設けられる。PEG分子のコンジュゲートが位置C220に設けられる、PEG化されたヘテロ二量体hIL12FcムテインまたはPEG化されたヘテロ二量体hIL23Fcムテインを調製する際に、上部ヒンジ領域の上記で参照されたC220S改変は使用されない。

【０２１３】

ポリペプチド配列とコンジュゲートするのに適したPEGは一般的に室温で水に溶け、一般式

$R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$

を有し、式中、Rは、水素または保護基、例えば、アルキル基またはアルカノール基であり、nは1～1000の整数である。Rが保護基である時、一般的に、1～8個の炭素を有する。PEGは直鎖でもよく分枝鎖でもよい。分枝PEG誘導体、「スターPEG」、およびマルチアームドPEGが本開示によって意図される。

【０２１４】

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのPEG化は、選択的PEGコンジュゲートを容易にする側鎖を有する1つまたは複数の非天然アミノ酸を組み込むことによって改変されてもよい。結合分子のPEG化が結合分子と標的受容体との結合に影響を及ぼさないように、特定のPEG化部位を選択することができる。

【０２１５】

ある特定の態様では、半減期の増加は、生物学的活性のどの減少よりも大きい。ポリペプチド配列とコンジュゲートするのに適したPEGは一般的に室温で水に溶け、一般式R(O-CH2-CH2)nO-Rを有し、式中、Rは、水素または保護基、例えば、アルキル基またはアルカノール基であり、nは1～1000の整数である。Rが保護基である時、一般的に、1～8個の炭素を有する。ポリペプチド配列とコンジュゲートするPEGは直鎖でもよく分枝鎖でもよい。分枝PEG誘導体、「スターPEG」、およびマルチアームドPEGが本開示によって意図される。

【０２１６】

本開示において用いられるPEGの分子量は、どの特定の範囲にも限定されない。結合分子のPEG成分の分子量は、約5kDa超、約10kDa超、約15kDa超、約20kDa超、約30kDa超、約40kDa超、または約50kDa超でもよい。一部の態様では、分子量は、約5kDa～約10kDa、約5kDa～約15kDa、約5kDa～約20kDa、約10kDa～約15kDa、約10kDa～約20kDa、約10kDa～約25kDa、または約10kDa～約30kDaである。約2,000～約80,000ダルトン、あるいは約2,000～約70,000ダルトン、あるいは約5,000～約50,000ダルトン、あるいは約10,000～約50,000ダルトン、あるいは約20,000～約50,000ダルトン、あるいは約30,000～約50,000ダルトン、あるいは約20,000～約40,000ダルトン、またはあるいは約30,000～約40,000ダルトンの分子量を有する直鎖PEG分子または分枝鎖PEG分子。本開示の一態様では、PEGは、2つの20kDアームを含む40kD分枝PEGである。

【０２１７】

本開示はまた、PEGが異なるn値を有する、従って、様々な異なるPEGが特定の比で存在するコンジュゲートの組成物も意図する。例えば、一部の組成物は、n=1、2、3および4であるコンジュゲートの組成物を含む。一部の組成物では、n=1のコンジュゲートのパーセントは18～25％であり、n=2のコンジュゲートのパーセントは50～66％であり、n=3のコンジュゲートのパーセントは12～16％であり、n=4のコンジュゲートのパーセントは5％までである。このような組成物は、当技術分野において公知の反応条件および精製方法によって産生することができる。コンジュゲート画分を分離するためにクロマトグラフィーが用いられる場合があり、次いで、例えば、望ましい数のPEGが取り付けられているコンジュゲートを含有する画分が特定され、改変されていないタンパク質配列が無いように、および他の数のPEGが取り付けられているコンジュゲートが無いように精製される。

【０２１８】

ポリペプチド配列とコンジュゲートするのに適したPEGは一般的に室温で水に溶け、一般式R(O-CH2-CH2)nO-Rを有し、式中、Rは、水素または保護基、例えば、アルキル基またはアルカノール基であり、nは1～1000の整数である。Rが保護基である時、一般的に、1～8個の炭素を有する。

【０２１９】

2つの広く用いられている第一世代の活性化モノメトキシPEG(mPEG)は、スクシンイミジルカーボネートPEG(SC-PEG;例えば、Zalipsky, et al. (1992) Biotehnol. Appl. Biochem 15:100-114を参照されたい)およびベンゾトリアゾールカーボネートPEG(BTC-PEG;例えば、Dolenceら、米国特許第5,650,234号を参照されたい)であり、これらは、リジン残基の側鎖と優先的に反応してカルバメート結合を形成するが、ヒスチジンおよびチロシン残基と反応することも知られている。PEG-アルデヒドリンカーの使用は、還元的アミノ化を介してポリペプチドN末端にある1つの部位を標的とする。

【０２２０】

PEG化は、ポリペプチドのN末端にあるα-アミノ基、リジン残基の側鎖にあるεアミノ基、およびヒスチジン残基の側鎖にあるイミダゾール基において頻繁に行われる。ほとんどの組換えポリペプチドは1個のαアミノ基と多数のεアミノ基とイミダゾール基を有するので、リンカー化学に応じて非常に多くの位置異性体を作製することができる。当技術分野において公知の一般的なPEG化戦略を本明細書において適用することができる。

【０２２１】

PEGは、ポリペプチド配列の1つまたは複数の遊離アミノ基またはカルボキシル基とポリエチレングリコールとの間の結合を媒介する末端反応基(「スペーサー」)を介して本開示の結合分子に結合することができる。遊離アミノ基に結合することができるスペーサーを有するPEGにはN-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールが含まれ、これは、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシニルイミドで活性化することによって調製することができる。

【０２２２】

ポリペプチド配列にコンジュゲートしたPEGは直鎖または分枝鎖であることができる。分枝PEG誘導体、「スターPEG」、およびマルチアームドPEGが本開示によって意図される。本開示の実施において有用なPEGの特定の態様には、10kDaの直鎖PEG-アルデヒド(例えば、Sunbright(登録商標)ME-100AL, NOF America Corporation, One North Broadway, White Plains, NY 10601 USA)、10kDa 直鎖PEG-NHS エステル(例えば、Sunbright(登録商標) ME-100CS、Sunbright(登録商標) ME-100AS、Sunbright(登録商標) ME-100GS、Sunbright(登録商標) ME-100HS, NOF)、20kDa直鎖PEG-アルデヒド(例えば、Sunbright(登録商標) ME-200AL, NOF)、20kDa直鎖PEG-NHSエステル(例えば、Sunbright(登録商標)ME-200CS、Sunbright(登録商標)ME-200AS、Sunbright(登録商標)ME-200GS、Sunbright(登録商標)ME-200HS, NOF)、20kDa 2アーム分枝PEG-アルデヒド、2つの10kDA直鎖PEG分子を含む20kDA PEG-アルデヒド(例えば、Sunbright(登録商標)GL2-200AL3, NOF)、20kDa 2アーム分枝PEG-NHSエステル、2つの10kDA直鎖PEG分子を含む20kDA PEG-NHSエステル(例えば、Sunbright(登録商標)GL2-200TS、Sunbright(登録商標)GL200GS2, NOF)、40kDa 2アーム分枝PEG-アルデヒド、2つの20kDA直鎖PEG分子を含む40kDA PEG-アルデヒド(例えば、Sunbright(登録商標)GL2-400AL3)、40kDa 2アーム分枝PEG-NHSエステル、2つの20kDA直鎖PEG分子を含む40kDA PEG-NHSエステル(例えば、Sunbright(登録商標)GL2-400AL3、Sunbright(登録商標)GL2-400GS2, NOF)、直鎖30kDa PEG-アルデヒド(例えば、Sunbright(登録商標)ME-300AL)、および直鎖30kDa PEG-NHSエステルが含まれる。

【０２２３】

一部の態様では、リンカーを用いて、PEG分子をヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインにつなぐことができる。適切なリンカーには、一般的に、改変されたポリペプチド配列と、連結された成分および分子との間である程度動くのに十分な長さの「可動性リンカー」が含まれる。リンカー分子は一般的に約6～50原子長である。リンカー分子は、例えば、アリールアセチレン、2～10単量体ユニットを含有するエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二塩基酸、アミノ酸、またはその組み合わせでもよい。適切なリンカーは容易に選択することができ、任意の適切な長さのリンカー、例えば、1個のアミノ酸(例えば、Gly)、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、30～50個、または50個超のアミノ酸のリンカーでもよい。可動性リンカーの例はセクションIVに記載されている。さらに、2つの分子をコンジュゲートするのに使用され得る可動性リンカーを提供するために、これらのリンカー配列の多量体(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、または30～50)が一緒に連結されてもよい。一部の態様では、リンカーは上記のGSAリンカーである。ポリペプチドリンカーに代わるものとして、リンカーは化学的リンカー、例えば、PEG-アルデヒドリンカーでもよい。一部の態様では、結合分子は、N末端アセチルトランスフェラーゼと、例えば、アセチルCoAを用いた酵素反応によってN末端でアセチル化される。代わ

りに、またはN末端アセチル化に加えて、結合分子は、例えば、リジンアセチルトランスフェラーゼを用いた酵素反応によって1つまたは複数のリジン残基においてアセチル化することができる。例えば、Choudhary et al. (2009) Science 325 (5942):834 840を参照されたい。

【０２２４】

一部の態様では、本開示は、PEG化されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインであって、PEGが、ヘテロ二量体hIL12FcまたはhIL23Fcムテインとコンジュゲートし、約2,000～約80,000ダルトン、あるいは約2,000～約70,000ダルトン、あるいは約5,000～約50,000ダルトン、あるいは約10,000～約50,000ダルトン、あるいは約20,000～約50,000ダルトン、あるいは約30,000～約50,000ダルトン、あるいは約20,000～約40,000ダルトン、またはあるいは約30,000～約40,000ダルトンの分子量を有する直鎖または分枝鎖のPEG分子である、PEG化されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインを提供する。本開示の一態様では、PEGは、2つの20kDアームを含む40kD分枝鎖PEGである。一部の態様では、PEGは、hP35Fcおよび/またはhP40MFcポリペプチドのN末端とコンジュゲートする。

【０２２５】

<u>例示的なヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:</u>

以下の表は、以下の表7に示した、KiHヘテロ二量体化を含む本開示の特定の組成物の概要を示す。

【０２２６】

(表７)例示的なKiH p35ホールおよびhP40Mノブ構築物

ノブまたはホール	名称	SEQ ID NO	hIL12サブユニット	リンカー	UH (EUナンバリング)	Fcドメイン変異 (EUナンバリング)
ホール	DR1535	81	Wt hP35	(G4S)3	C220S	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
ホール	DR1536	82	Wt hP35	(G4S)2	C220S	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
ホール	DR1572	84	Wt hP35	(G4S)2	wt	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
ホール	DR1589	87	Wt hP35	(G4S)3	C220S	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
ホール	DR1591	89	Wt hP35	なし	C220S	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
ホール	DR1596	91	Wt hP35	(G4S)4	C220S	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
ホール	DR1598	93	Wt hP35	(G4S)2	C220S	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ΔK447
ノブ	DR1442	80	hP40 3xAla	なし	C220S	S354C/T366W/ΔK447
ノブ	DR1537	83	hP40 3xAla	(G4S)2	C220S	S354C/T366W/ΔK447
ノブ	DR1573	85	hP40 3xAla	(G4S)2	wt	S354C/T366W/ΔK447
ノブ	DR1588	86	hP40 3xAla	なし	C220S	S354C/T366W/ΔK447
ノブ	DR1590	88	hP40 3xAla	なし	C220S	S354C/T366W/ΔK447
ノブ	DR1595	90	hP40 3xAla	(G4S)2	C220S	S354C/T366W/ΔK447
ノブ	DR1597	92	hP40 3xAla	(G4S)2	C220S	S354C/T366W/ΔK447

【０２２７】
一部の態様では、本開示は、式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式1のポリペプチドが、SEQ ID NO:80、83、85、86、88、90、92、121、129、141、144、147、150、および153からなる群より選択され、式#2の第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:81、82、84、87、89、91、93、および124からなる群より選択される、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２２８】
一部の態様では、本開示のhIL12Fcムテインは、以下の表8に示したヘテロ二量体hIL12Fcムテインである。

【０２２９】
(表８)例示的なヘテロ二量体hIL12 Fcムテイン

ヘテロ二量体hIL12 Fcムテイン番号	hP40M Fc		hP35 Fc	
	名称	SEQ ID NO:	名称	SEQ ID NO:
1 (STK021)	DR1442M	80	DR1535M	81
2 (STK-022)	DR1947M	121	DR1948M	124
3 (STK-023)	DR1537M	83	DR1536M	82
4	DR2086M	141	DR1948M	124
5	DR2087M	144	DR1948M	124
6 (STK-026)	DR2088M	129	DR1948M	124
7	DR2090M	147	DR1536 M	82
8	DR2091M	150	DR1536M	82
9 (STK-027)	DR2092M	153	DR1536M	82
10 (STK-028)	DR2455M	135	DR1948M	124
11 (STK-029)	DR2456M	138	DR1948M	124

【０２３０】
1. STK-021(DR1442M/DR1535M)
一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含み、
式中、a=1およびb=1であり、
式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDA
GQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI
STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVM
VDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC
VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSEPKSSDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 80)

を含み、

式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC
LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR
VMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG (SEQ ID NO: 81)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0231】

2. STK-022(1947/DR1948M)

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]

の第1のポリペプチド、および式#2:

hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]

の第2のポリペプチドを含み、

式中、a=1およびb=1であり、

式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDA
GQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI
STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVM
VDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC
VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGG
SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 121)

を含み、

式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC
LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR
VMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 124)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0232】

3. STK-023(DR1537M/ DR1536M)

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含み、
式中、a=1およびb=1であり、
式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:
IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDA
GQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI
STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVM
VDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC
VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGG
SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 83)

を含み、
式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC
LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR
VMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 82)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。
【0233】
4. DR2086M/ DR1948M
一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含み、
式中、a=1およびb=1であり、
式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:
IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQV
KAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY
SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC
QEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 141)

を含み、
式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQV
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI
KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:124)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２３４】

5．DR2087M/DR1948M

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]

の第1のポリペプチド、および式#2:

hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]

の第2のポリペプチドを含み、

式中、a=1およびb=1であり、

式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQV
KAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY
SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC
QEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSNREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 144)

を含み、

式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQV
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI
KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:124)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２３５】

6．STK-026（DR2088M/ DR1948M）

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]

の第1のポリペプチド、および式#2:

hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]

の第2のポリペプチドを含み、

式中、a=1およびb=1であり、

式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDA
GQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI
STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVM
VDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC
VQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGG
SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:129)

を含み、

式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQV
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI
KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:124)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２３６】

7．DR2090M/DR1536M

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]

の第1のポリペプチド、および式#2:

hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]

の第2のポリペプチドを含み、

式中、a=1およびb=1であり、

式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDG
ITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWST
DILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG
AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF
IRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQREK
KDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKS
SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:147)

を含み、

式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC
LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR
VMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 82)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２３７】

8．DR2091M/DR1536M

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含み、
式中、a=1およびb=1であり、
式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQV
KAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY
SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC
QEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSNREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:150)

を含み、
式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC
LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR
VMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 82)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２３８】

9．STK-027（DR2092M/ DR1536M）

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含み、
式中、a=1およびb=1であり、
式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGD
AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT
TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI
EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS
LTFCVQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGG
SGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:153)

を含み、
式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC
LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR
VMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 82)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２３９】

10. STK-028 (DR2455M/DR1948M):

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]

の第1のポリペプチド、および式#2:

hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]

の第2のポリペプチドを含み、

式中、a=1およびb=1であり、

式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD
AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT
TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI
EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS
LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGG
SGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO: 135)

を含み、

式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQV
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI
KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:124)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【０２４０】

11. STK-029 (DR2456M/DR1948M):

一態様では、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、式#1:

hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]

の第1のポリペプチド、および式#2:

hP35-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]

の第2のポリペプチドを含み、

式中、a=1およびb=1であり、

式#1のポリペプチドが、アミノ酸配列:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAG
QYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST
DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDA
VHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ
GKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKS
SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:138)

を含み、

式#2のポリペプチドが、アミノ酸配列:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQV
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI
KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:124)

を含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインを提供する。

【0241】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインの活性の評価

前記で議論したように、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、参照ポリペプチド(例えば、野生型hIL12)と比較して、IL12受容体によって媒介される下流シグナル伝達の、細胞タイプに偏りがあるシグナル伝達をもたらす。特に、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、野生型hIL-12と比較して、CD8+T細胞において有意なhIL-12シグナル伝達を保持しており、NK細胞においてhIL-12シグナル伝達が減少している。CD8+T細胞対NK細胞の選択的活性化は、NK細胞におけるSTAT4シグナル伝達の低減と同時にインターフェロンγ(IFNγ)の活性化によって評価することができる。

【0242】

CD8+T細胞対NK細胞におけるIFNγの増強:

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは野生型IL12と比較してCD8+T細胞ではインターフェロンγ(IFNγ)を活性化し、CD8+T細胞ではIFNγシグナル伝達が減少している。CD8細胞、CD4細胞、NK細胞に対する、wt hIL12、ならびにp40サブユニットである「2xAla」で示したE81A/F82A、「3xAla」で示したE81A/F82A/K106A、および置換W37Aを含むhIL12タンパク質、ならびに「2xAla Fc」で示した同じ変異E81A/F82A、「3xAla Fc」で示したE81A/F82A/K106A、および置換W37A(W37A Fc)を含むKiHヘテロ二量体hIL12FcのIFNγ誘導効果を評価するために一連の実験を行った。これらの分子を実施例1の開示におおむね従って組換えにより産生し、本明細書中の実施例3の開示におおむね従ってIFNγについて評価した。図1に示したデータにより例示されるように、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは野生型IL12と比較してCD8+T細胞においてIFNγを活性化し、CD8+T細胞においてIFNγシグナル伝達を減少させる。

【0243】

STAT4シグナル伝達の低減:

一部の態様では、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは参照ポリペプチド(wt hIL12)と比較して、CD8+T細胞ではSTAT4シグナル伝達を増加させ、NK細胞ではSTAT4シグナル伝達を減少させる。タンパク質として、およびFc融合としてhP40ムテインを含む様々なIL12ムテインの、CD8+T細胞、CD4+T細胞におけるSTAT4シグナル伝達の効果をNK細胞におけるSTAT4シグナル伝達と比べて評価するために一連の実験を行った。STAT4の評価を実施例2の開示におおむね従って行った。評価した試験物品は、CD8細胞、CD4細胞、NK細胞に対して、wt hIL12、ならびに「2xAla」で示し

た置換E81A/F82Aを有するp40サブユニットを含むhIL12タンパク質、「3xAla」で示したE81A/F82A/K106Aを有するp40サブユニットを含むhIL12タンパク質、ならびに野生型hP35と、hP40(wt Fc)、「2xAla Fc」で示したE81A/F82A、「3xAla Fc」で示したE81A/F82A/K106Aを含むKiHヘテロ二量体hIL12Fc構築物であった。これらの実験の結果を添付の図面の図2に示した。図2に示した結果により例示されるように、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは、NK細胞と比べてCD8+T細胞に対して特異なSTAT4シグナル伝達をもたらす。さらに、図2、特にパネルAおよびパネルBに示したデータから、本開示のヘテロ二量体hIL12FcムテインはT細胞に対するIL12部分アゴニストとして作用することが証明される。

【０２４４】

新生物疾患の処置における使用:

本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインは新生物疾患の処置において有用である。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインの活性を証明するために、ヒト分子と類似する変異を含有する代理マウスIL12Fcムテインを作製して、MC38マウス腫瘍モデルにおける効果を評価した。天然のヒトおよびマウスp40およびp35ポリペプチドの配列アラインメントを、それぞれ、添付の図面の図7および図8に示した。MC38腫瘍研究において使用したヘテロ二量体mIL12Fc試験剤の説明を以下の表9および表10にまとめた。

【０２４５】

(表９)マウスIL12Fcポリペプチド配列

名称	SEQ ID No	説明
DR854	114	mIL12 p40 mIgG2A EW LALAPG
DR855	115	mIL12-p35-mIgG2A-RVT-LALAPG
DR1243	116	mIL12 p40 E81A F82A mIgG2a EW LALAPG
DR1244	117	mIL12 p40 E81A F82A K106A mIgG2a EW LALAPG

【０２４６】

(表１０)マウスIL12Fcヘテロ二量体構築物の説明

名称	改変の説明	DNA 配列	SEQ ID NO:
mIL12	mIL12 (p35-IRES2-p40) His8	DR852によってコードされる	111
mIL12 2xAla	mIL12 (p35-IRES2-p40 E81A F82A) His8	DR1022によってコードされる	112
mIL12 3xAla	mIL12 (p35-IRES2-p40 E81A F82A K106A) His8	DR1023によってコードされる	113

【０２４７】

MC38腫瘍研究1:

簡単に述べると、マトリゲル中の約1x10^{6}個のMC38細胞を6～8週齢C57BL/6マウスに皮下移植し、処置開始時に腫瘍の平均腫瘍体積が約100mm^3～120mm^{3}になるようにした。マウスを個々の処置群に分けた。以下の表11に示した用量および投与計画の様々な試験剤の腹腔内投与によってマウスを処置した。この研究において、毒性の指標である体重(BW)と抗腫瘍効力の指標である腫瘍体積(TV)を週2回測定した。

【０２４８】

(表１１)MC38腫瘍モデル研究#1デザイン

群	処置	用量[ug]	IL-12 [ug]	処置スケジュール	ROA	用量の数	効力/群
A	PBS	n/a	n/a	2x/週	腹腔内	6	8
B	IL12WT Fc	1.6	1	2x/週	腹腔内	6	8
C	IL12WT Fc	0.53	0.3	2x/週	腹腔内	6	8
D	IL12WT Fc	0.18	0.1	2x/週	腹腔内	6	8
E	IL12WT Fc	1.6	1	1x/週	腹腔内	3	8
F	IL12 WT-PEG10kDa	12	12	2x/週	腹腔内	6	8
G	IL12 WT-PEG10kDa	3	3	2x/週	腹腔内	6	8
H	IL12 2xAla Fc	100	62.5	2x/週	腹腔内	6	8
I	IL12WT Fc	0.8	0.5	1x/週	腹腔内	3	5

【０２４９】

前記の研究から生じたデータを、添付の図面の図3(腫瘍体積)、図4(体重)、および図5(生存)に示した。図3および図4にあるパネルの表示は表11の処置群に対応することに留意されたい。それぞれの図において、腫瘍体積および体重をy軸に示し、時間(研究日)をx軸に示した。

【０２５０】

図3は、各研究群における各動物についての腫瘍体積に対する効果のスパイダープロット概要を示す。示されたデータにより証明されるように、本明細書に記載のヘテロ二量体IL12Fcムテインのマウス代理は、この研究における腫瘍成長の管理において有効であった。

【０２５１】

図4は、上記の研究の経過中の動物の平均体重を示す。この研究において評価した野生型IL12 Fc試験剤は腫瘍成長の阻害を示したが、図4に示したデータから、このような野生型IL12 Fc融合は、大幅な体重減少により示されるように有意な毒性と関連することが分かる(例えば、図4、パネルB、C、およびEを参照されたい)。対照的に、mP40ドメインに2xAla変異を含む、群Hにおいて評価したヘテロ二量体IL12Fcムテインは有意な毒性を示唆しなかった。2xAla P40変異を含むIL12Fcムテインは、評価した他の野生型IL12Fcコンジュゲートより50倍超の用量で投与されたので、このことは特に注目に値する。2xAla変異を含むIL12Fcムテインが有意な毒性の非存在下で腫瘍成長を管理できることは、図5に示したデータによってさらに裏付けられる。図5に示したデータから、2xAlaを含むIL12Fcムテインで処置した全ての動物が生存したのに対して、野生型IL12Fcコンジュゲートを投与した試験群では、これらの他の分子が明らかな抗腫瘍効果を示したのにもかかわらず、生存に対して有意な負の効果があったことが分かる。結果として、これらのデータから、本開示のヘテロ二量体IL12Fcムテインは新生物疾患の処置において有用であり、IL12Fcコンジュゲートのp40ドメインに変異を有さない野生型IL12Fcコンジュゲートよりも有意に低い毒性を示すことが証明される。

【０２５２】

MC38腫瘍研究2:

前記および表12に示した研究デザインにおおむね従って第2のMC38腫瘍研究を行った。この研究では、毒性の指標である体重(BW)と、抗腫瘍効力の指標である腫瘍体積(TV)を週2回測定した。試験開始前(0時間)、ならびに試験剤を投与して4時間後、1日後、

および7日後にマウスから血を抜き取った。免疫組織化学的評価およびFACS分析のために試験剤の投与後2日目および24日目に一部の動物を　　殺した。

【０２５３】

(表１２)MC38腫瘍モデル研究#2デザイン

群	試験剤	用量 [ug]	処置 スケジュール	用量の数	1群あたりの 動物
A	PBS	n/a	毎日	7	8
B	wt mIL12*	1	毎日	7	8
C	wt mIL12	1	毎日	7	8
D	mIL12 2xAla	30	毎日	7	5
E	mIL12 3xAla	30	毎日	7	5
F	wt mIL12 Fc	1.6	2x/週	5	5
G	mIL12 2xAla Fc	48	2x/週	5	5
H	mIL12 3xAla Fc	48	2x/週	5	5
I	IL12 WT-PEG10k1a	1	2x/週	5	5

*このwt mIL12は昆虫細胞におけるバキュロウイルス発現によって産生された。

【０２５４】

これらの試験剤の腫瘍成長に対する効果および表12に記載の研究に関するデータを添付の図面の図6に示した。(Fc二量体とコンジュゲートしていない)IL12タンパク質に関するデータを図6パネルAに示し、FcコンジュゲートIL12タンパク質を図6、パネルBに示した。図6パネルAおよびBにおけるデータの比較から、IL12分子は二量体Fcドメインとコンジュゲートすると非Fcコンジュゲート対応物と比べて有意に改善された抗腫瘍効力をもたらすことが証明される。

【０２５５】

処置群A～Hでは、試験剤を投与して0時間後ならびに4時間後、1日後、および7日後に入手した血液試料を、酵素結合免疫測定法(ELISA)によって決定される血清中のマウスインターフェロンγ(mIFNg)の濃度について評価した。入手したデータを添付の図面の図9に示した。図9のパネルAは、処置群A～E(すなわち、FcとコンジュゲートしていないIL12分子)からの結果を示し、パネルBは、処置群F、G、およびH(すなわち、Fcとコンジュゲートしたil12分子)からの結果を示す。図9に示したデータから分かるように、アミノ酸置換(すなわち、「2xAla」および「3xAla」)を含むFcコンジュゲートヘテロ二量体mIL12-Fc分子は、他の処置群と比べて、特に、野生型p40配列を含むIL12 Fcと比べてインターフェロンγ誘導において有意な遅延を示した。このIFNg誘導遅延はIL12処置に関連する急性毒性を減少させる。

【０２５６】

言及したように、この研究からの試料をFACS分析に供し、脾臓組織および腫瘍組織からNK細胞を選別した。表12のそれぞれの処置群に応答した、各組織におけるリンパ球のパーセントを添付の図面の図10に示した。示したように、Fcコンジュゲート分子は各組織タイプにおいて非Fcコンジュゲート分子と比べて弱いNK細胞誘導をもたらした。しかしながら、図10、パネルBおよびC(腫瘍組織におけるNK頻度の拡大図)に示したように、P40アミノ酸置換を含むFcコンジュゲートヘテロ二量体mIL12-Fc分子(すなわち、「IL12 2xAla Fc」および「IL12 3xAla Fc」)は野生型p40配列を含むヘテロ二量体mIL12 Fc(「IL12 WT Fc」)と比べて低頻度の腫瘍内NK細胞を示した。

【０２５７】

さらに、上記の研究における脾臓に由来するNK細胞の表現型を細胞内グランザイムBと比べたT-betについて評価した。T-betはNK細胞のエフェクター機能とNK細胞の細胞溶解活性に必要とされる。この分析の結果を添付の図面の図11に示した。T-betを縦軸に示し、グランザイムBを横軸に示した。図10に示したデータから分かるように、Tbet+NK細胞は野生型p40配列を含むヘテロ二量体mIL12 Fc(「IL12 WT Fc」)では失われるが、P40アミノ酸置換を含むFcコンジュゲートヘテロ二量体mIL12-Fc分子(すなわち、「IL12 2xAla Fc」および「IL12 3xAla Fc」)では失われない。

【０２５８】

CT26モデルにおけるmIL12 Fc構築物の用量滴定:

様々なレベルのmIL12 Fcヘテロ二量体の投薬の効果をCT26腫瘍モデルにおいて評価した。簡単に述べると、6～8週齢BALB/cマウスに、マトリゲルに入れた約$0.3x10^6$個のCT26マウス腫瘍細胞を皮下移植した。腫瘍の平均体積が118mm^3になった時に、マウスを複数の複数の群に無作為化した。処置群と研究デザインを表13にまとめた。体重と腫瘍体積を週2回測定した。FACS、IHC、および血清分析のために研究の8日目および29日目に一部のマウスを　　殺した。研究の1日目、8日目、15日目、22日目、および28日目に血清PKを測定した。

【０２５９】

(表１３)CT26腫瘍モデル研究デザイン

群	試験剤	用量[ug]	処置スケジュール	ROA	用量の数	1群あたりの動物
A	PBS	n/a	2x/週	腹腔内	7	8
B	wt mIL12 Fc	0.8	2x/週	腹腔内	7	8
C	wt mIL12 Fc	0.53	2x/週	腹腔内	7	8
D	wt mIL12 Fc	0.53	1x/週	腹腔内	4	8
E	mIL12 3xAla Fc	16	2x/週	腹腔内	8	8
F	mIL12 3xAla Fc	48	2x/週	腹腔内	8	8
G	mIL12 3xAla Fc	96	2x/週	腹腔内	8	8
H	mIL12 3xAla Fc	200	1x/週	腹腔内	4	5

【０２６０】

上記の研究における腫瘍成長に対する効果に関するデータを添付の図面の図12、図13、および図14に示した。図12に示したように、野生型IL-12WT FcはCT26モデルにおいて0.8ug(0.5ug IL-12)/用量で強力な抗腫瘍活性を示す。IL-12 3xAla FcはIL-12WT Fcと比較して5～7日遅れて腫瘍を退縮させる。CT26モデルは本発明者らの社内MC38よりもIL-12処置に対して感度が高いように見える。図13では、IL-12WT FcもIL-12 3xAla Fcも体重を減少させない。C57BL/6マウスにおいて行ったMC38研究において試験剤を用いて観察された毒性を考慮して、BALB/cマウスはIL-12WT Fc毒性に対して抵抗性が高いように見えた。図14は、野生型IL12 FcがNK細胞を脱顆粒させるが、3xAla IL12 FcがNK細胞の脱顆粒を実質的に誘導しないことを示すFACS分析を示す。

【０２６１】

<u>NK細胞枯渇研究#1S6-21-005と組み合わせた毒性の評価</u>

IL12 Fc試験剤と組み合わせたNK細胞枯渇に対する効果を評価するためにマウスにおいて研究を行った。NK1.1抗体を用いてNK細胞を枯渇させた。6～8週齢C57BL/6をN

K細胞枯渇抗体(αNK1.1/IL12)で処置した後にIL-12を投与した。-3日目、0日目、3日目、および7日目にPBSまたはαNK1.1を投与した。0日目、4日目、および8日目にIL12を投与した(表14を参照されたい)。血清分析およびIHCのために瀕死のマウスを殺した。BWを毎日測定した。一部のマウスから血を抜き取り、抗=NK1.1抗体がNK細胞を枯渇させていることを確認するためにNK細胞の有無について評価した。これらの評価から、抗体が実際にNK細胞を枯渇させていることがFACSにより確認された。生き残っているマウスを13日目に　　殺した。

【０２６２】

(表１４)NK枯渇毒性モデル研究デザイン

群	処置	処置/日	抗NK1.1用量	IL-12用量[ug]	IL12スケジュール	IL-12用量	マウス
A	PBS/IL12	-3, 0, 3, 7	n/a	1.6	2x 週	3	5
B	PBS/IL12	-3, 0, 3, 7	n/a	4.8	2x 週	3	5
C	αNK1.1/IL12	-3, 0, 3, 7	50ug	1.6	2x 週	3	5
D	αNK1.1/IL12	-3, 0, 3, 7	50ug	4.8	2x 週	3	5

【０２６３】

-3日目、0日目、3日目、および7日目にPBS/αNK1.1を投与した。0日目、4日目、および8日目にIL12を投与した。動物の、生存可能な体重をモニタリングした。13日目に動物を　　殺した。研究の結果を図15に示した。示したデータから分かるように、体重減少により評価されるようにNK枯渇は毒性を軽減し、1.6ug IL-12WT Fc処置後の死亡を阻止する。NK細胞枯渇はまた4.8ugの用量での死亡率と罹患率を大幅に低減する。さらに、NK細胞枯渇は一過的であり、最後のNK枯渇用量後、d6にNK細胞は元に戻る。

【０２６４】

NK/CD8 T細胞枯渇研究S6-21-006による抗腫瘍効力および毒性の評価

IL Fc試験剤と組み合わせてNKおよびCD8T細胞枯渇に対する効果を評価するために第2の研究を行った。この研究では、マトリゲル中の約1x10^{6}個のMC38細胞を6～8週齢C57BL/6マウスに皮下移植した。腫瘍の平均体積が約85mm^{3}になった時にマウスを複数の群に無作為化した。これもまた、NK1.1抗体を用いてNK細胞を枯渇させた。CD8 T細胞を枯渇させた。抗体および試験剤を、以下の表15に示した研究デザインに従って投与した。枯渇効率を確認するために様々な時点でマウスから血を抜き取った。腫瘍体積および体重を週2回測定し、FACS分析のために研究の終わりに動物を　　殺した。

【０２６５】

(表１５)NK/CD8 T細胞枯渇研究デザインによる抗腫瘍効力および毒性の評価

群	処置	マウス	枯渇スケジュール（研究日）	IL12用量(ug)/頻度(/週)	IL12全用量
A	PBS	8	n/a	n/a	n/a
B	PBS+αNK1.1	5	-2, 0, 3, 6, 10, 14	n/a	n/a
C	PBS+ αCD8	5	-2, 0, 3, 6, 10, 14	n/a	n/a
D	IL12 wt Fc	8	n/a	1.6/1x	4
E	IL12 wt Fc+αNK1.1	8	-2, 0, 3, 6, 10, 14	1.6/1x	4
F	IL12 wt Fc+ αCD8	8	-2, 0, 3, 6, 10, 14	1.6/1x	4
G	IL12 3xAla Fc	8	n/a	48/2x	8
H	IL12 3xAla Fc+αNK1.1	8	-2, 0, 3, 6, 10, 14	48/2x	8
I	IL12 3xAla Fc+ αCD8	8	-2, 0, 3, 6, 10, 14	48/2x	8

【０２６６】

研究の結果を図16および図17に示した。図16に示したデータによって示されるようにNK細胞の枯渇は毒性を軽減する。このことから、NK細胞は、IL12剤で観察される毒性に寄与することが分かる。しかしながら、図17に示したように、NK細胞は抗腫瘍効力に比較的最小限にしか寄与しない。このデータは、CD8 T細胞の、偏りがある活性化と、NK細胞の低減した活性化を有するIL12 Fc剤(例えば、hP40Mポリペプチドを含むヘテロ二量体hIL12Fc)が癌の処置において有効であり、野生型p40ポリペプチドを含むIL12剤を用いて観察される毒性と比べて大幅に低減した毒性を有することを示している。

【０２６７】

B6、RAG2 KO、およびRAG2/CD132二重KOマウスにおけるIL12剤の評価

T細胞対NK細胞の活性化に関してhIL12Fcムテイン活性をさらに評価するために、B6マウス、RAG 2ノックアウトマウス、およびRAG2/CD132二重ノックアウトマウスにおいて、上記で評価したIL12および対照試験剤を用いて抗腫瘍効力研究を行った。B6マウスを、T細胞とB細胞を欠くRAG2ノックアウト(KO)マウス、およびT細胞とB細胞とNK細胞を欠くRAG2/CD132二重ノックアウトマウスに対する対照群として使用した。簡単に述べると、処置開始の11日前(-11日目)に、約1x10^6個のMC38細胞をマトリゲルに入れて皮下移植し、腫瘍体積が約120mm^{3}になった時に、以下の表16に記載のようにマウスを複数の処置群に無作為化した。以下の表16に記載のスケジュールに従って試験物品と対照を投与した。マウスの体重減少および腫瘍体積を週2回評価した。

【０２６８】

(表１６)Rag2およびRag2/CD132ノックアウトマウスにおけるIL12試験剤の評価

群	処置	IL12 用量 [ug]	用量 レジメン	ROA	マウス/群	IL12 用量数	遺伝子型
A	PBS	n/a	1x/週	腹腔内	5	n/a	wt B6
B	IL-12 WT Fc	0.8	1x/週	腹腔内	5	4	
C	IL-12 3xAla Fc	48	1x/週	腹腔内	5	4	
D	PBS	n/a	1x/週	腹腔内	8	n/a	Rag2 KO
E	IL-12 WT Fc	0.8	1x/週	腹腔内	8	4	
F	IL-12 3xAla Fc	48	1x/週	腹腔内	8	4	
G	PBS	n/a	1x/週	腹腔内	8	n/a	Rag2/CD132 二重 KO
H	IL-12 WT Fc	0.8	1x/週	腹腔内	8	4	
I	IL-12 3xAla Fc	48	1x/週	腹腔内	8	4	

【０２６９】

この研究の結果を図18に図示した。データから観察されるように、T 細胞の遺伝的損失はIL-12によって媒介される腫瘍管理を大幅に減らし、T、NK、およびILCの遺伝的損失はマウスをIL-12に対して完全に抵抗性にする。前述のデータと組み合わせると、これらの研究から、IL12の抗腫瘍効果はNK細胞の存在に依存せず、NK細胞活性化が低減しているヘテロ二量体IL12 Fcムテインは抗腫瘍効力を保持していることが証明される。

【０２７０】

組み合わせ研究:

新生物疾患処置における補助治療剤と組み合わせた本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインの活性を評価するために、本明細書において以前に述べられようにMC38腫瘍モデルにおいて、インターロイキン-2および抗PD1チェックポイントインヒビター分子と組み合わせてヘテロ二量体mIL12Fc代理ムテインを評価するために2つの研究を行った。研究デザインを以下の表17に示した。

【０２７１】

(表１７)MC38腫瘍モデルにおける抗PD1およびIL2ムテインと組み合わせたmIL12p40Mヘテロ二量体の評価

群	処置	用量 [ug]	レジメン	ROA	効力/群	用量の数
A	PBS		2x/週	腹腔内	8	
B	aPD1	200	2x/週	皮下	8	6
C	PEG-mREH	10	2x/週	皮下	8	6
D	IL-12 WT Fc	0.8	1x/週	腹腔内	8	4
E	IL-12 WT Fc/aPD-1	0.8/200	1x/週	腹腔内/皮下	8	4/6
F	IL-12 WT Fc/PEG-mREH	0.8/10	1x/週	腹腔内/皮下	8	4/6
G	IL-12 3xAla Fc	48	2x/週	腹腔内	8	6
H	IL-12 3xAla Fc/aPD-1	48/200	2x/週	腹腔内/皮下	8	6/6
I	IL-12 3xAla Fc/PEG-mREH	48/10	2x/週	腹腔内/皮下	8	6/6

【０２７２】

成熟野生型hIL2に従って番号付けられた位置18、22、および126にアミノ酸置換を含むヒトIL2ムテイン、特に、アミノ酸置換L18R/Q22E/Q126Kを含むhIL2ムテインについて、げっ歯類(マウス)環境と霊長類(ヒト)環境の間の活性を相関させるためにマウスにおけるインビボ研究用にマウスIL2ムテインを開発した。この研究において使用したマウスIL2(mIL2)ポリペプチドのアミノ酸配列は

APTSSSTSSSTAEAQQQQQHLEQLRMDLEELLSRMENYRNLKLPRML

TFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFIS

NIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCHSIISTSPQ

(SEQ ID NO: 181)

であり、リンカーを用いて40kD分枝鎖PEGによってN末端PEG化され、PEG-mREHと呼ばれる。この研究の結果を図19(PD1)および図20(mIL2ムテイン)に示した。これらの図に示したデータから分かるように、ヘテロ二量体Fc P40Mムテインの組み合わせは、このモデルにおいて抗腫瘍効果を増強させる。特に、ヘテロ二量体Fc P40Mムテインと抗PD1抗体の組み合わせは、完全寛解につながる有意に増強した効果を示す。図には示していないが、ヘテロ二量体野生型IL12 Fcと抗PD1抗体の組み合わせは、このモデルにおいてヘテロ二量体野生型IL12 Fcを用いて以前に観察された毒性を軽減することが観察された。前述のデータから、本開示のヘテロ二量体hIL2 IL12ムテインは、補助治療剤、特にIL2、IL2ムテイン、およびチェックポイントインヒビター、例えば、抗PD1抗体と組み合わせて新生物疾患を処置するのに有用であることが証明される。

【０２７３】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインの合成

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインはポリペプチドを含む。しかしながら、一部の態様では、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインはPEG分子などの非ペプチジル成分を含む。タンパク質をPEG化するためのプロセスは本明細書中の他の箇所で議論される。以下は、hP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットを含む、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインのポリペプチド成分の合成、ならびに本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインの組換え産生に関する。

【０２７４】

固相合成

以下は、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのポリペプチドhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcドメインの固相合成および組換え合成を可能にするための指導を提供する。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの一部だけがポリペプチドである態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチジルドメインは、望ましいヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの合成を完了するためにさらなる処理を受ける可能性がある、プロセスの中間体であると理解される。

【０２７５】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインは、下記でさらに詳細に説明されるような組換え合成または固相合成を含む、ポリペプチド構築のための従来の方法論によって産生されてもよい。

【０２７６】

化学合成

組換え分子生物学的技法によって変えられている核酸分子の発現を介して変異ポリペプチドを作製することに加えて、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインを化学合成することができる。化学合成ポリペプチドは当業者によって日常的に作製される。化学合成には、説明された特性を示すヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインの化学的手段による直接的なペプチド合成が含まれる。この方法は、特定の分子(例えば、PEG)の連結を容易にする望ましい位置に天然アミノ酸および非天然アミノ酸を組み込むことができる。

【０２７７】

一部の態様では、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインは化学合成によって調製することができる。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインの化学合成は液相を介して進行してもよく、固相を介して進行してもよい。固相ペプチド合成(SPPS)を用いると、非天然アミノ酸および/またはペプチド/タンパク質バックボーン改変の組み込みが可能になる。本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインを合成するために様々な種類のSPPSを利用することができ、当技術分野において公知である(例えば、Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10;およびCamarero J.A. et al., (2005) Protein Pept Lett. 12:723-8)。アミド結合を連結する条件下で安定しているが、形成したペプチド鎖を損なうことなく容易に切断することができる酸不安定基または塩基不安定基によって、化学合成中にα官能基および任意の反応性側鎖が保護されることがある。

【０２７８】

固相合成では、N末端アミノ酸またはC末端アミノ酸のいずれかが適切な支持体材料に結合され得る。適切な支持体材料は、合成プロセスの段階的な縮合反応および切断反応のための試薬および反応条件に対して不活性であり、かつ使用されている反応培地に溶解しないものである。市販されている支持体材料の例には、反応基および/またはポリエチレングリコールを用いて修飾されているスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー;クロロメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマー;ヒドロキシメチル化またはアミノメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマーなどが含まれる。ペプチド合成、典型的には自動ペプチド合成機における従来の方法に従って保護アミノ酸の連続結合を行うことができる。

【０２７９】

固相合成の終了時に、側鎖保護基が同時に切断されながら、ペプチドが支持体材料から切断される。得られたペプチドは、疎水性吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー(distribution chromatography)、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、および逆相HPLCを含むが、これに限定されない様々なクロマトグラフィー法によって精製することができる。

【０２８０】

組換え産生

本開示のヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP40MFcおよびhp35Fcサブユニット、またはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFcおよびhp19Fcサブユニット、または完全なヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインはDNA技術によって産生されてもよい。ポリペプチドの組換え産生の典型的な実施では、望ましいポリペプチドをコードする核酸配列が、発現が行われる宿主細胞に適した発現ベクターに組み込まれ、この核酸配列は、ベクターによってコードされる1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結され、標的宿主細胞において機能する。組換えタンパク質は、宿主細胞を破壊することによって回収されてもよく、分泌リーダー配列(シグナルペプチド)がポリペプチドの中に組み込まれているのであれば細胞培地から回収されてもよい。組換えタンパク質は、組み込みを含むさらなる使用のために精製および濃縮されてもよい。

【０２８１】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcドメインをコードする核酸配列の合成

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインは、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメイン(またはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインを含む融合タンパク質)をコードする核酸配列を用いた組換え方法によって産生される。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの望ましいhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインをコードする核酸配列はオリゴヌクレオチド合成機を用いて化学的手段によって合成することができる。

【０２８２】

本開示の核酸分子は、ポリペプチドをコードする配列に限定されない。コード配列(例えば、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインのコード配列)から上流または下流にある非コード配列の一部または全ても含まれる場合がある。分子生物学の当業者は、核酸分子を単離するための日常的な手順に精通している。例えば、核酸分子は、ゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼで処理することによって、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによって作製することができる。核酸分子がリボ核酸(RNA)である場合、分子は、例えば、インビトロ転写によって産生することができる。

【０２８３】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、

hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメイン(およびその融合)をコードする核酸分子は天然配列を含んでもよく、天然で生じるものとは異なるが、遺伝暗号縮重のために、同じポリペプチドをコードする配列を含んでもよい。これらの核酸分子は、RNAまたはDNA(例えば、ゲノムDNA、cDNA、もしくは合成DNA、例えば、ホスホルアミダイトベースの合成によって生成されたもの)、またはこれらのタイプの核酸の中にあるヌクレオチドの組み合わせもしくは修飾からなってもよい。さらに、核酸分子は二本鎖でもよく、一本鎖(すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれか)でもよい。

【０２８４】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドドメインをコードする核酸配列は、核酸配列のカスタム合成を提供する様々な商業的供給業者から得られる場合がある。本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットのアミノ酸配列バリアントは、適切なヌクレオチド変化を、当技術分野において周知の遺伝暗号に基づいてコード配列に導入することによって調製される。このようなバリエーションは、言及されたように残基の挿入、置換、および/または指定された欠失である。最終構築物に到達するために挿入、置換、および/または指定された欠失の任意の組み合わせを加えることができる。但し、最終構築物が、本明細書において定義されるように望ましい生物学的活性を有する。

【０２８５】

一部の態様では、野生型ヒトp40シグナルペプチドとhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列は、SEQ ID NO:94、97、99、100、102、105、118、120、126、128、131、134、137、140、143、146、149、および152からなる群より選択される。

【０２８６】

一部の態様では、野生型ヒトp35シグナルペプチドとhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列は、SEQ ID NO:95、96、98、103、104、106、および123からなる群より選択される。

【０２８７】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35FcポリペプチドサブユニットをコードするDNA配列を構築するための方法、および適切に形質転換された宿主において、これらの配列を発現するための方法には、PCR支援による変異誘発法の使用が含まれるが、これに限定されない。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットに対するアミノ酸残基の欠失または付加からなる変異も標準的な組換え法を用いて加えることができる。欠失または付加の場合、任意で、適切な制限エンドヌクレアーゼによって消化される、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットをコードする核酸分子。結果として生じた断片は直接発現されてもよく、例えば、第2の断片に連結することでさらに操作されてもよい。核酸分子の2つの末端が、互いに重複する相補的ヌクレオチドを含有すれば、連結は容易になるかもしれないが、平滑末端化された断片も連結することができる。様々な変異配列を作製するために、PCRにより作製された核酸も使用することができる。

【０２８８】

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットは、組換えにより、直接的だけでなく、異種ポリペプチド、例えば、シグナルペプチド、またはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットの N末端もしくはC末端において特異的な切断部位を有する他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても産生されてもよい。一般的に、シグナル配列ペプチドをコードする核酸配列はベクターの一成分でもよく、ベクターに挿入さ

れるコード配列の一部分でもよい。異種シグナル配列が使用されるのであれば、好ましくは、宿主細胞によって認識およびプロセシングされる(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)シグナルペプチドである。

【０２８９】

一部の態様では、シグナルペプチドは、ヒト血清アルブミンシグナルペプチド、プロラクチンアルブミンシグナルペプチド、ヒトIL2シグナルペプチド、ヒトトリプシノゲン-2、ヒトCD-5、ヒト免疫グロブリンκ軽鎖、ヒトアズロシジン、ガウシア(Gaussia)ルシフェラーゼ、およびその機能的誘導体からなる群より選択される。シグナルペプチドを用いて分泌効率を増加させるための特定のアミノ酸置換が、Stern, et al. (2007) Trends in Cell and Molecular Biology 2:1-17およびKober, et al. (2013) Biotechnol Bioeng. 1110(4):1164-73に記載されている。または、シグナルペプチドは、確立した原理に従って調製された合成配列でもよい。例えば、Nielsen, et al. (1997) Protein Engineering 10(1):1-6 (Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites); Bendtsen, et al (2004) J. Mol. Biol 340(4):783-795 (Improved Prediction of Signal Peptides SignalP 3.0); Petersen, et al (2011) Nature Methods 8:785-796 (Signal P 4.0; discriminating signal peptides from transmembrane regions)を参照されたい。

【０２９０】

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体IL23Fcムテインのhp40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットのシグナルペプチドは、それぞれ、天然のhP40、hP19、およびhP35シグナルペプチド(すなわち、ヒトhP40、hP19、およびhP35シグナル配列)である。一部の態様では、hP35Fc配列のシグナルペプチドは、アミノ酸配列

MCPARSLLLVATLVLLDHLSLA (SEQ ID NO: 179)

を有する天然の野生型ヒトp35配列である。一部の態様では、hP40MFc配列のシグナルペプチドは、アミノ酸配列

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA (SEQ ID NO: 180)

を有する天然の野生型ヒトp40配列である。

【０２９１】

シグナルペプチドの取り込みは、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインが作られる組換え細胞から、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを分泌することが望ましいかどうかに左右される。選択された細胞が原核生物であれば、一般的に、DNA配列はシグナル配列をコードしないことが好ましい。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを発現させるための宿主細胞が真核生物である場合、hP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットのシグナルペプチドは、それぞれ、天然のhP40、hP19、およびhP35シグナルペプチド(すなわち、ヒトhP40、hP19、およびhP35シグナル配列)である。または、異種の哺乳動物シグナル配列、例えば、同じ種または関連する種の分泌ポリペプチドに由来するシグナル配列、ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルペプチドが適切な場合がある。組換え宿主細胞が、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)などの酵母細胞である場合、Singh, 米国特許第7,198,919B1号に記載のように、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン、またはそのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットの1つもしくは複数を培養培地に細胞外分泌するためにα接合因子分泌シグナル配列が用いられる場合がある。

【０２９２】

ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインまたはそのh

P40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットの1つもしくは複数がキメラ(例えば、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインまたはそのhp40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットと、異種ポリペプチド配列を含む融合タンパク質)として発現される場合には、キメラタンパク質は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインまたはそのhp40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットのポリペプチドドメインの全てまたは一部をコードする第1の配列と、異種ポリペプチドの全てまたは一部をコードする第2の配列を含むハイブリッド核酸分子によってコードされてもよい。例えば、本明細書に記載の、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインまたはそのhp40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットのポリペプチドドメインはキレート化ペプチドと融合されてもよい。1986年2月11日に発行されたSmithらの米国特許第4,569,794号に記載のように、キレート化ペプチドを組み込むと、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー(IMAC)による精製が容易になる。本開示の実施において有用なキレート化ペプチドの例は、Smithら、前記およびDobeliら、1995年5月10日に発行された米国特許第5,320,663号に記載されている。本開示の実施において有用な特定の遷移金属キレート化ペプチドは、3～6個の連続したヒスチジン残基を含むポリペプチド、例えば、6ヒスチジン$(His)_6$ペプチドであり、当技術分野では「His-タグ」と言及されることが多い。または、真核細胞において発現されたタンパク質の精製を容易にするためにキメラタンパク質に血球凝集素タグが組み込まれてもよい。第1および第2は、融合タンパク質の要素の方向に対する限定であると理解されてはならず、異種ポリペプチドは、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインのポリペプチドドメインの N末端および/またはC末端に連結することができる。例えば、N末端は標的化ドメインに連結されてもよく、C末端はヘキサヒスチジンタグ精製ハンドル(purification handle)に連結されてもよい。

【0293】

発現しようとする、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインのp40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニット(または融合/キメラ)のアミノ酸配列を用いて、逆翻訳された(back-translated)遺伝子を構築することができる。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインのp40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットをコードするヌクレオチド配列を含有するDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、望ましいポリペプチドの部分をコードする、いくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成し、次いで、連結することができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には、相補的な組み立てのために5'オーバーハングまたは3'オーバーハングを含有する。

【0294】

一部の態様では、本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインのhp40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットをコードする核酸配列は、特定の宿主細胞タイプにおける発現を容易にするように「コドン最適化」されてもよい。哺乳動物宿主細胞、酵母宿主細胞、および細菌宿主細胞を含む多種多様な発現系においてコドン最適化するための技法は当技術分野において周知であり、様々な宿主細胞タイプにおいて発現させるためにコドン最適化配列を提供するためのオンラインツールがある。例えば、Hawash, et al., (2017) 9:46-53およびMauro and Chappell in Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells: Methods and Protocols, David Hacker 編(Human Press New York)を参照されたい。さらに、コドン最適化核酸配列の調製を助けるために自由に利用できる様々なウェブベースのオンラインソフトウェアパッケージがある。

【0295】

制御エレメント

上記で提供されるように調製された、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインのhp40MFcおよびhp35Fcサブユニット(またはヘテロ二量体hIL23Fcムテインのhp40MFcおよびh

p19Fcサブユニット)をコードする核酸配列は、発現ベクターによって形質転換しようとする宿主細胞においてポリペプチドを発現させることができる適切な遺伝子制御エレメントに機能的に連結される。「機能的に連結された」という用語は、機能的な関係にあるポリヌクレオチドエレメントの連結を指す。核酸配列は別の核酸配列と機能的な関係に置かれている時に「機能的に連結され」ている。例えば、プロモーターは、ポリペプチドの転写を制御すればコード配列に機能的に連結されている。リボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように配置されていればコード配列に機能的に連結されており、シグナルペプチドをコードする核酸は、融合タンパク質として発現され、融合タンパク質を細胞膜に向けるのに、またはポリペプチド分泌に関与していれば、このようなポリペプチドをコードする核酸配列に機能的に連結されている。典型的に、機能的に連結されているヌクレオチド配列は隣接している。しかしながら、エンハンサーがプロモーターから数キロベース隔てられている時に、おおむね機能し、イントロン配列の長さが変化することがあるので、一部のポリヌクレオチドエレメントは機能的に連結されているが、物理的に離れている場合があり、異なる対立遺伝子または染色体からトランスでも機能する場合がある。

【０２９６】

発現を引き起こすのに必要な特定のタイプの制御エレメントは、形質転換しようとする細胞タイプに左右される。本発明の実施において、形質転換しようとする細胞は哺乳動物T細胞である。制御エレメントという用語は、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、配列内リボソーム進入部位(「IRES」)、エンハンサー、mRNA発現レベルを上げるための転写エンハンサー、適切なリボソーム結合部位をコードする配列、ならびにレシピエント細胞においてポリペプチドコード配列の複製、転写、および翻訳に影響を及ぼす転写および翻訳を終結する配列を総称して指している。発現ベクターはまた、通常、このベクターが宿主細胞とは独立して複製するのを可能にする複製起点も含有する。

【０２９７】

プロモーター

一態様では、発現しようとする(例えば、hP40MFcおよび/またはhP35Fcをコードする)核酸配列はプロモーター配列に機能的に連結される。「プロモーター」という用語は、コード配列の転写の開始および速度が制御される場所にあるヌクレオチド配列を指すために従来の意味で用いられる。プロモーターは、RNAポリメラーゼが結合し、調節因子(例えば、リプレッサーまたは転写因子)が結合するための部位も含有する部位を含有する。プロモーターは天然でもよく合成でもよい。プロモーターは構成的に活性でもよく、外部刺激に応答して活性化されてもよく(誘導性)、特定の細胞タイプまたは細胞状態において活性でもよい(組織特異的または腫瘍特異的)プロモーター、および/または調節可能なプロモーター。「誘導性プロモーター」という用語は、好ましくは(または、もっぱら)ある特定の条件下で、および/または外部の化学的刺激もしくは他の刺激に応答して生理活性ポリペプチドの転写を容易にするプロモーターを指す。誘導性プロモーターの例は科学文献において公知である(例えば、Yoshida et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 230:426-430 (1997); Iida et al., J. Virol., 70(9): 6054-6059 (1996); Hwang et al., J. Virol., 71(9): 7128-7131 (1997); Lee et al., Mol. Cell. Biol., 17(9): 5097-5105 (1997);およびDreher et al., J. Biol. Chem., 272(46): 29364-29371 (1997)を参照されたい)。放射線誘導性プロモーターの例にはEGR-1 プロモーターが含まれる。Boothman et al., volume 138, supplement pages S68-S71 (1994)。

【０２９８】

例えば、本開示のヘテロ二量体hIL12ムテイン(もしくはヘテロ二量体hIL23ムテイン)をコードする核酸配列(またはそれを含むベクター)が対象に投与される一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12ムテイン(もしくはヘテロ二量体hIL23ムテイン)をコードする核酸配列は組織特異的プロモーターに機能的に連結されている。組織特異的プロモーターを使用すると特定の組織タイプまたは細胞タイプにおいて発現が強化される。一部の態様で

は、プロモーターは腫瘍特異的プロモーターである。組織特異的プロモーターおよび腫瘍特異的プロモーター、例えば、膵臓特異的プロモーター(Palmiter et al., Cell, 50:435 (1987))、肝臓特異的プロモーター(Rovet et al., J. Biol. Chem., 267:20765 (1992); Lemaigne et al., J. Biol. Chem., 268:19896 (1993); Nitsch et al., Mol. Cell. Biol., 13:4494 (1993))、胃特異的プロモーター(Kovarik et al., J. Biol. Chem., 268:9917 (1993))、下垂体特異的プロモーター(Rhodes et al., Genes Dev., 7:913 (1993))、および前立腺特異的プロモーター(Hendersonら、1997年12月16日に発行された米国特許第5,698,443号)が当技術分野において周知である。本発明の一部の態様では、hp35Fcおよび/またはhP40MFc配列をコードする核酸配列はヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターに機能的に連結される。

【０２９９】

マルチシストロニック(multicistronic)発現構築物

本発明の実施においてマルチサブユニットタンパク質を発現する時に、それぞれのポリペプチドサブユニットが発現制御配列(モノシストロニック)に機能的に連結されてもよく、複数のポリペプチドが単一の発現制御配列の制御下で発現されるポリシストロニック構築物によって複数のポリペプチドがコードされてもよい。ポリシストロニック発現を容易にするのに使用され得るエレメントの例は、配列内リボソーム進入部位(IRES)エレメントまたは口蹄疫ウイルスタンパク質2A(FMVD2A)系である。多種多様なIRES部位が公知である(例えば、Doudna JA, Sarnow P. Translation initiation by viral internal ribosome entry sites. In: Translational Control in Biology and Medicine; Mathews et al, Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007. pp. 129-154; http://www.IRESite.orgを参照されたい)。IRESエレメントの例には、ポリオウイルス、ライノウイルス、脳心筋炎(encepahlomyocardits)ウイルスのピコルナウイルスIRES、口蹄疫ウイルスのアフトウイルスIRES、IRESコオロギ麻痺ウイルス(cricket paralysis virus)(CrPV)、A型肝炎ウイルスのA型肝炎IRES、C型肝炎ウイルスのC型肝炎IRES、ブタ発熱またはウシ下痢ウイルスのペスチウイルスIRES、クリパウイルス(cripavirus)IRES、および哺乳動物IRESエレメント、例えば、線維芽細胞増殖因子-1 IRES、線維芽細胞増殖因子-2 IRES、PDGF IRES、VEGF IRES、IGF-2 IRESが含まれる。IRESエレメントの使用は、典型的に、ポリシストロニックメッセージの第2のタンパク質の有意に低い発現をもたらす。FMDV2A系の使用は下流タンパク質のより効率的な産生をもたらす。なぜなら、複数のタンパク質が、ポリタンパク質を切断して機能的サブユニットにする自己タンパク質分解(autoproteolytic)FMDV2Aドメインを含有する融合タンパク質として最初に発現されるからである。Ryan and Drew (1994) EMBO J. 13(4):928-933。特に、制限エンドヌクレアーゼ部位を容易にするための、ポリシストロニックなコード配列の構築に応じて、FMDV2A系の使用は上流タンパク質のカルボキシ末端への少数のアミノ酸の付加を頻繁にもたらす可能性がある。

【０３００】

ヘテロ二量体hIL23Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードするバイシストロニック核酸配列を調製する際に、哺乳動物宿主細胞においてサブユニットを同時発現させるために、本開示のヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFcおよびhP19Fcサブユニットをコードする核酸配列、またはヘテロ二量体hIL12FcムテインのhP40MFcおよびhp35Fcサブユニットをコードする核酸配列がバイシストロニック発現カセットの中に設けられてもよい。一部の態様では、本開示は、以下に示したように並べられたバイシストロニック核酸を提供する:

5’-hP40MFc-P2A-hP35Fc-3’

5’-hP35Fc-P2A-hP40MFc-3’

5’-hP40Fc-IRES-hP35Fc-3’

5’-hP35Fc-IRES-hP40MFc-3’

5’-hP40MFc-T2A-hP35Fc-3’

5’-hP35Fc-T2A-hP40MFc-3’
5’-hP40MFc-P2A-hP19Fc-3’
5’-hP19Fc-P2A-hP40MFc-3’
5’-hP40Fc-IRES-hP19Fc-3’
5’-hP35Fc-IRES-hP40MFc-3’
5’-hP40Fc-T2A-hP19Fc-3’、および
5’-hP35Fc-T2A-hP40MFc-3’。

【０３０１】

ベクター

(合成、部位特異的変異誘発、または別の方法によって)組み立てられたら、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインのポリペプチドドメインの P40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットの発現カセットをコードする核酸配列はベクターに挿入される。様々な宿主細胞において使用するための様々な発現ベクターが利用可能であり、典型的には、発現用の宿主細胞に基づいて選択される。発現ベクターには、典型的に、以下:複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列の1つまたは複数を含むが、これに限定されない。ベクターには、ウイルスベクター、プラスミドベクター、組み込みベクターなどが含まれる。プラスミドは非ウイルスベクターの例である。組換えポリペプチドの効率的な発現を容易にするために、発現させようとするポリペプチド配列をコードする核酸配列は、選択された発現宿主において機能する転写調節制御配列および翻訳調節制御配列に機能的に連結される。

【０３０２】

発現ベクターは、典型的に、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含有する。この遺伝子は、選択培養培地中で増殖させた形質転換宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含有するベクターで形質転換されなかった宿主細胞は培養培地中で生存しない。代表的な選択遺伝子は、(a)抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、もしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、(b)栄養要求性の欠陥を補うタンパク質、または(c)複合培地から利用できない重要な栄養分を供給するタンパク質をコードする。

【０３０３】

本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットのための発現ベクターは、宿主生物によって認識され、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットをコードする核酸配列に機能的に連結された調節配列を含有する。「調節制御配列」、「調節配列」、または「発現制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を指すために本明細書において互換的に用いられる。例えば、Goeddel (1990) in Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego CA USAを参照されたい。調節配列には、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を誘導する調節配列、およびある特定の宿主細胞でしかヌクレオチド配列の発現を誘導しない調節配列(例えば、組織特異的調節配列)が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換しようとする宿主細胞の選択、望ましいタンパク質の発現レベルなどの要因に左右される場合があることが当業者により理解される。発現制御配列の選択において、当業者により理解される様々な要因を考慮しなければならない。これらには、例えば、配列の相対強度、その制御性、特に、潜在的な二次構造についていえば、対象であるヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、またはhP35Fcポリペプチドサブユニットをコードする実際のDNA配列との適合性が含まれる。

【０３０４】

一部の態様では、調節配列はプロモーターであり、プロモーターは、例えば、発現が求

められている細胞タイプに基づいて選択される。プロモーターは、機能的に連結された特定の核酸配列の転写および翻訳を制御する、構造遺伝子の開始コドンの上流(5')に位置する(一般的に、約100～1000bp以内にある)非翻訳配列である。このようなプロモーターは典型的には2つのクラス、誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターに分けられる。誘導性プロモーターは、培養条件の何らかの変化、例えば、栄養分の存在もしくは非存在または温度変化に応答して、誘導性プロモーターの制御下にあるDNAから高レベルの転写を開始するプロモーターである。様々な潜在的な宿主細胞により認識される多数のプロモーターが周知である。

【0305】

T7プロモーターは細菌において使用することができ、ポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞において使用することができ、サイトメガロウイルスまたはメタロチオネインプロモーターは哺乳動物細胞において使用することができる。同様に、高等真核生物の場合、組織特異的プロモーターおよび細胞タイプ特異的プロモーターが広く利用することができる。これらのプロモーターは、体内にある、ある特定の組織または細胞タイプにおいて核酸分子の発現を誘導する能力に因んでこのように命名された。当業者は、核酸発現を誘導するのに使用することができる非常に多くのプロモーターおよび他の調節エレメントをよく知っている。

【0306】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ウイルス、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(例えば、ヒトアデノウイルス血清型5)、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス(例えば、マウス幹細胞ウイルス)、B型肝炎ウイルス、最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40)のゲノムから得られたプロモーター、異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーター、PGK(ホスホグリセリン酸キナーゼ)、または免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターから得られたプロモーターが宿主細胞系と適合するのであれば、このようなプロモーターによって制御されてもよい。好都合なことに、SV40ウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として得られる。

【0307】

高等真核生物による転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増加することが多い。エンハンサーは、通常、約10～300bpのシス作用DNAエレメントであり、転写を増加させるようにプロモーターに作用する。エンハンサーは、比較的、方向と位置に依存せず、転写単位に対して5'側および3'側、イントロン内、コード配列そのものの内部にあることが見出されている。今や、哺乳動物遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン、およびインシュリン)に由来する多くのエンハンサー配列が知られている。しかしながら、通常、真核細胞ウイルスに由来するエンハンサーが使用される。例には、複製起点の後期側にあるSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーはスプライスされて、発現ベクターのコード配列の位置5'側または3'側に入れられてもよく、好ましくは、プロモーターから部位5'側に配置される。真核生物宿主細胞において用いられる発現ベクターは、転写終結に必要な配列およびmRNAの安定化に必要な配列も含有する。このような配列は、一般的に、真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域、場合によっては3'非翻訳領域から入手することができる。上記で列挙した成分の1つまたは複数を含有する適切なベクターの構築では標準的な技法を使用する。

【0308】

挿入された核酸分子の転写を容易にする配列に加えて、ベクターは、複製起点、および選択マーカーをコードする他の遺伝子を含有してもよい。例えば、ネオマイシン耐性(neoR)遺伝子は、ネオマイシン耐性(neoR)遺伝子が発現された細胞に対してG418耐性を付与し、従って、トランスフェクトされた細胞の表現型選択を可能にする。マーカーまた

はレポーター遺伝子のさらなる例には、βラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ(HPH)、チミジンキナーゼ(TK)、lacZ(β-ガラクトシダーゼをコードする)、およびキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(XGPRT)が含まれる。当業者は、ある特定の調節エレメントまたは選択マーカーが、特定の実験状況での使用に適しているかどうか容易に判定することができる。発現ベクターが正しく組み立てられていることは、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピング、および適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現によって確認することができる。

【０３０９】

本開示の一部の態様では、CMVプロモーターと、hP35FcおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現カセットがpCDNA3.4哺乳動物発現ベクター(Life Technologies, Carlsbad, CA)に挿入される。本開示の一部の態様では、実施例1の開示に従って調製されるように、CMVプロモーターと、hP35FcおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現カセットがpExSyn2.0発現ベクターのマルチプルクローニングサイトに挿入される。

【０３１０】

宿主細胞

さらに、本開示は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットをコードする核酸分子を含有および発現する原核細胞または真核細胞を提供する。本開示の細胞は、トランスフェクトされた細胞、すなわち、核酸分子、例えば、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットをコードする核酸分子が組換えDNA法によって導入されている細胞である。このような細胞の子孫も本開示の範囲内であるとみなされる。

【０３１１】

宿主細胞は、典型的には、選択された発現ベクターとの適合性、DNA配列によってコードされる産物の毒性、分泌特性、ポリペプチドを正しく折り畳む能力、発酵または培養の要件、およびDNA配列によってコードされる産物の精製のしやすさに従って選択される。本明細書においてベクター中のDNAをクローニングまたは発現するための適切な宿主細胞は原核細胞、酵母細胞、または高等真核細胞である。

【０３１２】

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23FcムテインのhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットならびにその生物学的に活性なバリアントおよび断片は酵母またはヒト細胞などの真核生物でも作製することができる。適切な真核宿主細胞には、昆虫細胞(培養昆虫細胞(例えば、Sf9細胞)中でのタンパク質発現に利用可能なバキュロウイルスベクターの例には、pAcシリーズ(Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165)およびpVLシリーズ(Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39)が含まれる);酵母細胞(酵母S.セレビシエ(S.cerevisiae)における発現用のベクターの例には、pYepSecl(Baldari et al. (1987) EMBO J. 6:229-234)、pMFa(Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、および pPicZ (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)が含まれる);または哺乳動物細胞(哺乳動物発現ベクターには、pCDM8(Seed (1987) Nature 329:840) および pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187:195)が含まれる)が含まれる。

【０３１３】

有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、マウスL細胞(L-M[TK-], ATCC#CRL-2648)、Expi293細胞、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胎児由来腎臓細胞(HEK293細胞または懸濁培養での増殖のためにサブクローニ

ングされたHEK293細胞;ベビーハムスター腎臓細胞(BHK, ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR(CHO);マウスセルトリ細胞(TM4);サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1 587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34);バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065);マウス乳房腫瘍(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI細胞;MRC5細胞;FS4細胞;およびヒトヘパトーム株(HepG2)である。哺乳動物細胞では、発現ベクターの制御機能はウイルス調節エレメントによって提供されることが多い。例えば、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。

【０３１４】

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインの組換えhP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドサブユニットは、hP40MFc、hP19Fc、およびhP35Fcポリペプチドを産生するのに用いられた宿主生物に応じてグリコシル化されてもよく、無グリコシルされてもよい。

【０３１５】

トランスフェクション

発現構築物を宿主細胞に導入して、本明細書において開示されるヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの組換えポリペプチドドメインを産生するか、またはその生物学的に活性なムテインを産生することができる。従来の形質転換またはトランスフェクション法によってベクターDNAを原核細胞または真核細胞に導入することができる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)および他の標準的な分子生物学の実験マニュアルにおいて見られる。

【０３１６】

標的細胞のトランスフェクションを容易にするために、標的細胞は、非ウイルスベクターの取り込みを容易にする条件下で非ウイルスベクターを用いて直接曝露されてもよい。哺乳動物細胞による外来核酸の取り込みを容易にする条件の例は当技術分野において周知であり、化学的手段(例えば、Lipofectamine(登録商標), Thermo-Fisher Scientific)、高塩、および磁場(エレクトロポレーション)を含むが、これに限定されない。

【０３１７】

一部の態様では、hP35Fcをコードする核酸配列とhP40MFcをコードする核酸配列はそれぞれが別々の発現ベクターとして提供され、次いで、コトランスフェクションによって宿主細胞に導入される。一部の態様では、哺乳動物細胞において機能するプロモーターに機能的に連結されたhp35Fcをコードする核酸配列を含む第1の組換え発現ベクターと、哺乳動物細胞において機能するプロモーターに機能的に連結されたhP40MFcをコードする核酸配列を含む第2の組換え発現ベクターがコトランスフェクションによって哺乳動物宿主細胞に導入される。一部の態様では、第1の組換え発現ベクターと第2の組換え発現ベクターの、哺乳動物細胞において機能するプロモーターはCMVプロモーターである。一部の態様では、第1の組換え発現ベクターと第2の組換え発現ベクターはpCDNA3.4哺乳動物発現ベクター(Life Technologies, Carlsbad, CA)である。一部の態様では、第1の組換え発現ベクターと第2の組換え発現ベクターは、実施例1の開示に従って調製されるようなpExSyn2.0発現ベクターである。

【０３１８】

一部の態様では、本開示は、組換え哺乳動物宿主細胞において機能するプロモーターに機能的に連結されたhp35Fcをコードする核酸配列を含む第1の組換え発現ベクターと、組換え哺乳動物宿主細胞において機能するプロモーターに機能的に連結されたhP40MFcをコードする核酸配列を含む第2の組換え発現ベクターを含む、組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。一部の態様では、hp35Fcをコードする核酸配列とhP40MFcをコードする

核酸配列は、一部の態様では、シグナルペプチドをさらにコードする。一部の態様では、hp35Fcポリペプチドのシグナルペプチドは野生型ヒトp35シグナルペプチド(SEQ ID NO:179)である。一部の態様では、hP40MFcポリペプチドのシグナルペプチドは野生型ヒトp40シグナルペプチド(SEQ ID NO:180)である。一部の態様では、hp35FcおよびhP40MFcシグナルペプチドをコードする核酸配列。一部の態様では、組換え哺乳動物宿主細胞はCHO細胞および293細胞からなる群より選択される。一部の態様では、本開示は、CHO細胞において機能するプロモーターに機能的に連結されたhp35Fcをコードする核酸配列を含む第1の組換え発現ベクターと、CHO細胞において機能するプロモーターに機能的に連結されたhP40MFcをコードする核酸配列を含む第2の組換え発現ベクターを含む、組換えCHO細胞を提供する。一部の態様では、本開示は、CMVプロモーターに機能的に連結されたhp35Fcをコードする核酸配列を含む第1の組換え発現ベクターと、CMVに機能的に連結されたhP40MFcをコードする核酸配列を含む第2の組換え発現ベクターを含む、組換えCHO細胞を提供する。一部の態様では、第1の組換え発現ベクターと第2の組換え発現ベクターはpCDNA3.4哺乳動物発現ベクター(Life Technologies, Carlsbad, CA)である。一部の態様では、第1の組換え発現ベクターと第2の組換え発現ベクターは、実施例1の開示に従って調製されるようなpExSyn2.0発現ベクターである。一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:80、83、121、141、144、129、135、138、147、150、および153からなる群より選択されるhP40MFcをコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:81、82、および124からなる群より選択されるhP35 Fcをコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0319】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:80をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:81をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0320】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:121をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:124をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0321】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:83をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:82をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0322】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:141をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:124をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0323】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:144をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:124をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0324】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:129をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:124をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0325】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:147をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:82をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0326】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:150をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:82をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0327】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:153をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、 SEQ ID NO:82をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0328】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:135をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:124をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0329】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:138をコードする核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:124をコードする核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0330】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:94の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:95の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0331】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:120の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:123の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0332】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:97の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:96の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0333】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:140の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:123の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0334】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:143の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:123の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0335】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:128の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:123の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0336】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:146の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:96の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0337】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:149の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:96の核酸配列を含む第2の発現ベクタによって形質転換された宿主細胞を提供する。

【0338】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:152の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:96の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え

哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０３３９】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:134の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:123の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０３４０】

一部の態様では、本開示は、SEQ ID NO:137の核酸配列を含む第1の発現ベクターと、SEQ ID NO:123の核酸配列を含む第2の発現ベクターによって形質転換された組換え哺乳動物宿主細胞を提供する。

【０３４１】

細胞培養

細胞は、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または望ましい配列をコードする遺伝子の増幅のために適宜変更される従来の栄養培地の中で培養されてもよい。哺乳動物宿主細胞は様々な培地中で培養することができる。宿主細胞を培養するには、市販の培地、例えば、Ham'sF10(Sigma)、最小必須培地((MEM),Sigma)、RPMI1640(Sigma)、およびダルベッコ変法イーグル培地((DMEM), Sigma)が適している。これらのどの培地にも、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の増殖因子(例えば、インシュリン、トランスフェリン、もしくは上皮細胞増殖因子)、塩(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩)、緩衝液(例えば、HEPES)、ヌクレオシド(例えば、アデノシンおよびチミジン)、抗生物質、微量元素、ならびにグルコースまたは等価なエネルギー源を加えることができる。他の任意の必要なサプリメントも当業者に公知の適切な濃度で含めることができる。培養条件、例えば、温度、pHなどは、発現のために選択された宿主細胞と共に以前に用いられたものであり、当業者に明らかである。

【０３４２】

組換えタンパク質の回収

分泌リーダー配列が用いられれば、組換えにより産生されたポリペプチドは分泌ポリペプチドとして培養培地から回収することができる。または、組換えポリペプチドはまた宿主細胞溶解産物からも回収することもできる。精製中にタンパク質分解を阻害するために、細胞溶解産物からの回収期にフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)などのプロテアーゼインヒビターが用いられる場合があり、外因性の汚染物質の増殖を阻止するために抗生物質が含まれる場合がある。

【０３４３】

精製

様々な精製工程、例えば、アフィニティクロマトグラフィーが当技術分野において公知であり、利用される。アフィニティクロマトグラフィーでは、通常、生物学的高分子に存在する高度に特異的な結合部位を利用し、特定のリガンドに結合する能力がある分子を分離する。リガンドがタンパク質試料に明白に提示され、それによって、ある分子種の天然特異的結合を用いて混合物から第2の種が分離および精製されるようなやり方で、共有結合によってリガンドが不溶性の多孔性支持媒体に取り付けられる。アフィニティクロマトグラフィーでは抗体が一般的に用いられる。サイズ選択工程も用いられる場合があり、サイズに応じてタンパク質を分離するために、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー(サイズ排除クロマトグラフィーまたは分子ふるいクロマトグラフィーとも知られる)が用いられる。ゲル濾過では、半透性の多孔性樹脂が充填されたカラムにタンパク質溶液が通される。半透性樹脂は、カラムによって分離することができるタンパク質のサイズを決定する、ある範囲の孔径を有する。

【０３４４】

形質転換宿主によって産生されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの組換えポリペプチドドメインは任意の適切な方法に従って精製することができる。ヘテロ二量体hIL12Fcムテインおよびヘテロ二量体hIL23Fcムテインは、陽イオン交換、ゲル濾過、およびまたは逆相液体クロマトグラフィーを用いて、大腸菌

内で生じた封入体から単離されてもよく、ある特定のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを産生する哺乳動物または酵母培養物のいずれかに由来するコンディションドメディウムから単離されてもよい。組換えタンパク質が、前記で議論されたようにキレート化ペプチド、精製タグと共に発現される一部の態様では、この精製ハンドルは、改変された組換えタンパク質を細胞溶解産物または細胞培地から単離するのに用いられる場合がある。精製タグがキレート化ペプチドである場合、固定化された金属アフィニティクロマトグラフィーを用いて、このような分子を単離するための方法が当技術分野において周知である。例えば、Smithら、米国特許第4,569,794号を参照されたい。

【０３４５】

実質的に精製された形態のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを、例えば、本明細書に記載のように治療剤として使用することができる。前述に従って産生されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの生物学的活性は、競合ELISA、放射性リガンド結合アッセイ(例えば、飽和結合、スキャッチャードプロット、ノンリニアカーブフィッティングプログラム、および競合結合アッセイ);非放射性リガンド結合アッセイ(例えば、蛍光偏光(FP)、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)、および表面プラズモン共鳴アッセイ(例えば、Drescher et al., Methods Mol Biol 493:323-343 (2009)を参照されたい)と、GE Healthcare Bio-Sciencesから市販されている計測装置、例えば、Biacore 8+、Biacore S200、Biacore T200 (GE Healthcare Bio-Sciences, 100 Results Way, Marlborough MA 01752));液相リガンド結合アッセイ(例えば、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)、および免疫沈降);ならびに固相リガンド結合アッセイ(例えば、マルチウェルプレートアッセイ、オンビーズリガンド結合アッセイ、オンカラムリガンド結合アッセイ、およびフィルターアッセイ)を含むが、これに限定されない当技術分野において周知の手順を用いたアッセイによって確認することができる。

【０３４６】

薬学的製剤

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン(ならびに/あるいはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸、およびまたは核酸配列を組み込んでおり、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを発現するように改変された組換え細胞)は、薬学的組成物を含む組成物に組み込むことができる。一部の態様では、薬学的組成物は、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む。このような組成物は、典型的には、前記ポリペプチドまたは核酸分子と薬学的に許容される担体を含む。薬学的組成物は、その意図された投与経路と適合するように処方され、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインが、処置または予防を必要とする対象に投与される治療的用途と適合する。

【０３４７】

担体

担体には、滅菌した希釈剤、例えば、注射用水、食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒が含まれる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、ならびにその適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でもよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合は、必要とされる粒径を維持することによって、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウムを使用することによって維持することができる。静脈内投与の場合、適切な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL(商標)(BASF, Parsippany, N.J.)、またはリン酸緩衝食塩水(PBS)が含まれる。

【０３４８】

緩衝液

緩衝液という用語は、緩衝液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩、および張性を調節するための剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースを含む。pHは、酸または塩基、例えば、リン酸二水素ナトリウムおよび/またはリン酸水素ナトリウム、塩酸または水酸化ナトリウムを用いて(例えば、約7.2～7.8、例えば、7.5のpHに)調節することができる。

【０３４９】

分散液

一般的に、分散液は、活性化合物を、基本分散媒と、上記で列挙されたものに由来する必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み入れることによって調製される。滅菌注射液調製用の滅菌散剤の場合、好ましい調製方法は、有効成分と任意のさらなる望ましい成分の散剤を、その以前に滅菌濾過された溶液から生じる真空乾燥および凍結乾燥である。

【０３５０】

防腐剤

対象への非経口投与用の薬学的製剤は滅菌されていなければならず、簡単な注射可能性(syringability)を助けるように流動性がなければならない。これは製造および保管の条件下で安定でなければならず、汚染を防ぐように保存される。微生物の活動は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン;抗酸化物質、例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム;キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって阻止することができる。滅菌溶液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上記で列挙された成分の1つまたは組み合わせと一緒に適切な溶媒に組み入れ、その後に滅菌濾過することによって調製することができる。

【０３５１】

張性剤

多くの場合、前記組成物に等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含めることが好ましい。

【０３５２】

投与経路

一部の態様では、本開示の治療方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインならびに核酸、これを含むベクターまたは形質転換細胞を含む薬学的製剤の投与を伴う。他の態様では、本開示の治療方法は、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む薬学的製剤の投与を伴う。本開示の任意の薬学的組成物を、非経口投与、経口経路、局部経路、または吸入経路を含む様々な投与経路によって、処置または予防を必要とする対象に投与することができる。

【０３５３】

非経口投与

一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン(および/あるいはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸、またはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを発現する組換えにより改変された宿主細胞)を含む薬学的製剤の非経口投与を伴う。一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む薬学的製剤の非経口投与を伴う。非経口投与経路の例には、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経皮(局部)投与、経粘膜投与、および直腸投与が含まれる。非経口製剤は、非経口用途に用いられる溶液または懸濁液を含み、ビヒクル、担体、および緩衝液を含んでもよい。非経口投与用の薬学的製剤には、滅菌した水溶液(水溶性の場合)または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌散剤が含まれる。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックで作られたアンプル、使い捨て注射器、またはマルチドーズバイアルに入れることができる。一態様では、

製剤は、予め充填された注射器に入れられて提供される。

【０３５４】

経口投与

一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン(および/あるいはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸、またはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを発現する組換えにより改変された宿主細胞)を含む薬学的製剤の経口投与を伴う。一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む薬学的製剤の経口投与を伴う。経口組成物が使用されるのであれば、一般的に、不活性希釈剤または食用の担体を含む。経口治療剤投与の目的のために、活性化合物を賦形剤と組み込むことができ、錠剤、トローチ、またはカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形で使用することができる。経口組成物はまた、口腔洗浄薬として使用するための流体担体を用いて調製することもできる。薬学的に適合する結合剤、および/またはアジュバント材料を組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分:結合剤、例えば、結晶セルロース、トラガカントゴム、もしくはゼラチン;賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、Primogel(商標)、もしくはトウモロコシデンプン;潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotes(商標);流動化剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素;甘味剤、例えば、スクロースもしくはサッカリン;または着香剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香料、あるいは同様の性質の化合物のいずれを含有してもよい。

【０３５５】

吸入製剤

一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン(および/あるいはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸、またはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを発現する組換えにより改変された宿主細胞)を含む薬学的製剤の吸入投与を伴う。一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む薬学的製剤の吸入投与を伴う。吸入による投与の場合、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン、またはこれらをコードする核酸は、適切な噴霧剤、例えば、二酸化炭素などの気体を含有する加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形で送達される。このような方法は、米国特許第6,468,798号に記載の方法を含む。

【０３５６】

粘膜製剤および経皮製剤

一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン(および/あるいはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸、またはヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを発現する組換えにより改変された宿主細胞)を含む薬学的製剤の粘膜投与または経皮投与を伴う。一部の態様では、本開示の方法は、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含む薬学的製剤の粘膜投与または経皮投与を伴う。経粘膜投与または経皮投与の場合、透過しようとする障壁に適した浸透剤が製剤に用いられる。このような浸透剤は当技術分野において一般に知られており、例えば、経粘膜投与の場合、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、点鼻薬、または直腸送達の場合は坐剤(例えば、従来の坐剤基剤、例えば、カカオ脂および他のグリセリドを用いた座剤)もしくは停留浣腸を用いて成し遂げることができる。経皮投与の場合、活性化合物は、当技術分野において一般に知られるように軟膏、膏薬、ゲル、

またはクリームに処方され、エタノールまたはラノリンなどの透過強化剤を組み込んでもよい。

【０３５７】

長期放出およびデポー製剤

本開示の方法の一部の態様では、改変されたhIL-12p40ポリペプチドは、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを長期放出するための製剤の形で、処置を必要とする対象に投与される。注射用組成物の長期放出製剤の例は、組成物中に、吸収を遅延する剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることで引き起こすことができる。一態様では、対象であるヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインまたは核酸は、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを、身体からの急速な排出から守る担体、例えば、移植片およびマイクロカプセル化送達系を含む徐放製剤と一緒に調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤は標準的な技法を用いて調製することができる。この材料はまたAlza Corporation およびNova Pharmaceuticals, Incから商業的に入手することもできる。リポソーム懸濁液(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞に標的化されるリポソームを含む)も薬学的に許容される担体として使用できる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載のように当業者に公知の方法に従って調製することができる。

【０３５８】

改変されたhIL-12p40ポリペプチドをコードする核酸の投与

本開示の方法の一部の態様では、処置を必要とする対象への、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの送達は、改変されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸の投与によって成し遂げられる。対象に、改変されたヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸を投与するための方法は、McCaffrey et al. (Nature (2002) 418:6893)、Xia et al. (Nature Biotechnol. (2002) 20:1006-1010)、またはPutnam (Am. J. Health Syst. Pharm. (1996) 53: 151-160 erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. (1996) 53:325)に記載の方法を含むが、これに限定されない、当技術分野において公知の方法を用いたトランスフェクションまたは感染によって成し遂げられる。一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインは、哺乳動物対象において動作可能な1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結された、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターの薬学的に許容される製剤を投与することで対象に投与される。一部の態様では、特定の標的細胞タイプにおける、改変されたhILヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインの選択的発現を容易にするために、限られた範囲の細胞タイプ(またはシングル細胞タイプ)において動作可能な発現制御配列が選択され得る。一態様では、組換え発現ベクターはウイルスベクターである。一部の態様では、組換えベクターは組換えウイルスベクターである。一部の態様では、組換えウイルスベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)または組換えアデノウイルス(rAd)、特に、ヒトアデノウイルス血清型3および/または5に由来する複製欠損アデノウイルスである。一部の態様では、複製欠損アデノウイルスは、ウイルスがヒト細胞において細胞周期および/またはアポトーシス経路を開始する能力を妨害する、E1領域に対する1つまたは複数の改変を有する。複製欠損アデノウイルスベクターは、任意で、E3ドメインに欠失を含んでもよい。一部の態様では、アデノウイルスは複製コンピテントアデノウイルスである。一部の態様では、アデノウイルスは、標的細胞タイプにおいて選択的に複製するように操作された複製コンピテント組換えウイルスである。

【０３５９】

特に、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインを対象に投与するための、特に、対象において腸管の疾患または細菌感染症を処置するための一部の態様では、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸は、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする組換えにより改変されたバクテリオファージベクターの投与によって対象に送達され得る。本明細書で使用する「原核生物ウイルス」、「バクテリオファージ」、および「ファージ」という用語は、細菌に感染し、細菌内で複製する様々な任意の細菌ウイルスを説明するために本明細書において互換的に用いられる。バクテリオファージは原核細胞に選択的に感染し、そのため、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインの発現は対象では原核細胞に制限されると同時に、哺乳動物細胞での発現は回避される。広範囲の細菌細胞を選択できる多種多様なバクテリオファージが特定されており、科学文献において大規模に特徴付けられている。一部の態様では、ファージは隣接モチーフ(PAM)を除去するように改変される。ファージゲノムからCas9配列を排除すると、標的原核細胞のCas9エンドヌクレアーゼが、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする侵入ファージを無力化する能力が低減する。

【０３６０】

改変されたhIL-12p40ポリペプチドを発現する組換えにより改変された細胞の投与

本開示の方法の一部の態様では、処置を必要とする対象への、改変されたhIL-12p40ポリペプチドの送達は、本明細書に記載の治療用途および予防用途において投与され得る、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを発現するように改変された組換え宿主の投与によって成し遂げられる。一部の態様では、組換え宿主細胞は哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である。

【０３６１】

一部の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列(またはこれを含むベクター)は、投与用の組換えにより改変された宿主細胞において染色体外に維持されてもよい。他の態様では、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列は、細胞のゲノム配列への核酸配列の挿入を容易にするために少なくとも1種類のエンドヌクレアーゼを用いて、投与される宿主細胞のゲノムに組み込まれてもよい。本明細書で使用する「エンドヌクレアーゼ」という用語は、DNA分子またはRNA分子、好ましくはDNA分子の中にある核酸間結合の切断を触媒できる野生型酵素またはバリアント酵素を指すのに用いられる。このようなエンドヌクレアーゼが、長さが約12塩基対(bp)超、より好ましくは14～55bpのポリヌクレオチド認識部位を有する時に、エンドヌクレアーゼは「レアカッティング」エンドヌクレアーゼと呼ばれる。レアカッティングエンドヌクレアーゼは、遺伝子座において遺伝子を不活化するのに、または相同組換え(HR)によって、すなわち、遺伝子座においてDNA二本鎖切断(DSB)を誘導し、遺伝子修復機構により、この遺伝子座において外因性DNAを挿入することでトランスジーンを組み込むのに使用することができる。レアカッティングエンドヌクレアーゼの例には、ホーミングエンドヌクレアーゼ(Grizot, et al (2009) Nucleic Acids Research 37(16):5405-5419)、操作されたジンクフィンガードメインの融合に起因するキメラジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)(Porteus M and Carroll D., Gene targeting using zinc finger nucleases (2005) Nature Biotechnology 23(3):967-973)、TALEN-ヌクレアーゼ、クリスパーシステムに由来するCas9 エンドヌクレアーゼ、または延長された配列特異性(extended sequence specificity)に対する改変された制限エンドヌクレアーゼ(Eisenschmidt, et al. 2005; 33(22): 7039-7047)が含まれる。

【０３６２】

使用方法

<u>新生物疾患の処置</u>

本開示は、本明細書に記載のような治療有効量の、ヘテロ二量体hIL12Fcムテイン(またはヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする組換えベクターを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする核酸、ならびにヘテロ二量体hIL12Fcムテインを発現するように改変された真核細胞および原核細胞)の投与による、新生物性の疾患障害または

状態に罹患している対象の処置における本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインの使用方法を提供する。

【０３６３】

処置の対象となる新生物:

本開示の組成物および方法は、良性新生物および悪性新生物を含む新生物の存在を特徴とする新生物疾患、ならびに新生物疾患に罹患している対象の処置において有用である。

【０３６４】

本開示の組成物および方法を用いた処置の対象となる良性新生物の例には、腺腫、線維腫、血管腫、および脂肪腫が含まれるが、これに限定されない。本開示の組成物および方法を用いた処置の対象となる前悪性新生物の例には、過形成、異型、化生、および異形成が含まれるが、これに限定されない。本開示の組成物および方法を用いた処置の対象となる悪性新生物の例には、癌腫(皮膚または内臓を裏打ちする組織などの上皮組織から生じた癌)、白血病、リンパ腫、および典型的には骨、脂肪、筋肉、血管、または結合組織に由来する肉腫が含まれるが、これに限定されない。新生物という用語には、ウイルス誘発性の新生物、例えば、いぼ、およびEBV誘発性の疾患(すなわち、伝染性単核球症)、瘢痕形成、内膜平滑筋細胞過形成を含む過剰増殖性血管疾患、再狭窄、ならびに血管閉塞なども含まれる。

【０３６５】

「新生物疾患」という用語は、乳癌;肉腫(骨肉腫および血管肉腫および線維肉腫を含むが、これに限定されない)、白血病、リンパ腫、尿生殖器癌(卵巣癌、尿道癌、膀胱癌、および前立腺癌を含むが、これに限定されない);胃腸癌(結腸癌、食道癌、および胃癌を含むが、これに限定されない);肺癌;ミエローマ;膵臓癌;肝臓癌;腎臓癌;内分泌癌;皮膚癌;ならびに神経膠腫および神経芽細胞腫、星状細胞腫、骨髄異形成障害を含む、脳または中枢神経および末梢神経(CNS)系の腫瘍、悪性または良性;子宮頸部上皮内癌;腸ポリープ症;口腔白板症;組織球症、ケロイド瘢痕を含む過剰増殖性瘢痕、血管腫;過剰増殖性動脈狭窄、乾癬、炎症性関節炎;過角化症、および関節炎を含む丘疹鱗屑性発疹を含むが、これに限定されない固形腫瘍および非固形腫瘍を特徴とする癌を含む。

【０３６６】

新生物疾患という用語は癌腫を含む。「癌腫」という用語は、呼吸器系癌、胃腸系癌、泌尿生殖器系癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌、およびメラノーマを含む、上皮組織または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。新生物疾患という用語は腺癌を含む。「腺癌」とは、腺組織に由来する癌腫、または腫瘍細胞が、認識できる腺構造を形成する癌腫を指す。

【０３６７】

本明細書で使用する「造血性新生物障害」という用語は、造血由来の、例えば、骨髄球系列、リンパ球系列、もしくは赤血球系列、またはその前駆細胞から生じた過形成/新生物細胞を伴う新生物疾患を指す。

【０３６８】

骨髄性新生物には、骨髄増殖性新生物、好酸球増加を伴う骨髄球障害およびリンパ球障害、骨髄増殖性/骨髄異形成性新生物、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病および関連する前駆新生物、ならびに不明瞭な系列の急性白血病が含まれるが、これに限定されない。本開示に従う処置の対象となる例示的な骨髄障害には、急性前骨髄球性白血病(acute promyeloid leukemia)(APML)、急性骨髄性白血病(AML)、および慢性骨髄性白血病(CML)が含まれるが、これに限定されない。

【０３６９】

リンパ系新生物には、前駆リンパ系新生物、成熟B-細胞新生物、成熟T-細胞新生物、ホジキンリンパ腫、および免疫不全関連リンパ増殖性疾患が含まれるが、これに限定されない。本開示に従う処置の対象となる例示的なリンパ系障害には、B系列ALLおよびT系列ALLを含む急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、前リンパ球性白血病(PLL)、毛様細胞性白血病(HLL)、ならびにワルデンシュトレームマクログロブリ

ン血症(ＷＭ)が含まれるが、これに限定されない。

【０３７０】

場合によっては、造血性新生物障害は低分化急性白血病(例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病)に起因する。本明細書で使用する「造血性新生物障害」という用語は、非ホジキンリンパ腫およびそのバリアント、末梢T細胞リンパ腫、成人T-細胞白血病/リンパ腫(ＡＴＬ)、皮膚T細胞リンパ腫(ＣＴＣＬ)、大顆粒リンパ球性白血病(ＬＧＦ)、ホジキン病、ならびにリード・スターンバーグ病を含むが、これに限定されない悪性リンパ腫を指す。

【０３７１】

対象が「新生物疾患に罹患している」かどうかの決定とは、対象が処置を必要とするか、または処理から利益を得る、Ｘ線、ＣＴスキャン、従来の臨床診断検査(例えば、血球数など)、ゲノムデータ、タンパク質発現データ、免疫組織化学を含むが、これに限定されない、疾患、障害、または状態を特定するための分野において受け入れられている入手可能な情報に基づいて対象に対して医師が下した決定を指す。

【０３７２】

<u>hIL12ムテインと抗新生物性補助治療剤の組み合わせ:</u>

本開示は、新生物疾患を処置するための、1種または複数種のさらなる活性抗新生物剤(「補助剤」)と組み合わせた本開示のhIL12ムテインの使用を提供する。このようなさらなる組み合わせは「抗新生物性補助組み合わせ」または「抗新生物性補助併用療法」と互換的に呼ばれ、本開示のhIL12ムテインと組み合わせて用いられる治療剤は「抗新生物性補助剤」と呼ばれる。本明細書で使用する「抗新生物性補助剤」という用語は、別々に投与もしくは導入することができる、例えば、(例えば、キットに入れて提供される場合があるように)別々に投与するために別々に処方することができる抗新生物剤、および/またはhIL12ムテインと組み合わせて投与もしくは導入することができる療法を含む。

【０３７３】

<u>化学療法剤:</u>

一部の態様では、抗新生物性補助剤は化学療法剤である。一部の態様では、補助剤は複数の化学療法剤の「カクテル」である。一部の態様では、化学療法剤またはカクテルは1つまたは複数の物理的方法(例えば、放射線療法)と組み合わせて投与される。「化学療法剤」という用語には、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロスホスファミド;スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファン;アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ;エチレンイミン、およびアルトレタミンを含むメチルアメラミン、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ファオラミド、およびトリメチローロメラミン;ナイトロジェンマスタード、例えば、チオラムブシル、クロルナファジン、クロロフォスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、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、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン;抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、例えば、ブレオマイシンA2,、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシンおよび誘導体、例えば、デメトキシ-ダウノマイシン、11-デオキシダウノルビシン、13-デオキシダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、N-メチルマイトマイシンC;ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ユベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン;代謝拮抗物質、例えば、メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル(5-FU);葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトト

レキセート、プテロプテリン、トリメトレキセート、ジデアザテトラヒドロ葉酸、および葉酸;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、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、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU;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、テストラクトン;抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン;葉酸補充剤、例えば、フロリン酸;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;アムサクリン;ベストラブシル;ビサントレン;エダトレキサート;デフォファミン;デメコルチン;ジアジクオン;エルフォルミチン;酢酸エリプチニウム;エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシウレア;レンチナン;ロニダミン;ミトグアゾン;ミトキサントロン;モピダモール;ニトラクリン;ペントスタチン;フェナメット;ピラルビシン;ポドフィリニック酸;2-エチルヒドラジド;プロカルバジン;ラゾキサン;シゾフィラン;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;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;ピポブロマン;ガシトシン;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、パクリタキセル、nab-パクリタキセル、およびドキセタキセル;クロランブシル;ゲムシタビン;6-チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキセート;白金および白金配位錯体、例えば、シスプラチン、オキサプラチン、およびカルボプラチン;ビンブラスチン;エトポシド(VP-16);イホスファミド;マイトマイシンC;ミトキサントロン;ビンクリスチン;ビノレルビン;ナベルビン;ノバントロン;テニポシド;ダウノマイシン;アミノプテリン;ゼローダ;イバンドロネート;CPT11;トポイソメラーゼインヒビター;ジフルオロメチルオルニチン(DMFO);レチノイン酸;エスペラミシン;カペシタビン;タキサン、例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセル;カルミノマイシン、アドリアマイシン、例えば、4′-エピアドリアマイシン、4-アドリアマイシン-14-ベンゾエート、アドリアマイシン-14-オクタノエート、アドリアマイシン-14-ナフタレンアセテート;コルチシン、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が含まれるが、これに限定されない。

【０３７４】

「化学療法剤」という用語はまた、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように働く抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、オナプリストン、およびトレミフェンを含む抗エストロゲン、ならびに抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、リュープロリド、およびゴセレリン、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体も含む。

【０３７５】

一部の態様では、抗新生物性補助剤は、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニスト、例えば、IL-12、INFα、または抗上皮増殖因子受容体、イリノテカン;テトラヒドロ葉酸代謝拮抗物質、例えば、ペメトレキセド;腫瘍抗原に対する抗体、モノクローナル抗体と毒素の複合体、T-細胞アジュバント、骨髄移植、または抗原提示細胞(例えば、樹状細胞療法)、抗腫瘍ワクチン、複製能力のあるウイルス、シグナル伝達インヒビター(例えば、Gleevec(登録商標)またはHerceptin(登録商標))もしくは腫瘍成長の相加的抑制もしくは相乗的抑制を実現するための免疫調節剤、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)インヒビター、ステロイド、TNFアンタゴニスト(例えば、Remicade(登録商標)およびEnbrel(登録商標))、インターフェロン-β1a(Avonex(登録商標))、ならびにインターフェロン-β1b(Betaseron(登録商標))を含むが、これに限定されない、当技術分野において新生物疾患の処置において有用であると突き止められた1種または複数種の化学的剤または生物学的剤、ならびにTAC、FOLFOX、TPC、FEC、ADE、FOLFOX-6、EPOCH、CHOP、CMF、CVP、BEP、OFF、FLOX、CVD、TC、FOLFIRI、PCV、FOLFOXIRI、ICE-V、XELOX、および当業者によって容易に理解されるその他のものを含むが、これに限定されない、公知の化学療法処置レジメン

において実施されるような前述の1つまたは複数の組み合わせである。
【０３７６】
一部の態様では、hIL12ムテインは、BRAF/MEKインヒビター、キナーゼインヒビター、例えば、スニチニブ、PARPインヒビター、例えば、オラパリブ、EGFRインヒビター、例えば、オシメルチニブ(Ahn, et al. (2016) J Thorac Oncol 11:S115)、IDOインヒビター、例えば、エパカドスタット、および腫瘍退縮性ウイルス、例えば、タリモジーン・ラハーパレプベック(T-VEC)と組み合わせて投与される。
【０３７７】
補助剤としての抗腫瘍性抗原抗体治療剤
一部の態様では、「抗新生物性補助剤」は、治療抗体(二重特異性T細胞エンゲージャー(BITE)、二重親和性リターゲティング(DART)構築物、および三重特異性キラーエンゲージャー(TriKE)構築物)を含むが、これに限定されない、1種または複数種の腫瘍関連抗原に結合する二重特異性抗体および三重特異性抗体を含む)である。
【０３７８】
一部の態様では、治療抗体は、HER2(例えば、トラスツズマブ、ペルツズマブ、アドトラスツズマブエムタンシン)、ネクチン-4(例えば、エンホルツマブ)、CD79(例えば、ポラツズマブベドチン)、CTLA4(例えば、イピルムマブ)、CD22(例えば、モキセツモマブパスードトクス)、CCR4(例えば、マガムイズマブ)、IL23p19(例えば、チルドラキズマブ)、PDL1(例えば、デュルバルマブ、アベルマブ、アテゾリズマブ)、IL17a(例えば、イキセキズマブ)、CD38(例えば、ダラツムマブ)、SLAMF7(例えば、エロツズマブ)、CD20(例えば、リツキシマブ、トシツモマブ、イブリツモマブ、およびオファツムマブ)、CD30(例えば、ブレンツキシマブベドチン)、CD33(例えば、ゲムツズマブオゾガマイシン)、CD52(例えば、アレムツズマブ)、EpCam、CEA、fpA33、TAG-72、CAIX、PSMA、PSA、葉酸結合タンパク質、GD2(例えば、ジヌンツキシマブ)、GD3、IL6(例えば、シルツキシマブ)GM2、Ley、VEGF(例えば、ベバシズマブ)、VEGFR、VEGFR2(例えば、ラムシルマブ)、PDGFR□(例えば、オラルツムマブ)、EGFR(例えば、セツキシマブ、パニツムマブ、およびネシツムマブ)、ERBB2(例えば、トラスツズマブ)、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKLRAP、テネイシン、インテグリン□V□3、およびインテグリン□4□1からなる群より選択される少なくとも1種類の腫瘍抗原に結合する抗体である。
【０３７９】
一部の態様では、治療抗体は、対象における新生物疾患、ならびに新生物疾患に関連する疾患、障害、または状態を処置および/または予防するための免疫チェックポイントモジュレーターである。「免疫チェックポイント経路」という用語は、抗原提示細胞(APC)上に発現している第1の分子(例えば、PD1などのタンパク質)が、免疫応答を調整する、免疫細胞(例えば、T-細胞)上に発現している第2の分子(例えば、PDL1などのタンパク質)に結合することで、免疫応答を刺激(例えば、T-細胞活性のアップレギュレーション)または阻害(例えば、T-細胞活性のダウンレギュレーション)することによって誘発される生物学的応答を指す。免疫応答を調整する結合ペアの形成に関与する分子は一般に「免疫チェックポイント」と呼ばれる。一態様では、免疫チェックポイント経路モジュレーターは、PD1とPDL1および/またはPDL2との結合を阻害する、負の免疫チェックポイント経路のアンタゴニスト(「PD1経路インヒビター)である。PD1経路インヒビターという用語は、PD1とPDL1および/またはPDL2との結合を妨害するモノクローナル抗体を含む。新生物疾患処置における補助剤として有用な市販のPD1経路インヒビターの例には、ニボルマブ(BristolMyers Squibb, Princeton NJから市販されているOpdivo(登録商標)、BMS-936558、MDX1106)、ペンブロリズマブ (Merck and Company, Kenilworth NJから市販されているKeytruda(登録商標)MK-3475、ランブロリズマブ)、およびアテゾリズマブ(Tecentriq(登録商標)、Genentech/Roche, South San Francisco CA)を含むが、これに限定されない、PD1とPDL1および/またはPDL2との結合を妨害する抗体が含まれる。デュルバルマブ(MEDI4736、Medimmune/As

traZeneca)、ピディリズマブ(CT-011、CureTech)、PDR001(Novartis)、BMS-936559(MDX1105、BristolMyers Squibb)、およびアベルマブ(MSB0010718C、Merck Serono/Pfizer)、およびSHR-1210(Incyte)を含むが、これに限定されない、さらなるPD1経路インヒビター抗体が臨床開発中である。さらなる抗体PD1経路インヒビターは、2012年7月10日に発行された米国特許第8,217,149号(Genentech, Inc); 2012年5月1日に発行された米国特許第8,168,757号(Merck Sharp and Dohme Corp.)、2011年8月30日に発行された米国特許第8,008,449号(Medarex)、2011年5月17日に発行された米国特許第7,943,743号(Medarex, Inc)に記載されている。

【０３８０】

FDAにより承認され、かつ新生物疾患の処置において使用するための補助剤として使用され得る抗体治療剤の例には、アテゾリズマブ、オララツマブ、イキセキズマブ、トラスツズマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、エドレコロマブ、ダラツムマブ、エロツズマブ、ネシツムマブ、ジヌツキシマブ、ニボルマブ、ブリナツモマブ、ペンブロリズマブ、ペルツズマブ、ブレンツキシマブベドチン、イピリムマブ、オファツムマブ、セルトリズマブペゴル、カツマキソマブ、パニツムマブ、ベバシズマブ、ラムシルマブ、シルツキシマブ、エンホルツマブベトチン、ポラツズマブベドチン、[fam]-トラスツズマブデルクステカン、セミプリマブ、モキセツモマブパスードトクス、モガムイズマブ、チルドラキズマブ、イバリズマブ、デュルバルマブ、イノツズマブ、オゾガマイシン、アベルマブ、オビヌツズマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、セツキシマブ、トシツモマブ-I131、イブリツモマブチウキセタン、ゲムツズマブ、およびオゾガマイシンが含まれる。

【０３８１】

物理的方法

一部の態様では、抗新生物性補助剤は、1種または複数種の非薬理学的モダリティ(例えば、局所放射線療法もしくは全身放射線療法または外科手術)である。例として、本開示は、放射線の段階の前または後に、hIL12ムテインと1種または複数種の抗新生物性補助剤とを含む処置レジメンによる処置が行われる処置レジメンを意図する。一部の態様では、さらに、本開示は、外科手術(例えば、腫瘍切除)と組み合わせてhIL12ムテイン使用することを意図する。一部の態様では、さらに、本開示は、骨髄移植、末梢血幹細胞移植、または他のタイプの移植療法と組み合わせてhIL12ムテインを使用することを意図する。

【０３８２】

一部の態様では、本開示の方法は、新生物疾患、自己免疫疾患、または炎症性疾患を処置するための、hIL12ムテインと、細胞療法の形をとる補助剤との投与の組み合わせを含んでもよい。本開示の方法と組み合わせた使用の対象となる細胞療法の例には、1種または複数種の活性化CAR-T細胞を含む操作されたT細胞製品、操作されたTCR細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、操作されたTreg細胞が含まれるが、これに限定されない。

【０３８３】

本発明の実施において有用なCARは、当技術分野において周知の原理に従って調製される。例えば、Eshhaarら、2010年6月22日に発行された米国特許第7,741,465 B1号; Sadelain, et al (2013) Cancer Discovery 3(4):388-398; Jensen and Riddell (2015) Current Opinions in Immunology 33:9-15; Gross, et al. (1989) PNAS(USA) 86(24):10024-10028; Curran, et al. (2012) J Gene Med 14(6):405-15を参照されたい。市販のCAR-T細胞製品の例には、アキシカブタゲンシロルユーセル(Gilead Pharmaceuticalsから市販されているYescarta(登録商標)として販売されている)およびチサゲンレクロイセル(Novartisから市販されているKymriah(登録商標)として販売されている)が含まれる。一部の態様では、CAR-Tは、GD2、BCMA、CD19、CD33、CD38、CD70、GD2、IL3R□2、CD19、メソテリン、Her2、EpCam、Muc1、ROR1、CD133、CEA、EGRFRVIII、PSCA、GPC3、Pan-ErbBおよびFAPからなる群より選択される、腫瘍細胞に関連する細胞表面分子に特異的に結合するCARを有する。

【０３８４】
物理的方法:
一部の態様では、抗新生物性補助剤は、放射線療法、寒冷療法、温熱療法、外科手術、レーザーアブレーション、および陽子線療法(proton therapy)を含むが、これに限定されない抗新生物性物理的方法である。
【０３８５】
hIL-12シグナル伝達を調整するための方法
別の局面では、本開示は、対象において、IL-12によって媒介されるシグナル伝達を調整するための方法を提供する。一部の態様では、前記方法は、対象に、有効量の薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、薬学的組成物は、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする核酸分子、本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする核酸分子、または本明細書に記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする核酸分子を含む組換えにより改変された細胞を含む。一部の態様では、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含む。
【０３８６】
一部の態様では、対象において、IL-12によって媒介されるシグナル伝達を調整するための方法は、対象から得られた1つまたは複数の細胞において、STAT4によって媒介されるシグナル伝達を決定する工程を含む。一部の態様では、STAT4によって媒介されるシグナル伝達は、遺伝子発現アッセイ、ホスホフローシグナル伝達アッセイ、および酵素結合免疫測定法(ELISA)からなる群より選択されるアッセイによって決定される。一部の態様では、対象におけるSTAT4によって媒介されるシグナル伝達は参照レベルと比較して約20％～約100％低減する。一部の態様では、投与された組成物は、IFN-γ発現を誘導する能力を低減させる。
【０３８７】
キット
本開示のヘテロ二量体hIL12Fcムテインまたはヘテロ二量体hIL23Fcムテインを含むキットも提供される。一部の態様では、キットは、対象においてIL-12によって媒介されるシグナル伝達を調整するための、または健康状態の処置を必要とする対象において健康状態を処置するための1種または複数種の成分を含み、成分は、本明細書に記載のhIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテイン、hIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸分子、本明細書に記載のhIL12Fcムテインもしくはヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸分子を含む組換えにより改変された細胞、または成分の1つもしくは複数を含む、薬学的組成物より選択される。一部の態様では、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含む。
【０３８８】
さらなる態様
1．式#1:
$hP40M\text{-}L1_a\text{-}UH1\text{-}Fc1$ [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
$hP35\text{-}L2_b\text{-}UH2\text{-}Fc2$ [2]
の第2のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL12Fcムテインであって、
式中、
hP35は、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90％、あるいは少なくとも91％、あるいは少なくとも92％、あるいは少なくとも93％、あるいは少なくとも94％、あるいは少なくとも95％、あるいは少なくとも96％、あるいは少なくとも97％、あるいは少なくとも98％、またはあるいは少なくとも99％の配列同一性を有するポリペプチドであり、
hP40Mは、野生型プレヒトP40(SEQ ID NO:3)に従って番号付けられた位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L21

8、およびK219からなる群より選択される位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトp40ムテインであり、
L1およびL2はGSAリンカーであり、aおよびbは、独立して、0(存在しない)または1(存在する)より選択され、
UH1およびUH2はそれぞれ、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、
Fc1は、Fc2とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
FC2は、Fc1とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
ここで、式1のポリペプチドおよび式2のポリペプチドが少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合によって連結されている、
前記ヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
2. hP40Mが、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%の配列同一性(例えば、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有する、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
3. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様1または2記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
4. hP40Mが、P39A、D40A、E81A、F82A、K106A、D109A、K217A、K219Aからなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様3記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
5. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様3記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
6. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される残基において2つ以上のアミノ酸置換を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
7. hP40Mが、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む、態様6記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:E81A/F82A、E81K/F82A、E81L/F82A、E81H/F82A、およびE81S/F82A。
8. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において3つ以上のアミノ酸置換を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
9 hP40Mが、W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219において3つ以上のアミノ酸置換を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
10. 3つ以上の置換が、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む、態様9記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:W37A/E81A/F82A;E81A/F82A/K106A;E81A/F82A/K106A/K219A、E81A/F82A/K106N、E81A/F82A/K106Q、E81A/F82A/K106T、およびE81A/F82A/K106R。
11. hP40Mが、W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219において4つ以上のアミノ酸置換を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。

12．4つ以上の置換が、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む、態様11記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:E81A/F82A/K106A/K217A、81A/F82A/K106A/E108A/D115A、およびP39A/D40A/E81A/F82A。
13．hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A(SEQ ID NO:6)を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
14．hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A/K106A(SEQ ID NO:8)を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
15．hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A/K106A/K217A(SEQ ID NO:10)を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
16．表面プラズモン共鳴によって決定された時、IL12Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対するヘテロ二量体hIL12Fcの結合親和性が、IL12Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対する野生型hP40(SEQ ID NO:4)の結合親和性と比べて少なくとも5%、任意で少なくとも10%、任意で少なくとも20%、任意で少なくとも30%、任意で少なくとも40%、任意で少なくとも50%、任意で少なくとも60%、任意で少なくとも70%低減している、態様1～15のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
17．GSAリンカーが、グリシン、セリン、およびアラニンからなる群より選択されるアミノ酸で構成される4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸を有するポリペプチドである、態様1～16のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
18．GSAリンカーが、構造$(GGGGS_m)_n$、$(GGGS_m)_n$、$(GGGA_m)_n$、および$(GGGGA_m)_n$、ならびにその組み合わせのグリシン-セリンポリマーであり、ここで、m、n、およびoが1、2、3、または4よりそれぞれ独立して選択される、態様17記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
19．GSAリンカーが、SEQ ID NO:27～79からなる群より選択されるポリペプチドである、態様1～18のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
20．Fc1およびFc2が、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4上部ヒンジドメインのUH領域より選択されるヒト免疫グロブリンの天然上部ヒンジ領域である、態様1～19のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
21．上部ヒンジ領域がアミノ酸配列:EPKSC(SEQ ID NO:11)を含む、態様20記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
22．上部ヒンジ領域がアミノ酸配列:EPKSS(SEQ ID NO:12)を含む、態様20記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
23．(a)位置447のリジン残基の欠失、または(b)位置446のグリシンおよび位置447のリジン残基の両方の欠失をさらに含む、態様1～22のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
24．Fc1およびFc2が、Fc1とFc2との間のヘテロ二量体化を促進するアミノ酸置換を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
25．Fc1およびFc2の一方がアミノ酸置換S364H/T394F、他方がアミノ酸置換Y349T/F405Aを含む、態様24記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
26．Fc1およびFc2の一方がアミノ酸置換T350V/L351Y/F405A/Y407Vを含み、他方がアミノ酸置換T350V/T366L/K392L/T394Wを含む、態様24記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
27．Fc1およびFc2の一方がアミノ酸置換K360E/K409Wを含み、他方がアミノ酸置換Q347R/D399V/F405Tを含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
28．Fc1およびFc2の一方が、ノブを設けるためのアミノ酸置換を含み、Fc1およびFc2の他方がホールを設けるためのアミノ酸置換を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
29．ノブを設けるための酸(acid)置換がT366Wであり、ホールを設けるための酸置換がアミノ酸置換のセットT366S/L368A/Y407Vである、態様1記載のヘテロ二量体hIL

12Fcムテイン。
30. Fc1およびFc2が、以下のシステインペアの群の側鎖間の、1つまたは複数の、任意で2つ以上の、任意で3つ以上のジスルフィド結合、任意で4つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結されている、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン:(a)hP35のC96とhP40MのC199;(b)第1のFc単量体のC226と第2のFc単量体のC226、(c)第1のFc単量体のC229と第2のFc単量体のC229;および(d)S354Cアミノ酸置換を含む第1のFcドメインの S354Cと、Y349Cアミノ酸置換を含む第2のFcドメインのY349C。
31. Fc1およびFc2が、エフェクター機能を低減するための1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様1記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
32. Fc1およびFc2の一方または両方が、L234E;L234A/L235A;L234A/L235A/P329A;およびL234A/L235A/P329Gからなる群より選択される変異を含む、態様31記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
33. Fc1およびFc2がアミノ酸置換M428LおよびN434Sを含む、態様1～32のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
34. Fc1および/またはFc2が、NまたはO結合型グリコシル化部位を排除するための1つの、または複数の改変を含む、態様1～32のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
35. 前記改変が、N297QおよびN297Gからなる群より選択されるアミノ酸置換である、態様34記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
36.PEG化されている、態様1～35のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
37. PEGが、約5kDa超、約10kDa超、約15kDa超、約20kDa超、約30kDa超、約40kDa超、または約50kDa超の分子量を有する、態様36記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
38. hP35Fcおよび/またはhP40MFcの上部ヒンジ領域のC220、EUナンバリング)の一方または両方に設けられている、態様36記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン。
39. 態様1～38のいずれか一項記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテインをコードする、核酸配列。
40. 態様39記載の核酸配列を含む、ベクター。
41. 態様40記載のベクターによって形質転換された、宿主細胞。
42. 有効成分として、態様1～38記載のヘテロ二量体hIL12Fcムテイン、態様39記載の核酸、態様40記載のベクター、または態様41記載の宿主細胞を含む、薬学的製剤。
42. 哺乳動物を態様42記載の薬学的製剤と接触させる工程を含む、新生物疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法。
43. 式#1:
hP40M-L1$_a$-UH1-Fc1 [1]
の第1のポリペプチド、および式#2:
hP19-L2$_b$-UH2-Fc2 [2]
の第2のポリペプチドを含む、ヘテロ二量体hIL23Fcムテインであって、
式中、
hP19は、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%、あるいは少なくとも91%、あるいは少なくとも92%、あるいは少なくとも93%、あるいは少なくとも94%、あるいは少なくとも95%、あるいは少なくとも96%、あるいは少なくとも97%、あるいは少なくとも98%、またはあるいは少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドであり、
hP40Mは、野生型プレヒトP40(SEQ ID NO:3)に従って番号付けられた位置W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトp40ムテインであり、

L1およびL2はGSAリンカーであり、aおよびbは、独立して、0(存在しない)または1(存在する)より選択され、
UH1およびUH2はそれぞれ、アミノ酸置換C220S(EUナンバリング)を任意で含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4上部ヒンジからなる群より独立して選択されるヒト免疫グロブリンの上部ヒンジドメインであり、
Fc1は、Fc2とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
FC2は、Fc1とのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるヒト免疫グロブリンの下部ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含むポリペプチドであり、
ここで、式1のポリペプチドおよび式2のポリペプチドが少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合によって連結されている、
前記ヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
44. hP40Mが、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%の配列同一性(例えば、SEQ ID NO:4に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有する、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
45. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
46. hP40Mが、P39A、D40A、E81A、F82A、K106A、D109A、K217A、K219Aからなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様3記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
47. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される残基において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様3記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
48. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたE81、F82、K106、およびK217からなる群より選択される残基において2つ以上のアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
49. hP40Mが、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む、態様49記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン:E81A/F82A、E81K/F82A、E81L/F82A、E81H/F82A、およびE81S/F82A。
50. hP40Mが、SEQ ID NO:3に従って番号付けられたW37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219からなる群より選択される残基において3つ以上のアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
51. 9 hP40Mが、W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219において3つ以上のアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
52. 3つ以上の置換が、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む、態様52記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン:W37A/E81A/F82A;E81A/F82A/K106A;E81A/F82A/K106A/K219A、E81A/F82A/K106N、E81A/F82A/K106Q、E81A/F82A/K106T、およびE81A/F82A/K106R。
53. hP40Mが、W37、P39、D40、A41、K80、E81、F82、K106、E108、D115、H216、K217、L218、およびK219において4つ以上のアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
54. 4つ以上の置換が、以下のアミノ酸置換のセットからなる群より選択されるアミノ酸置換のセットを含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン:E81A/F82A/K10

6A/K217A、81A/F82A/K106A/E108A/D115A、およびP39A/D40A/E81A/F82A。
55. hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A(SEQ ID NO:6)を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
56. hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A/K106A(SEQ ID NO:8)を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
57. hP40Mがアミノ酸置換のセットE81A/F82A/K106A/K217A(SEQ ID NO:10)を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
58. 表面プラズモン共鳴によって決定された時、IL23Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対するヘテロ二量体hIL23Fcの結合親和性が、IL23Rβ1の細胞外ドメイン(ECD)に対する野生型hP40(SEQ ID NO:4)の結合親和性と比べて少なくとも5%、任意で少なくとも10%、任意で少なくとも20%、任意で少なくとも30%、任意で少なくとも40%、任意で少なくとも50%、任意で少なくとも60%、任意で少なくとも70%低減している、態様34～58のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
59. GSAリンカーが、グリシン、セリン、およびアラニンからなる群より選択されるアミノ酸で構成される4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸を有するポリペプチドである、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
60. GSAリンカーが、構造$(GGGGS_m)_n$、$(GGGS_m)_n$、$(GGGA_m)_n$、および$(GGGGA_m)_n$、ならびにその組み合わせのグリシン-セリンポリマーであり、ここで、m、n、およびoが1、2、3、または4よりそれぞれ独立して選択される、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
61. GSAリンカーが、SEQ ID NO:27～79からなる群より選択されるポリペプチドである、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
62. Fc1およびFc2が、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4上部ヒンジドメインのUH領域より選択されるヒト免疫グロブリンの天然上部ヒンジ領域である、態様34～61のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
63. 上部ヒンジ領域がアミノ酸配列:EPKSC(SEQ ID NO:11)を含む、態様62記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
64. 上部ヒンジ領域がアミノ酸配列:EPKSS(SEQ ID NO:12)を含む、態様62記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
65. (a)位置447のリジン残基の欠失、または(b)位置446のグリシンおよび位置447のリジン残基の両方の欠失をさらに含む、態様34～34のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
66. Fc1およびFc2が、Fc1とFc2との間のヘテロ二量体化を促進するアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
67. Fc1およびFc2の一方がアミノ酸置換S364H/T394F、他方がアミノ酸置換Y349T/F405Aを含む、態様66記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
68. Fc1およびFc2の一方がアミノ酸置換T350V/L351Y/F405A/Y407Vを含み、他方がアミノ酸置換T350V/T366L/K392L/T394Wを含む、態様66記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
69. Fc1およびFc2の一方がアミノ酸置換K360E/K409Wを含み、他方がアミノ酸置換Q347R/D399V/F405Tを含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
70. Fc1およびFc2の一方が、ノブを設けるためのアミノ酸置換を含み、Fc1およびFc2の他方がホールを設けるためのアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
71. ノブを設けるための酸置換がT366Wであり、ホールを設けるための酸置換がアミノ酸置換のセットT366S/L368A/Y407Vである、態様70記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。
72. Fc1およびFc2が、以下のシステインペアの群の側鎖間の、1つまたは複数の、任意

で2つ以上の、任意で3つ以上のジスルフィド結合、任意で4つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合的に連結されている、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン:(a)hP19のC96とhP40MのC199;(b)第1のFc単量体のC226と第2のFc単量体のC226、(c)第1のFc単量体のC229と第2のFc単量体のC229;および(d)S354Cアミノ酸置換を含む第1のFcドメインの S354Cと、Y349Cアミノ酸置換を含む第2のFcドメインのY349C。

73. Fc1およびFc2が、エフェクター機能を低減するための1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、態様43記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

74. Fc1およびFc2の一方または両方が、L234E;L234A/L235A;L234A/L235A/P329A;およびL234A/L235A/P329Gからなる群より選択される変異を含む、態様73記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

75. Fc1およびFc2がアミノ酸置換M428LおよびN434Sを含む、態様43～74のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

76. Fc1および/またはFc2が、NまたはO結合型グリコシル化部位を排除するための1つの、または複数の改変を含む、態様43～75のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

77. 前記改変が、N297QおよびN297Gからなる群より選択されるアミノ酸置換である、態様76記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

78.PEG化されている、態様43～77のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

79. PEGが、約5kDa超、約10kDa超、約15kDa超、約20kDa超、約30kDa超、約40kDa超、または約50kDa超の分子量を有する、態様76記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

80. hP19Fcおよび/またはhP40MFcの上部ヒンジ領域のC220、EUナンバリング)の一方または両方に設けられている、態様78記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン。

81. 態様43～81のいずれか一つに記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテインをコードする核酸配列。

82. 態様81記載の核酸配列を含む、ベクター。

83. 態様82記載のベクターによって形質転換された宿主細胞。

84. 有効成分として、態様43～88記載のヘテロ二量体hIL23Fcムテイン、態様81記載の核酸、態様82記載のベクター、または態様83記載の宿主細胞を含む、薬学的製剤。

85. 炎症性疾患または自己免疫疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法であって、哺乳動物を、態様84記載の薬学的製剤と接触させる工程を含む、前記方法。

【０３８９】

開示された態様のために使用することができる、開示された態様と一緒に使用することができる、開示された態様のための調製において使用することができる、または開示された態様の産物である材料、組成物、および成分が開示される。これらの材料および他の材料が本明細書において開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示されている時に、これらの組成物の、それぞれの様々な個々の、および集合的な組み合わせおよび順列の具体的な言及が明示的に開示されていない場合があるが、それぞれが本明細書において具体的に意図および説明されると理解される。例えば、ポリペプチドが開示および議論され、ポリペプチドに加えることができる多数の改変が議論されているのであれば、可能性のある改変のどの組み合わせも、そうでないと具体的に示されない限り具体的に意図される。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせも具体的に意図および開示される。この概念は、開示された組成物を用いた方法における工程を含むが、これに限定されない本開示の全ての局面に当てはまる。従って、実行することができる様々な追加工程があれば、これらの追加工程のそれぞれが、開示された方法の任意の特定の方法工程または方法工程の組み合わせと共に実行可能であり、このような組み合わせまたは組み合わせのサブセットのそれぞれが具体的に意図され、開示されているとみなさなければならないと理解される。

【０３９０】
本明細書中で本開示の全体を通して言及された特許、特許出願、および刊行物は全て、その全体が参照により組み入れられる。
【実施例】
【０３９１】
実施例1．hIL12ムテインの組換え産生
本開示のヘテロ二量体IL12ムテインを以下の手順におおむね従って産生する。pCDNA3.4哺乳動物発現ベクター(Life Technologies, Carlsbad, CA)を、マルチプルクローニングクローニングサイト(Multiple Cloning Cloning Site)(MCS)の中に追加の制限部位を含めるように改変し、pExSyn2.0と改名した。標準的な分子生物学クローニング法を用いて、hP40FcおよびhP40MFcポリペプチドをコードする核酸配列をpExSyn2.0のEcoRIおよびBamHI制限部位にクローニングする。標準的な分子生物学クローニング法を用いて、wt hP35Fc、Gly-Serリンカー、およびHisx8キレート化ペプチドをコードする核酸配列をpExSyn2.0ベクターのEcoRI およびBamHIにクローニングした。同一性を確認するために、これらのベクターをDNA配列決定した(MC Lab, South San Francisco, CA)。製造業者(Life Technologies, Carlsbad, CA)のプロトコールにおおむね従って、コトランスフェクションによって、hP40FcをコードするベクターとhP35をコードするベクターをExpi293細胞に導入する。Hisタグ化hIL12ムテイン(p35 C末端にあるHisタグ)を、10mMイミダゾールを含有するリン酸緩衝食塩水(PBS)で平衡化したNi Sepharose excel resin(Cytiva, 部品番号GE17371201)0.1mlを用いて捕獲する。ムテインを、250mMイミダゾールを含有するPBS 0.5mlによってNi樹脂から溶出させ、PBSに対して透析する。濃度を、タンパク質配列から求めた吸光率を用いて280nmでのUV吸光度によって求める。
【０３９２】
または、p35-Fc単量体とp40-Fc単量体で構成される2種類の構築物をトランスフェクトすることによってIL12-Fcヘテロ二量体を産生する。DNAを生成し、スケールアップし、expi293細胞またはexpiCHO細胞を前記のようにトランスフェクトする。Fc-タグ化IL12複合体を、PBSで平衡化したプロテインA樹脂を用いて捕獲し、100mM酢酸ナトリウム pH2.8を用いてカラムから溶出させる。溶出液を中和し、PBSに対して透析する。サイズ排除クロマトグラフィーおよび/または陰イオン交換クロマトグラフィーなどの標準的な技法を用いたさらなる精製を用いて、純粋なIL12-Fcヘテロ二量体を産生する。濃度を、タンパク質配列から求めた吸光率を用いて280nmでのUV吸光度によって求める。
【０３９３】
実施例2．ヒトIL12 pSTAT4レポーターアッセイ
pSTAT4シグナル伝達に対する変異の効果を特徴付けるために、HEK-Blue Human IL12 pSTAT4 Reporter Assay(Invivogen, San Diego, CA)を製造業者のプロトコールにおおむね従って行う。
【０３９４】
実施例3．単離されたヒト細胞におけるIFNγの評価:
単離されたヒトPBMCにおけるIFNγ活性の評価を以下の手順におおむね従って行う。単離されたヒト全PBMCを、液体窒素の中にある保管庫から取り出し、解凍し、計数する。細胞を、StemCell negative isolation kits(StemCell Technologies, Cat. #17951, Cat. #19055)を用いて製造業者のプロトコールに従ってPan-T細胞またはナチュラルキラー細胞のいずれかを単離した2つのグループに分ける。次いで、細胞を計数し、.25%w/vヒトアルブミン(Sigma, Cat. #A9080)、1xITS-X(ヒト)(Gibco, Cat. #51500056)、30mg/Lトランスフェリン(Roche, Cat. #10652202001)、2mg/L PA BioXtra(Sigma, Cat. #P5585)、LA-OA-アルブミン(Sigma, Cat. #L9655)、1Xペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco, Cat. #15-140-122)、1%ヒト血清(Gemini, Cat. #507533011)を含有する完全イエッセル(Complete Yssel)培地(IMDM

, Gibco, Cat. #122440-053)に再懸濁し、96ウェル、平底、組織培養処理済みプレート(Fisher Scientific, Cat. #FB012931)のウェルに移す。Pan-T細胞を刺激するのに使用したプレートを、リン酸緩衝食塩水(PBS)(Corning, Cat. #12-031-CV)に溶解した5ug/mL抗CD3抗体(Biolegend, Cat. #300458)でコーティングし、4Cで一晩保管し、洗浄した後に、細胞を単離する。全ての細胞に、最終濃度100pMのヒトIL-2と最終濃度50ng/mLの組換えヒトIL-18(R&D Systems, Cat. #9124-IL-050/CF)を加える。さらに、Pan-T細胞に、10ug/mL抗CD28抗体(Biolegend, Cat. #302934)、最終濃度10ug/mLを加える。IL-12変異体タンパク質を完全イエッセル培地で1:10希釈して200nM～2fMの濃度で滴定し、典型的に、100nM～1fMの最終濃度で、以前にプレートされた細胞と同じ体積でウェルに添加する。次いで、細胞を37C、5%CO2で48時間インキュベートする。

【０３９５】

インキュベーションの最後の4時間に細胞を1:1000モネンシン(eBiosciences, Cat. #00-4505-51)で処理する。インキュベーション後、細胞をPBSで洗浄し、Zombie NIR fixable viability dye(Biolegend, Cat. #423105)によって4Cで15分間、暗所で染色する。細胞を、予め作製したFACS緩衝液(BD, 554656)で2回洗浄し、37Cまで予熱した1X Phosflow Fix Buffer I(BD, Cat. #557870)で、37C、5%CO2で10分間固定する。次いで、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、Phosflow Perm Buffer III(BD, Cat. #558050)に溶解して製造業者の推奨に従って透過処理する。透過処理後に細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、FACS緩衝液に溶解した1:10 Human TruStain FcX Fc Block(Biolegend, Cat. #422302)で短時間ブロックし、次いで、抗IFNy抗体(Biolegend, Cat. #506507)、抗CD4抗体(BD, Cat. #552838)、抗CD8抗体(BD, Cat. #563677)、および抗CD56抗体(Biolegend, Cat. #362504)で室温で1時間、暗所で染色する。次いで、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、1%PFA(Electron Microscopy Sciences, Cat. #15710)を含有するFACS緩衝液に4℃で少なくとも10分間、暗所で再懸濁した後に、フローサイトメトリーを介して取得する。

【０３９６】

<u>実施例4．ヒト細胞におけるpSTAT4活性の評価</u>

単離されたヒトPBMCにおけるSTAT4活性の評価を以下の手順におおむね従って行う。ヒト全PBMCを、Leukoreduction System Chambers(Stanford Blood Center)からErythrocyte Custom Sedimentation Kit(Miltenyi Biotec, Cat. #130-126-357)を使用し、その後にCustom Buffy Coat/LRSC PBMC Isolation kit(Miltenyi Biotec, Cat. #130-126-448)を使用して製造業者のプロトコールに従って単離する。これらの負に選択されたPBMCを、0.25%w/vヒトアルブミン(Sigma, Cat. #A9080)、1xITS-X(ヒト)(Gibco, Cat. #51500056)、30mg/Lトランスフェリン(Roche, Cat. #10652202001)、2mg/L PA BioXtra(Sigma, Cat. #P5585)、LA-OA-アルブミン(Sigma, Cat. #L9655)、1Xペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco, Cat. #15-140-122)、1%ヒト血清(Gemini, Cat. #507533011)を含有する温かい完全イエッセル培地(IMDM, Gibco, Cat. #122440-053)で洗浄し、計数し、2E06細胞/mLの濃度でT175組織培養処理済みフラスコ(Nunc, Cat. # 159910)に移す。培地に1ug/mLの抗CD3抗体(Biolegend, Cat. #300458)と1ug/mLの抗CD28抗体(Biolegend, Cat. #302934)を加える。細胞を37C、5%CO2で72時間インキュベートする。

【０３９７】

インキュベーション後に、細胞をフラスコからデカントし、温かい完全イエッセル培地で2回洗浄し、抗CD3刺激も抗CD28刺激もなく37C、5%CO2で休ませる。穏やかに洗浄し、手作業で攪拌しながら、ゆるく付着した細胞を取り外した後に洗浄し、休ませる。休ませた後に細胞をPBSで洗浄し、Zombie NIR fixable viability dye(Biolegend, Cat. #423105)で4Cで15分間、暗所で染色する。細胞を、予め作製したAssay Buffer(.5%BSA PBS)で2回洗浄し、96ウェル、丸底、組織培養処理済みプレート(Thermo

Scientific, Cat. #163320)のウェルに移し、37C、5%CO2インキュベーターに入れて平衡化する。平衡化後に、アッセイ緩衝液で1:10滴定に希釈した最終濃度1uM～100fMの同じ体積の2x IL-12変異体タンパク質によって細胞を処理する。次いで、細胞を37C、5%CO2で15分間インキュベートする。

【０３９８】

インキュベーション後に、細胞を、同じ体積の、予熱した1X Phosflow Lyse/Fix Buffer(BD, Cat. # 558049)に入れて37C、5%CO2で10分間固定する。次いで、細胞をAssay Bufferで2回洗浄し、BD Phosflow Perm Buffer III(BD, Cat. #558050)に溶解して製造業者の推奨に従って透過処理する。透過処理後に細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、FACS緩衝液に溶解した1:10 Human TruStain FcX Fc Block(Biolegend, Cat. #422302)で短時間ブロックし、次いで、抗pSTAT4抗体(CD, Cat. #562703)、抗CD4抗体(BD, Cat. #552838)、抗CD8抗体(BD, Cat. #563677)、抗CD3(Biolegend, Cat. #300415)、および抗CD56抗体(Biolegend, Cat. #362504)で室温で1時間、暗所で染色する。次いで、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、1%PFA(Electron Microscopy Sciences, Cat. #15710)を含有するFACS緩衝液に4Cで少なくとも10分間、暗所で再懸濁した後に、フローサイトメトリーを介して取得する。

【０３９９】

非公式の配列表

SEQ ID NO:	説明	DNA/AA 配列
1	プロhP35 (wt) Uniprot P29459 天然シグナル配列あり	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
2	成熟 hP35 (wt) Uniprot P29459 (シグナル配列なし)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
3	プロwt hP40 Uniprot P29460 天然シグナル配列 を有する プレタンパク質	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
4	成熟 wt hP40 Uniprot P29460 (シグナル配列なし)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
5	プロhP40 2xAla E81A F82A (シグナル配列あり)	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

SEQ ID NO:	説明	DNA/AA 配列
6	成熟 hP40 2xAla E81A F82A (シグナル配列なし))	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
7	プロhP40 (シグナル配列あり) 3xAla E81A/F82A/K106A	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLS HSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
8	成熟 hP40 3xAla E81A F82A K106A (シグナル配列なし)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
9	プロhP40 4xAla E81A/F82A/K106A/ K217A (シグナル配列あり)	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLS HSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
10	成熟 hP40 4xAla E81A/F82A/K106A/ K217A (シグナル配列なし)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHAL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
11	wt IgG1 上部ヒンジ EU 216-220	EPKSC
12	IgG1 上部ヒンジ w/C220S	EPKSS
13	IgG1 下部ヒンジ EU 221-230	DKTHTCPPCP
14	hIgG1 CH2 ドメイン EU 238-337	>sp|P0DOX5|240-339 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT IS
15	hIgG1 CH3 ドメイン EU346-442	>sp|P0DOX5|348-444 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

SEQ ID NO:	説明	DNA/AA 配列
16	wt IgG1 Fc 単量体 (下部ヒンジ /CH2/CH3) Uniprot Ref P0DOX5 EU 221-447	Wt IGG Fc Monomer Lower Hinge/CH2/CH3 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	基本 Fc KNOB T366W (上部ヒンジなし) IgG1 Fc 単量体 (下部ヒンジ /CH2/CH3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18	基本 Fc ホール T366S/L368A/Y407V (上部ヒンジなし) IgG1 Fc 単量体 (下部ヒンジ /CH2/CH3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	基本 EPKSC UH + IgG1 Fc (LH/CH2/CH3) ノブ 単量体 ノブ T366W	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	基本 EPKSC UH + IgG1 Fc (LH/CH2/CH3) ノブ 単量体 ホール T366S/L368A/Y407V	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	C220S EPKSC UH + IgG1 Fc (LH/CH2/CH3) ノブ 単量体 ノブ T366W	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	C220S EPKSC UH + IgG1 Fc (LH/CH2/CH3) ノブ 単量体 ホール T366S/L368A/Y407V	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	Wt EPKSC UH + +IgG1 Fc ノブ 単量体 (LH/CH2/CH3) + T366W + S354C	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	Wt EPKSC UH + + IgG1 Fc (LH/CH2/CH3)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ

SEQ ID NO:	説明	DNA/AA 配列
	ホール T366S/L368A/Y407V + Y349C	VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	C220S UH +IgG1 Fc ノブ単量体 (LH/CH2/CH3) + T366W + S354C	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	C220S UH + IgG1 Fc (LH/CH2/CH3) ホール T366S/L368A/Y407V + Y349C	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	(G3A)2	GGGAGGGA
28	(G3A)4	GGGAGGGAGGGA
29	(G3AG2)2	GGGAGGGGGAGG
30	(G3S)3	GGGSGGGSGGGS
31	(G3SG2)2	GGGSGGGGGSGG
32	(G4A)2	GGGGAGGGGA
33	(G4a)3	GGGGAGGGGAGGGGA
34	(G4AG)2	GGGGAGGGGGAG
35	(G4AG2)2	GGGGAGGGGGGAGG
36	(G4S)2	GGGGSGGGGS
37	(G4S)3	GGGGSGGGGSGGGGS
38	(G4SG)2	GGGGSGGGGGSG
39	(G4SG2)2	GGGGSGGGGGGSGG
40	(G5AG)2	GGGGGAGGGGGGAG
41	(G5SG)2	GGGGGSGGGGGGSG
42	G2AG	GGAG
43	G3A	GGGA
44	G3A-G3S	GGGAGGGS
45	G3A-G3S- G3A	GGGAGGGSGGGA
46	G3A-G4S	GGGAGGGGS
47	G3A-G4SA	GGGAGGGGA
48	G3AG2	GGGAGG
49	G3AG2 G4AG	GGGAGGGGGGAG
50	G3S	GGGS
51	G3S-G3A-GGGS	GGGSGGGAGGGS
52	G3SG2 G4SG	GGGSGGGGGGSG
53	G4A	GGGGA
54	G4A- G4S- G4A	GGGGAGGGGSGGGGA
55	G4A- G4S- G4S	GGGGAGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:	説明	DNA/AA 配列
56	G4A-G4AG	GGGGAGGGGAG
57	G4A-G4S	GGGGAGGGGS
58	G4A-G4SG	GGGGAGGGGSG
59	G4AG	GGGGAG
60	G4AG G4SG2	GGGGAGGGGGSG
61	G4AG-G4AG	GGGGAGGGGGAG
62	G4AG-G4SG	GGGGAGGGGGSG
63	G4AG2	GGGGAGG
64	G4AG2 G3SG2	GGGGAGGGGGSGG
65	G4S	GGGGS
66	G4S- G4A- G4A	GGGGSGGGGAGGGGA
67	G4S- G4A- G4S	GGGGSGGGGAGGGGS
68	G4S- G4S- G4A	GGGGSGGGGSGGGGA
69	G4S-G4A	GGGGSGGGGA
70	G4S-G4AG	GGGGSGGGGAG
71	G4S-G4SG	GGGGSGGGGSG
72	G4SG G3AG2	GGGGSGGGGAGG
73	G4SG-G4AG	GGGGSGGGGGAG
74	G4SG-G4SG	GGGGSGGGGGSG
75	G4SG2 G5SG	GGGGSGGGGGGSG
76	G5AG	GGGGGAG
77	G5SG G4AG2	GGGGGSGGGGGAGG
78	GAG2	GAGG
79	GSG2	GAGG
80	DR1442M	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
81	DR1535M	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA SGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG

82	DR1536M 成熟 p35 Fc タンパク質	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA SGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
83	DR1537M 成熟 3xAla p40 Fc タンパク質	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
84	DR1572M	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA SGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
85	DR1573M	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
86	DR1588M	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

87	DR1589M	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA SGGGGSGGGGSGGGGSEPKSS DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
88	DR1590M	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT L1573LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
89	DR1591M	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA SGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
90	DR1595M	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
91	DR1596M	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA SGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

92	DR1597M	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQ KSLSLSPG
93	DR1598M	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA SGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
94	DR1442Pをコードする DNA配列	ATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGTATC CCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACCCCTGAAGA GGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCGGCAGC GGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCAGT ACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCT CCACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAG AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACA GCGGCCGGTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGAC CTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACA TGTGGCGCTGCCACACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAG AATACGAGTACAGCGTGGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGC CGAAGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTG AAGTACGAGAACTACACCTCCAGCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGC CCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTGAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACA GGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACACCCCACAGC TACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCG AGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTGATCTG CAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGATCGGTACTACAGC AGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGAACCAAAATCAT CAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGG GGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG ATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACG AAGATCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAG AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCTCCCATCGAAAA GACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCCCAGGTTTACACA CTGCCTCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGAC TCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCA GATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTT GCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC
95	DR1535Pをコードする DNA配列	AGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGGCATGTTTCCTTGTCTGC ACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGCAGAAGGC CAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCGACCAC GAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCTC TGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACAAGCTT

		CATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCCTTCATGATG GCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTCG AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGCGGCAGAT CTTCCTGGACCAGAATATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCC CTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGCCCCAGAAGTCCAGCCTGGAAGAAC CCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTT CCGGATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCC AGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGGCGGAGGCGGATCTG AACCAAAATCATCAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC AGAAGCTGCTGGGGGCCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTAAG GACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG ATGTGTCTCACGAAGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGC TCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC CAGGTTTGCACCCTGCCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGTCCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCT CCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAG TGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT GCACGAAGCTTTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGC CCTGGA
96	DR1536Pをコードする 核酸配列 SEQ ID NO: 125	ATGTGCCCTGCCAGATCTCTGCTGCTGGTGGCTACACTGGTGCTGCTGG ATCATCTGAGCCTGGCCAGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGG CATGTTTCCTTGTCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCC AACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCA GCGAGGAAATCGACCACGAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGT GGAAGCCTGCCTGCCTCTGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAAC AGCAGAGAGACAAGCTTCATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAA AGACCTCCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCT GAAGATGTACCAGGTCGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATG GACCCCAAGCGGCAGATCTTCCTGGACCAGAATATGCTGGCCGTGATCG ACGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGCCCCAGAA GTCCAGCCTGGAAGAACCCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGC ATCCTGCTGCACGCCTTCCGGATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGA TGAGCTACCTGAACGCCAGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGCGGATC TGAACCAAAATCATCAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCT CCAGAAGCTGCTGGGGGCCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTA AGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGT GGATGTGTCTCACGAAGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACA ACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCC GCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAAC CCCAGGTTTGCACCCTGCCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGTCCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCC GTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCC CTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGAC AGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG ATGCACGAAGCTTTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGA GCCCTGGA

97	DR1537Pをコードする核酸配列	ATGTGTCACCAGCAGCTGGTCATCAGCTGGTTCAGCCTGGTGTTCCTGG CCTCTCCTCTGGTGGCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGT GGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACC TGCGATACCCCTGAAGAGGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTA GCGAGGTGCTCGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGC TGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGC CACAGCCTGCTGCTGCTCCACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCG ACATCCTGAAGGACCAGAAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATG CGAGGCCAAGAACTACAGCGGCCGGTTCACATGTTGGTGGCTGACCACC ATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTG ATCCTCAGGGCGTTACATGTGGCGCTGCCACACTGTCTGCCGAAAGAGT GCGGGGCGACAACAAAGAATACGAGTACAGCGTGGAATGCCAAGAGGAC AGCGCCTGTCCAGCCGCCGAAGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTGG ACGCCGTGCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCTCCAGCTTTTTCAT CCGGGACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTGAAGCCT CTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGACACCT GGTCTACACCCCACAGCTACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGCA GGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACC AGCGCCACCGTGATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCC AGGATCGGTACTACAGCAGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATG TAGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGCGGATCTGAACCAAAATCATCA GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGGG GCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGAT CTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAA GATCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCTCCCATCGAAAAGA CCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCCCAGGTTTACACACT GCCTCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGC CTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTC CGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGA TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTTGC ACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC
98	DR1572Pをコードする DNA配列	AGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGGCATGTTTCCTTGTCTGC ACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGCAGAAGGC CAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCGACCAC GAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCTC TGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACAAGCTT CATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCCTTCATGATG GCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTCG AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGCGGCAGAT CTTCCTGGACCAGAATATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCC CTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGCCCCAGAAGTCCAGCCTGGAAGAAC CCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTT CCGGATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCC AGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGCGGATCTGAACCAAAATCATGTG ACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGGGG CCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATC TCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAG ATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTGCACCCTG CCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCTGTG CCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA TGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCC

		GACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGAT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCTGGA
99	DR1573Pをコードする DNA配列	ATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGTATC CCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACCCCTGAAGA GGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCGGCAGC GGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCAGT ACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCT CCACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAG AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACA GCGGCCGGTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGAC CTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACA TGTGGCGCTGCCACACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAG AATACGAGTACAGCGTGGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGC CGAAGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTG AAGTACGAGAACTACACCTCCAGCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGC CCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTGAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACA GGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACACCCCACAGC TACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCG AGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTGATCTG CAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGATCGGTACTACAGC AGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGGAGGCGGAGGAT CCGGCGGAGGCGGATCTGAACCAAAATCATGTGACAAGACCCACACCTG TCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGGGGCCCTTCCGTGTTTCTG TTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAGATCCAGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT AGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC CAACAAGGCCCTGGCCGCTCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGGCCAAG GGCCAGCCTCGGGAACCCCAGGTTTACACACTGCCTCCATGCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTA CCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAAC AACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCC TGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGT GTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTTGCACAATCACTACACACAG AAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC
100	DR1588Pをコードする DNA配列	ATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGTATC CCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACCCCTGAAGA GGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCGGCAGC GGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCAGT ACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCT CCACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAG AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACA GCGGCCGGTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGAC CTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACA TGTGGCGCTGCCACACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAG AATACGAGTACAGCGTGGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGC CGAAGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTG AAGTACGAGAACTACACCTCCAGCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGC CCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTGAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACA GGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACACCCCACAGC TACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCG

		AGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTGATCTG CAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGATCGGTACTACAGC AGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGAACCAAAATCAT CAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAATTTGAAGG GGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG ATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACG AAGATCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAG AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTTCCATCGAAAA GACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCCCAGGTTTACACA CTGCCTCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGAC TCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCA GATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTT GCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC
101	DR1589Pをコードする DNA配列	AGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGGCATGTTTCCTTGTCTGC ACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGCAGAAGGC CAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCGACCAC GAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCTC TGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACAAGCTT CATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCCTTCATGATG GCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTCG AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGCGGCAGAT CTTCCTGGACCAGAATATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCC CTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGCCCCAGAAGTCCAGCCTGGAAGAAC CCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTT CCGGATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCC AGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGGCGGAGGCGGATCTG AACCAAAATCATCAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC AGAATTTGAAGGGGGCCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTAAG GACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG ATGTGTCTCACGAAGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCGC TTCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC CAGGTTTGCACCCTGCCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGTCCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCT CCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAG TGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT GCACGAAGCTTTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGC CCTGGA
102	DR1590Pをコードする DNA配列	ATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGTATC CCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACCCCTGAAGA GGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCGGCAGC GGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCAGT ACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCT CCACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAG AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACA GCGGCCGGTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGAC CTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACA TGTGGCGCTGCCACACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAG AATACGAGTACAGCGTGGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGC CGAAGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTG AAGTACGAGAACTACACCTCCAGCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGC CCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTGAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACA

		GGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACACCCCACAGC TACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCG AGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTGATCTG CAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGATCGGTACTACAGC AGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGAACCAAAATCAT CAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGAAGG GGCCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG ATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACG AAGATCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAG AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCCATCGAAAA GACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCCCAGGTTTACACA CTGCCTCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGAC TCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCA GATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTT GCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC
103	DR1591Pをコードする DNA配列	AGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGGCATGTTTCCTTGTCTGC ACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGCAGAAGGC CAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCGACCAC GAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCTC TGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACAAGCTT CATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCCTTCATGATG GCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTCG AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGCGGCAGAT CTTCCTGGACCAGAATATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCC CTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGCCCCAGAAGTCCAGCCTGGAAGAAC CCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTT CCGGATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCC AGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGGCGGAGGCGGATCTG AACCAAAATCATCAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC AGAAGCTGAAGGGGCTCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTAAG GACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG ATGTGTCTCACGAAGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCGC TCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC CAGGTTTGCACCCTGCCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGTCCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCT CCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAG TGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT GCACGAAGCTTTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGC CCTGGA
104	DR1596Pをコードする DNA配列	AGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGGCATGTTTCCTTGTCTGC ACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGCAGAAGGC CAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCGACCAC GAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCTC TGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACAAGCTT CATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCCTTCATGATG GCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTCG AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGCGGCAGAT CTTCCTGGACCAGAATATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCC CTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGCCCCAGAAGTCCAGCCTGGAAGAAC CCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTT CCGGATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCC

		AGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGAACCAAAATCATCAG ACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGAAGGGGC TCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATC TCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAG ATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTCTTCTATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTGCACCCTG CCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCTGTG CCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA TGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCC GACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGAT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCTGGA
105	DR1597Pをコードする DNA配列	ATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGTATC CCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACCCCTGAAGA GGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCGGCAGC GGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCAGT ACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCT CCACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAG AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACA GCGGCCGGTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGAC CTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACA TGTGGCGCTGCCACACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAG AATACGAGTACAGCGTGGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGC CGAAGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTG AAGTACGAGAACTACACCTCCAGCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGC CCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTGAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACA GGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACACCCCACAGC TACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCG AGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTGATCTG CAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGATCGGTACTACAGC AGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGGAGGCGGAGGAT CCGGCGGAGGTGGAAGTGAACCAAAATCATCAGACAAGACCCACACCTG TCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGAAGGGGCCCCTTCCGTGTTTCTG TTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAGATCCAGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT AGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC CAACAAGGCCCTGCCCTCTTCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGGCCAAG GGCCAGCCTCGGGAACCCCAGGTTTACACACTGCCTCCATGCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTA CCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAAC AACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCC TGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGT GTTCTCCTGCTCCGTGTTGCACGAAGCTTTGCACTCTCACTACACACAG AAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC
106	DR1598Pをコードする DNA配列	AGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGGCATGTTTCCTTGTCTGC ACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGCAGAAGGC CAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCGACCAC GAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCTC TGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACAAGCTT CATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCCTTCATGATG GCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTCG AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGCGGCAGAT CTTCCTGGACCAGAATATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCC CTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGCCCCAGAAGTCCAGCCTGGAAGAAC

		CCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTT CCGGATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCC AGCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGAACCAAAATCATCAG ACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGAAGGGGC TCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATC TCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAG ATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTCTTCTATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTGCACCCTG CCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCTGTG CCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA TGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCC GACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGAT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGCTGCACGAAGCTTTGCA CTCCCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCTGGA

107	プロmP35 (wt) Uniprot P43431 天然シグナル配列あり	MCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKT ARELKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSS TTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQII LDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFST RVVTINRVMGYLSSA
108	成熟 mP35 (wt) Uniprot P43431 (シグナル配列なし)	RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITR DQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGS IYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGET LRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA
109	プロwt mP40 Uniprot Q3ZAX5 天然シグナル配列を有する プレタンパク質	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTC DTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHS HLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLK FNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTA EETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVE VSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTS TEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS
110	成熟 wt mP40 Uniprot Q3ZAX5 (シグナル配列なし)	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSG KTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKN KTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYS TSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFV RIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSS CSKWACVPCRVRS

111	DR852 mIL12(p35-IRES2-p40)His8をコードするDNA配列	AGAGTGATCCCCGTGTCTGGACCTGCCAGATGTCTGAGCCAGTCCAGAA ACCTGCTGAAAACCACCGACGACATGGTCAAGACCGCCAGAGAGAAGCT GAAGCACTACAGCTGCACCGCCGAGGACATCGACCACGAGGATATCACC AGGGACCAGACCAGCACACTGAAAACCTGCCTGCCTCTGGAACTGCACA AGAACGAGAGCTGCCTGGCCACCAGAGAGACAAGCAGCACAACAAGAGG CAGCTGTCTGCCTCCTCAGAAAACCAGCCTGATGATGACCCTGTGCCTG GGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGACCGAGTTCCAGGCCA TCAACGCCGCTCTGCAGAACCACAACCACCAGCAGATCATCCTGGACAA GGGCATGCTGGTGGCTATCGACGAGCTGATGCAGAGCCTGAACCACAAT GGCGAGACACTGCGGCAGAAGCCTCCAGTTGGAGAGGCCGATCCTTACA GAGTGAAGATGAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTTCAGCACCAGAGT GGTCACCATCAACAGAGTGATGGGCTACCTGAGCAGCGCCTGATAAGCT AGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTG GAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGC CGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGAC GAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTG TTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAA CAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGA CAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAG GCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAG TCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCA GAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGC TTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACC ACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAA CCATGTGCCCTCAGAAGCTGACCATCAGTTGGTTCGCCATCGTGCTGCT GGTGTCCCCACTGATGGCCATGTGGGAGCTTGAGAAGGACGTGTACGTG GTGGAAGTGGACTGGACCCCTGATGCTCCTGGCGAGACAGTGAACCTGA CCTGCGATACCCCTGAAGAGGACGACATCACCTGGACCAGCGACCAGAG ACATGGCGTGATCGGCTCTGGCAAGACCCTGACAATTACCGTGAAAGAG TTCCTGGACGCCGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGCGGAGAGACACTGA GCCACTCTCATCTGCTGCTGCACAAGAAAGAGAACGGCATCTGGTCCAC CGAGATCCTGAAGAACTTCAAGAACAAGACCTTCCTGAAGTGCGAGGCC CCTAACTACAGCGGCAGATTCACCTGTAGCTGGCTGGTGCAGCGGAACA TGGACCTGAAGTTCAACATCAAGTCCTCCAGCAGCAGCCCCGACAGCAG AGCTGTGACATGTGGCATGGCTTCTCTGAGCGCCGAGAAAGTGACCCTG GATCAGCGGGACTACGAGAAGTACAGCGTGTCCTGCCAAGAGGACGTGA CCTGTCCTACCGCCGAGGAAACACTGCCTATCGAGCTGGCCCTGGAAGC CCGGCAGCAGAACAAATACGAGAACTACTCCACCAGCTTTTTCATCCGG GACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGATGAAGCCTCTGA AGAACAGCCAGGTCGAGGTGTCCTGGGAGTACCCCGATAGCTGGTCTAC CCCTCACAGCTACTTCAGCCTGAAATTCTTCGTGCGCATCCAGCGCAAG AAAGAAAAGATGAAGGAAACCGAGGAAGGCTGCAACCAGAAAGGGGCCT TCCTGGTGGAAAAGACCAGCACCGAGGTGCAGTGCAAAGGCGGCAATGT TTGTGTGCAGGCCCAGGATCGGTACTACAACAGCAGCTGTAGCAAGTGG GCCTGCGTGCCATGTAGAGTCCGGAGTCACCACCATCATCACCATCACC AC

112	DR1022Pをコードする DNA配列 mIL12 (p35-IRES2-p40 E81A F82A) His8	AGAGTGATCCCCGTGTCTGGACCTGCCAGATGTCTGAGCCAGTCCAGAA ACCTGCTGAAAACCACCGACGACATGGTCAAGACCGCCAGAGAGAAGCT GAAGCACTACAGCTGCACCGCCGAGGACATCGACCACGAGGATATCACC AGGGACCAGACCAGCACACTGAAAACCTGCCTGCCTCTGGAACTGCACA AGAACGAGAGCTGCCTGGCCACCAGAGAGACAAGCAGCACAACAAGAGG CAGCTGTCTGCCTCCTCAGAAAACCAGCCTGATGATGACCCTGTGCCTG GGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGACCGAGTTCCAGGCCA TCAACGCCGCTCTGCAGAACCACAACCACCAGCAGATCATCCTGGACAA GGGCATGCTGGTGGCTATCGACGAGCTGATGCAGAGCCTGAACCACAAT GGCGAGACACTGCGGCAGAAGCCTCCAGTTGGAGAGGCCGATCCTTACA GAGTGAAGATGAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTTCAGCACCAGAGT GGTCACCATCAACAGAGTGATGGGCTACCTGAGCAGCGCCTGATAAGCT AGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTG GAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGC CGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGAC GAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTG TTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAA CAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGA CAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAG GCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAG TCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCA GAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGC TTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACC ACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAA CCATGTGCCCTCAGAAGCTGACCATCAGTTGGTTCGCCATCGTGCTGCT GGTGTCCCCACTGATGGCCATGTGGGAGCTTGAGAAGGACGTGTACGTG GTGGAAGTGGACTGGACCCCTGATGCTCCTGGCGAGACAGTGAACCTGA CCTGCGATACCCCTGAAGAGGACGACATCACCTGGACCAGCGACCAGAG ACATGGCGTGATCGGCTCTGGCAAGACCCTGACAATTACCGTGAAAGCG GCCCTGGACGCCGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGCGGAGAGACACTGA GCCACTCTCATCTGCTGCTGCACAAGAAAGAGAACGGCATCTGGTCCAC CGAGATCCTGAAGAACTTCAAGAACAAGACCTTCCTGAAGTGCGAGGCC CCTAACTACAGCGGCAGATTCACCTGTAGCTGGCTGGTGCAGCGGAACA TGGACCTGAAGTTCAACATCAAGTCCTCCAGCAGCAGCCCCGACAGCAG AGCTGTGACATGTGGCATGGCTTCTCTGAGCGCCGAGAAAGTGACCCTG GATCAGCGGGACTACGAGAAGTACAGCGTGTCCTGCCAAGAGGACGTGA CCTGTCCTACCGCCGAGGAAACACTGCCTATCGAGCTGGCCCTGGAAGC CCGGCAGCAGAACAAATACGAGAACTACTCCACCAGCTTTTTCATCCGG GACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGATGAAGCCTCTGA AGAACAGCCAGGTCGAGGTGTCCTGGGAGTACCCCGATAGCTGGTCTAC CCCTCACAGCTACTTCAGCCTGAAATTCTTCGTGCGCATCCAGCGCAAG AAAGAAAAGATGAAGGAAACCGAGGAAGGCTGCAACCAGAAAGGGGCCT TCCTGGTGGAAAAGACCAGCACCGAGGTGCAGTGCAAAGGCGGCAATGT TTGTGTGCAGGCCCAGGATCGGTACTACAACAGCAGCTGTAGCAAGTGG GCCTGCGTGCCATGTAGAGTCCGGAGTCACCACCATCATCACCATCACC AC

113	DR1023Pをコードする DNA配列 mIL12 (p35-IRES2-p40 E81A F82A K106A) His8	AGAGTGATCCCCGTGTCTGGACCTGCCAGATGTCTGAGCCAGTCCAGAA ACCTGCTGAAAACCACCGACGACATGGTCAAGACCGCCAGAGAGAAGCT GAAGCACTACAGCTGCACCGCCGAGGACATCGACCACGAGGATATCACC AGGGACCAGACCAGCACACTGAAAACCTGCCTGCCTCTGGAACTGCACA AGAACGAGAGCTGCCTGGCCACCAGAGAGACAAGCAGCACAACAAGAGG CAGCTGTCTGCCTCCTCAGAAAACCAGCCTGATGATGACCCTGTGCCTG GGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGACCGAGTTCCAGGCCA TCAACGCCGCTCTGCAGAACCACAACCACCAGCAGATCATCCTGGACAA GGGCATGCTGGTGGCTATCGACGAGCTGATGCAGAGCCTGAACCACAAT GGCGAGACACTGCGGCAGAAGCCTCCAGTTGGAGAGGCCGATCCTTACA GAGTGAAGATGAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTTCAGCACCAGAGT GGTCACCATCAACAGAGTGATGGGCTACCTGAGCAGCGCCTGATAAGCT AGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTG GAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGC CGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGAC GAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTG TTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAA CAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGA CAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAG GCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAG TCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCA GAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGC TTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACC ACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAA CCATGTGCCCTCAGAAGCTGACCATCAGTTGGTTCGCCATCGTGCTGCT GGTGTCCCCACTGATGGCCATGTGGGAGCTTGAGAAGGACGTGTACGTG GTGGAAGTGGACTGGACCCCTGATGCTCCTGGCGAGACAGTGAACCTGA CCTGCGATACCCCTGAAGAGGACGACATCACCTGGACCAGCGACCAGAG ACATGGCGTGATCGGCTCTGGCAAGACCCTGACAATTACCGTGAAAGCG GCCCTGGACGCCGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGCGGAGAGACACTGA GCCACTCTCATCTGCTGCTGCACGCGAAAGAGAACGGCATCTGGTCCAC CGAGATCCTGAAGAACTTCAAGAACAAGACCTTCCTGAAGTGCGAGGCC CCTAACTACAGCGGCAGATTCACCTGTAGCTGGCTGGTGCAGCGGAACA TGGACCTGAAGTTCAACATCAAGTCCTCCAGCAGCAGCCCCGACAGCAG AGCTGTGACATGTGGCATGGCTTCTCTGAGCGCCGAGAAAGTGACCCTG GATCAGCGGGACTACGAGAAGTACAGCGTGTCCTGCCAAGAGGACGTGA CCTGTCCTACCGCCGAGGAAACACTGCCTATCGAGCTGGCCCTGGAAGC CCGGCAGCAGAACAAATACGAGAACTACTCCACCAGCTTTTTCATCCGG GACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGATGAAGCCTCTGA AGAACAGCCAGGTCGAGGTGTCCTGGGAGTACCCCGATAGCTGGTCTAC CCCTCACAGCTACTTCAGCCTGAAATTCTTCGTGCGCATCCAGCGCAAG AAAGAAAAGATGAAGGAAACCGAGGAAGGCTGCAACCAGAAAGGGGCCT TCCTGGTGGAAAAGACCAGCACCGAGGTGCAGTGCAAAGGCGGCAATGT TTGTGTGCAGGCCCAGGATCGGTACTACAACAGCAGCTGTAGCAAGTGG GCCTGCGTGCCATGTAGAGTCCGGAGTCACCACCATCATCACCATCACC AC
114	DR854 mIL12 p40 mIgG2A EW LALA PG	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGS GKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNF KNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGM ASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKY ENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFS LKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQD RYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK NTEPVLDSDGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPG

115	DR855 mIL12-p35-mIgG2A-RVT-LALAPG	RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDIT RDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCL GSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHN GETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGGG GSGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLM ISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPRVYV LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLV SDGSYTMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG
116	DR1243P mIL12 p40 E81A F82A mIgG2a EW LALA PG	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGS GKTLTITVKAALDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNF KNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGM ASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKY ENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFS LKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQD RYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK NTEPVLDSDGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPG
117	DR1244P mIL12 p40 E81A F82A K106A mIgG2a EW LALA PG	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGS GKTLTITVKAALDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHAKENGIWSTEILKNF KNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGM ASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKY ENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFS LKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQD RYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK NTEPVLDSDGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPG

118	DR1595Pをコードする DNA配列	ATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGTATCCC GATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACCCCTGAAGAGGAC GGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCGGCAGCGGCAAG ACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGT CACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTCCACGCGAAA GAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAGAAAGAGCCCAAG AACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACAGCGGCCGGTTCACA TGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAGTCC AGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACATGTGGCGCTGCCACACTG TCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAGAATACGAGTACAGCGTGGAA TGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGCCGAAGAGTCTCTGCCTATCGAA GTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCTCCAGC TTTTTCATCCGGGACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTG AAGCCTCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGAC ACCTGGTCTACACCCCACAGCTACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTG CAGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACC AGCGCCACCGTGATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAG GATCGGTACTACAGCAGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGC GGAGGCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGAACCAAAATCATCAGACAAG ACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGAAGGGGCCCCTTCC GTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAGATCCAGAAGTG

		AAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAG CCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCCTCTTCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGC CAGCCTCGGGAACCCCAGGTTTACACACTGCCTCCATGCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC GATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAG ACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAG CTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC GTGATGCACGAAGCTTTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTG TCCCCTGGC

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
119	DR1947P (3xAla p40 Fc プレタンパク質)	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
120	DR1947Pをコードする核酸配列	ATGTGTCACCAGCAGCTGGTCATCAGCTGGTTCAGCCTGGTGTTCCTGGCCT CTCCTCTGGTGGCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACT GGACTGGTATCCCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACC CCTGAAGAGGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCG GCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCA GTACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTC CACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAGAAAG AGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACAGCGGCCG GTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTG AAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACATGTGGCGCTGCCA CACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAGAATACGAGTACAGCGT GGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGCCGAAGAGTCTCTGCCTATC GAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCTCCA GCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCT GAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGAC ACCTGGTCTACACCCCACAGCTACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGC AGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAG CGCCACCGTGATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGAT CGGTACTACAGCAGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGGAG GCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGAACCAAAATCATCAGACAAGACCCA CACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCAGGGGGCCCTTCCGTGTTT CTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAGATCCAGAAGTGAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG GAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT GGCCGCTCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAA CCCCAGGTTTACACACTGCCTCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGA ATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTG CTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGT CCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGTTGCACGAAGCTTT GCACTCTCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC
121	DR1947M 成熟 3xAla p40 Fc タンパク質	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSK REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
122	DR1948P Wt P35 Fc 前駆体 （シグナル配列には 下線を付けた）	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
123	DR1948Pをコードする 核酸配列	ATGTGCCCTGCCAGATCTCTGCTGCTGGTGGCTACACTGGTGCTGCTGGATC ATCTGAGCCTGGCCAGAAACCTGCCAGTGGCCACGCCTGATCCTGGCATGTT TCCTTGTCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTG CAGAAGGCCAGACAGACCCTCGAGTTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCG ACCACGAGGACATCACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCC TCTGGAACTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACAAGCTTC ATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCCTTCATGATGGCCC TGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTCGAGTTCAA GACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGCGGCAGATCTTCCTGGAC CAGAATATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACA GCGAGACAGTGCCCCAGAAGTCCAGCCTGGAAGAACCCGACTTCTACAAGAC CAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTTCCGGATCAGAGCCGTGACC ATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCCAGCGGAGGCGGAGGATCCGGCG GAGGTGGAAGTGAACCAAAATCATCAGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATG TCCTGCTCCAGAAGCTGCAGGGGGTCCCTCCGTTTTTCTGTTCCCACCTAAG CCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGG TGGATGTGTCTCACGAAGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCC ACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGA AAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTGCACC CTGCCTCCAAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCTGTG CCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGG CCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGC TCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGG GCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGCTGCACGAAGCTTTGCACTCCCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCTGGA
124	DR1948M シグナルペプチド を有さない 成熟wt hP35 Fc タンパク質	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDI TKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSE PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
125	DR1536P Wt P35 Fc 前駆体 タンパク質	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
126	DR1537P (3xAla p40 Fc プレタンパク質)	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
127	DR2088P 3xAla p40Fc 前駆体タンパク質	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
128	DR2088Pをコードする核酸配列	ATGTGTCACCAGCAGCTGGTCATCAGCTGGTTCAGCCTGGTGTTCCTGGCCT CTCCTCTGGTGGCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACT GGACTGGTATCCCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACC CCTGAAGAGGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCG GCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCA GTACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTC CACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAGAAAG AGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACAGCGGCCG GTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTG AAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACATGTGGCGCTGCCA CACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAGAATACGAGTACAGCGT GGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGCCGAAGAGTCTCTGCCTATC GAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCTCCA GCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCT GAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGAC ACCTGGTCTACACCCCACAGCTACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGC AGGGCAAGTCCGGGCGCGAGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAG CGCCACCGTGATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGAT CGGTACTACAGCAGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGGAG GCGGAGGATCCGGCGGAGGTGGAAGTGAACCAAAATCATCAGACAAGACCCA CACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCAGGGGGCCCTTCCGTGTTT CTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAGATCCAGAAGTGAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG GAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT GGCCGCTCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAA CCCCAGGTTTACACACTGCCTCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGA ATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTG CTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGT CCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGTTGCACGAAGCTTT GCACTCTCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
129	DR2088M 成熟 3xAla p40 Fc タンパク質	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
130	DR2092P 3xAla p40Fc 前駆体タンパク質	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
131	DR2092Pをコードする 核酸配列	ATGTGTCACCAGCAGCTGGTCATCAGCTGGTTCAGCCTGGTGTTCCTGGCCT CTCCTCTGGTGGCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAACT GGACTGGTATCCCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGATACC CCTGAAGAGGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCG GCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAGTGAAAGCGGCTGGCGACGCCGGCCA GTACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTC CACGCGAAAGAGGATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAGAAAG AGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAACTACAGCGGCCG GTTCACATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTG AAGTCCAGCAGAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTACATGTGGCGCTGCCA CACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGCGACAACAAAGAATACGAGTACAGCGT GGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGCCGAAGAGTCTCTGCCTATC GAAGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCTCCA GCTTTTTCATCCGGGACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCT GAAGCCTCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAAGTGTCCTGGGAGTACCCCGAC ACCTGGTCTACACCCCACAGCTACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTGC AGGGCAAGTCCGGGCGCGAGAAAAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAG CGCCACCGTGATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGAT CGGTACTACAGCAGCTCTTGGAGCGAGTGGGCCTCGGTACCATGTAGCGGAG GCGGAGGATCCGGCGGAGGCGGATCTGAACCAAAATCATCAGACAAGACCCA CACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGGGGCCCTTCCGTGTTT CTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAAGATCCAGAAGTGAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG GAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT GGCCGCTCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAA CCCCAGGTTTACACACTGCCTCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGA ATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTG CTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGT CCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTTT GCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
132	DR2092M 成熟 3xAla p40Fc タンパク質	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
133	DR2455P 3xAla p40Fc 前駆体タンパク質	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
134	DR2455Pをコードする核酸配列	ATGTGCCATCAACAGCTTGTTATCAGCTGGTTCTCATTGGTCTTCCTGGCAA GCCCACTGGTGGCAATCTGGGAACTGAAGAAAGACGTGTACGTAGTGGAACT GGACTGGTATCCTGACGCTCCTGGGGAGATGGTCGTTCTGACCTGCGATACC CCGGAAGAGGATGGAATTACCTGGACCCTCGACCAGTCTTCAGAAGTGCTGG GCAGCGGAAAAACACTGACCATTCAGGTGAAGGAGTTCGGCGATGCCGGACA GTACACCTGCCATAAGGGTGGCGAAGTGTTGTCCCATAGCTTGCTGCTCCTG CATAAAAAGGAGGACGGAATCTGGAGCACCGACATTCTGAAGGACCAGAAGG AACCAAAGAACAAAACATTTCTGCGTTGCGAGGCGAAAAACTACTCTGGCCG CTTCACCTGTTGGTGGCTGACAACCATCAGCACCGATCTGACCTTCTCCGTG AAGTCCTCACGCGGCTCCAGCGATCCTCAGGGTGTTACTTGCGGAGCTGCAA CGCTTAGTGCGGAAAGAGTGAGGGGTGATAACAAGGAATACGAATACTCCGT GGAATGTCAGGAAGATAGCGCCTGCCCTGCTGCCGAGGAATCATTGCCAATC GAGGTGATGGTGGACGCCGTGCATAAGCTGAAGTACGAAAATTACACGAGCA GTTTTTTCATTCGCGATATCATTAAGCCAGACCCTCCCAAAAACTTGCAGCT GAAGCCTCTGAAGAACAGTAGGCAGGTCGAGGTTTCTTGGGAATACCCGGAT ACTTGGTCCACCCCTCACAGCTATTTTTCCTTGACGTTCTGCGTCCAGGTGC AAGGCAAGTCCAAGCGGGAAAAAAAGGACAGGGTGTTTACCGATAAGACTAG CGCCACTGTGATTTGCCGTAAAAACGCTAGTATTTCCGTGCGTGCCCAAGAC CGCTACTATAGCTCCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTTCCCTGTTCCGGCG GTGGGGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCCGAGCCTAAGAGTAGCGACAAGACTCA CACCTGTCCCCCTTGTCCCGCGCCGGAGGCCGCTGGAGGTCCTTCAGTATTC CTGTTTCCTCCAAAGCCTAAAGATACCCTGATGATCTCTCGCACGCCAGAGG TTACTTGCGTGGTAGTGGACGTATCCCACGAAGATCCTGAAGTCAAGTTCAA CTGGTACGTCGATGGAGTGGAGGTGCATAACGCTAAGACAAAACCAAGAGAG GAACAGTACAACTCTACATACCGGGTTGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACC AAGACTGGCTTAATGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTCTCTAACAAAGCCCT GGCGGCCCCCATTGAAAAGACTATTAGCAAAGCTAAGGGCCAACCGAGGGAG CCACAGGTTTACACGCTGCCTCCATGCCGTGACGAACTCACCAAGAATCAGG TGTCCCTGTGGTGTTTGGTGAAAGGCTTTTACCCCAGCGATATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAAAATAACTATAAAACAACCCCACCCGTG CTGGACAGTGACGGTTCCTTCTTTTTGTATTCTAAGCTGACCGTGGACAAAA GCAGGTGGCAACAGGGAAACGTCTTTTCTTGCTCAGTGCTGCACGAGGCCCT CCACTCTCACTATACGCAGAAGTCTCTGTCTCTGTCCCCAGGC

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
135	DR2455M 3xAla p40Fc 成熟タンパク質	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSK REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
136	DR2456P p40 LALA PA K282G	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
137	DR2456Pをコードする 核酸配列	ATGTGCCATCAACAGCTCGTTATCAGCTGGTTCTCTCTTGTGTTCCTTGCTT CCCCTCTTGTGGCAATTTGGGAGCTTAAAAAGGACGTTTACGTAGTGGAGCT GGACTGGTATCCAGACGCGCCGGGTGAGATGGTAGTGTTGACCTGTGACACC CCAGAAGAGGACGGAATCACCTGGACATTGGATCAGAGTTCCGAGGTGCTCG GCAGCGGCAAGACACTGACCATCCAGGTGAAAGAATTTGGTGACGCCGGTCA ATACACTTGTCACAAGGGTGGCGAGGTGTTGTCTCACTCCCTTCTGCTCCTT CATAAAAAGGAAGACGGCATCTGGAGTACGGACATCCTGAAGGACCAGAAGG AGCCTAAGAATAAGACCTTCCTGCGTTGCGAGGCCAAGAACTACTCTGGCCG CTTTACTTGTTGGTGGCTCACAACTATCTCAACCGACCTGACCTTTTCTGTA AAAAGCTCTCGGGGCAGCTCCGATCCTCAGGGTGTTACTTGCGGGGCAGCCA CCCTGAGCGCCGAGCGTGTGCGCGGCGACAATAAAGAGTACGAATACTCTGT TGAGTGTCAGGAGGACTCAGCTTGCCCCGCAGCGGAAGAGTCTTTGCCTATC GAGGTCATGGTGGACGCCGTGCATAAGCTGAAATACGAGAATTATACAAGCT CATTCTTTATCCGTGATATTATCAAGCCCGATCCCCCGAAGAATCTCCAGCT GAAACCCCTGAAGAACTCCCGCCAGGTCGAGGTGAGCTGGGAGTACCCCGAT ACCTGGAGTACTCCCCACAGCTATTTCAGTCTCACCTTTTGCGTGCAGGTGC AGGGAAAGTCTGGTCGCGAGAAGAAAGATCGCGTATTTACCGATAAGACCAG TGCTACTGTCATTTGCCGCAAAAACGCGAGCATCTCCGTTCGCGCTCAGGAC CGCTACTATTCTAGCTCATGGTCAGAGTGGGCCAGTGTACCTTGTAGCGGCG GAGGGGGTAGCGGTGGCGGTGGCTCCGAGCCCAAAAGTAGCGACAAGACACA CACCTGTCCCCCTTGCCCGGCTCCCGAGGCCGCTGGAGGCCCCTCCGTATTC CTTTTTCCCCCGAAGCCTAAGGACACCCTTATGATCTCTCGTACCCCTGAGG TGACTTGCGTTGTCGTTGATGTCAGCCACGAAGATCCAGAGGTGAAGTTCAA CTGGTATGTCGATGGCGTTGAGGTCCATAACGCTAAAACAAAGCCCAGGGAG GAACAGTATAACTCCACTTACCGCGTCGTGTCCGTTCTGACAGTATTGCATC AAGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAAACAAGGCCTT GGCAGCTCCTATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCGAAGGGACAGCCTCGGGAA CCCCAGGTCTACACGCTGCCCCCTTGCCGCGATGAACTCACTAAAAATCAGG TGTCCCTGTGGTGCCTCGTGAAGGGATTCTACCCTAGCGATATTGCTGTGGA ATGGGAAAGCAACGGTCAGCCTGAAAACAATTACAAGACAACTCCACCTGTC TTGGATTCAGATGGCAGCTTTTTCCTGTACTCCAAGCTCACCGTGGACAAGT CCCGTTGGCAACAGGGTAACGTGTTTTCTTGCAGCGTTCTTCACGAAGCCCT GCACTCCCATTATACTCAGAAGTCCTTGTCACTTTCACCTGGG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
138	DR2456M 3xAla p40Fc 成熟タンパク質	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
139	シグナルを有する DR2086P前駆体 ヒト p40 E81A F82A K106A K260Q hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C M428L N434S DelK447	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
140	DR2086Pをコードする 核酸配列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
141	DR2086M ヒト p40 E81A F82A K106A K260Q hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C M428L N434S DelK447	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQ REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
142	シグナルを有する DR2087P前駆体 ヒト p40 E81A F82A K106A K260N hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C M428L N434S DelK447	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSNREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
143	DR2087Pをコードする核酸配列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSNREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
144	DR2087M 成熟 ヒト p40 E81A F82A K106A K260N hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C M428L N434S DelK447	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSN REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
145	シグナルを有するDR2090P前駆体 ヒト p40 E81A F82A K106A K260Q hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C DelK447	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
146	DR2090Pをコードする核酸配列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
147	DR2090M 成熟 ヒト p40 E81A F82A K106A K260Q hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C DelK447	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
148	シグナルを有する DR2091P前駆体 ヒト p40 E81A F82A K106A K260N hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C DelK447	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSNREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
149	DR2091Pをコードする核酸配列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSNREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
150	DR2091M 成熟 ヒト p40 E81A F82A K106A K260N hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C DelK447	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSN REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
151	シグナルを有する DR2092P前駆体 ヒト p40 E81A F82A K106A K260G hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C DelK447	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
152	DR2092Pをコードする核酸配列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
153	DR2092M ヒト p40 E81A F82A K106A K260G hIgG1 KiH ノブ C220S LALAPA S354C DelK447	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
154	DR1535P 前駆体	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
155	hP40 E81A/F82A/K106A /K282G	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**G**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
156	hP40 E81A/F82A/K106A /K282A,	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**A**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
157	hP40 E81A/F82A/K106A /K282N	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**N**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
158	hP40 E81A/F82A/K106A /K282Q	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH**A**KEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**Q**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
159	hP40 E81A/F82A/K282G	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**G**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
160	hP40 E81A/F82A/K282A	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**A**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
161	hP40 E81A/F82A/K282N	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**N**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
162	E81A/F82A/K282Q	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVK**AA**GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVR**Q**DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSG REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
163	DR1442P	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
164	DR1535P	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
165	DR1536P	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

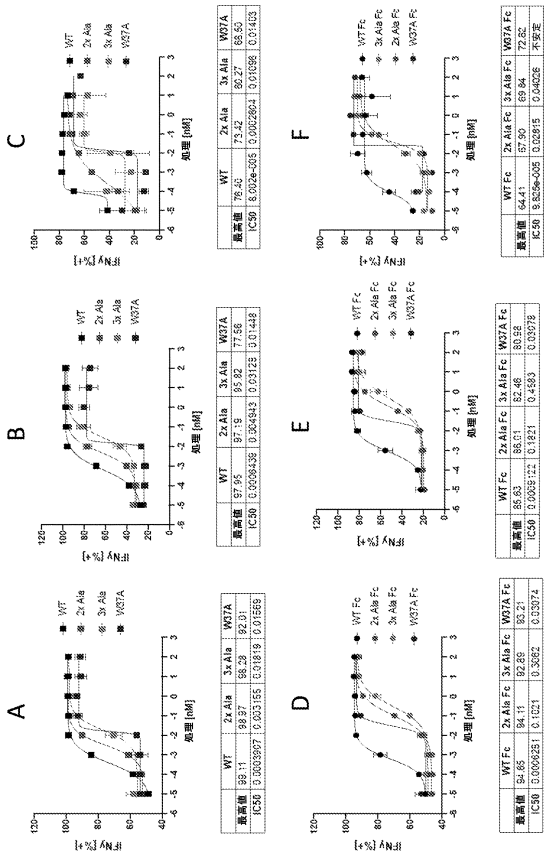
SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
166	DR1537P	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
167	DR1572P	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
168	DR1573P	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
169	DR1588P	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
170	DR1589P	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSS DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
171	DR1590P	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL1573 LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
172	DR1591P	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
173	DR1595P	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
174	DR1596P	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
175	DR1597P	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

SEQ ID	名称/説明	アミノ酸またはヌクレオチド配列
176	DR1598P	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG
177	ヒトp19P前駆体 野生型 UniProt Ref: Q9NPF7	MLGSRAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVG HMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLL GSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPW QRLLLRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP
178	ヒトP19M 成熟 野生型p19 UniProt Ref: Q9NPF7	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHI QCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQ LHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAV AARVFAHGAATLSP
179	野生型ヒトp35 シグナルペプチド	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLA
180	野生型ヒトp40 シグナルペプチド	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA
181	mREH	APTSSSTSSSTAEAQQQQQHLEQLRMDLEELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFY LPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKL KGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCHSIISTSPQ

【図面】

【図１】



	WT	2x Ala	3x Ala	W37A
最高値	78.40	73.42	80.27	68.50
IC50	8.602e-005	0.0002804	0.01098	0.01403

	WT Fc	2x Ala Fc	3x Ala Fc	W37A Fc
最高値	64.41	57.90	69.84	72.82
IC50	9.825e-005	0.02815	0.04026	不安定

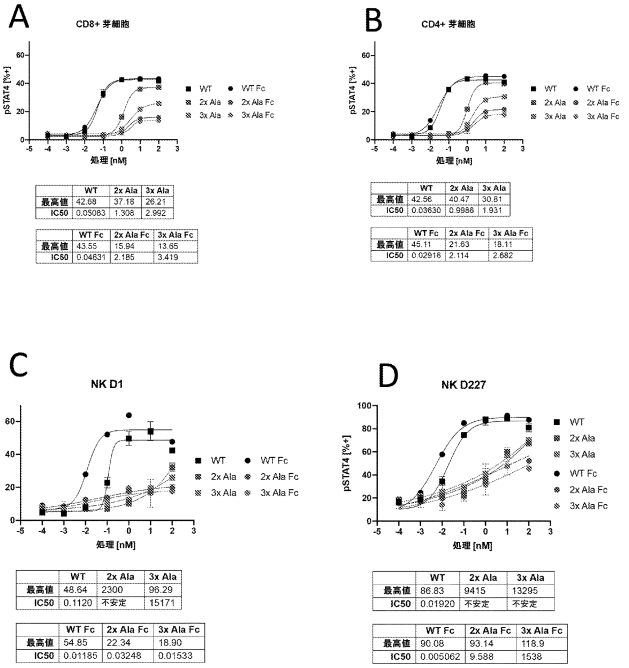
	WT	2x Ala	3x Ala	W37A
最高値	97.95	97.19	95.82	77.56
IC50	0.0009439	0.004943	0.03123	0.01448

	WT Fc	2x Ala Fc	3x Ala Fc	W37A Fc
最高値	85.63	86.01	82.46	80.58
IC50	0.0008122	0.1821	0.4583	0.03578

	WT	2x Ala	3x Ala	W37A
最高値	98.11	98.97	98.28	92.01
IC50	0.0003907	0.003155	0.01819	0.01569

	WT Fc	2x Ala Fc	3x Ala Fc	W37A Fc
最高値	94.85	94.11	92.89	93.21
IC50	0.0006251	0.1221	0.3262	0.03974

【図２】



	WT	2x Ala	3x Ala
最高値	42.68	37.18	26.21
IC50	0.05083	1.308	2.992

	WT Fc	2x Ala Fc	3x Ala Fc
最高値	43.55	15.94	13.65
IC50	0.04631	2.185	3.419

	WT	2x Ala	3x Ala
最高値	42.96	40.47	30.81
IC50	0.03630	0.9986	1.931

	WT Fc	2x Ala Fc	3x Ala Fc
最高値	45.11	21.63	19.11
IC50	0.02816	2.114	2.682

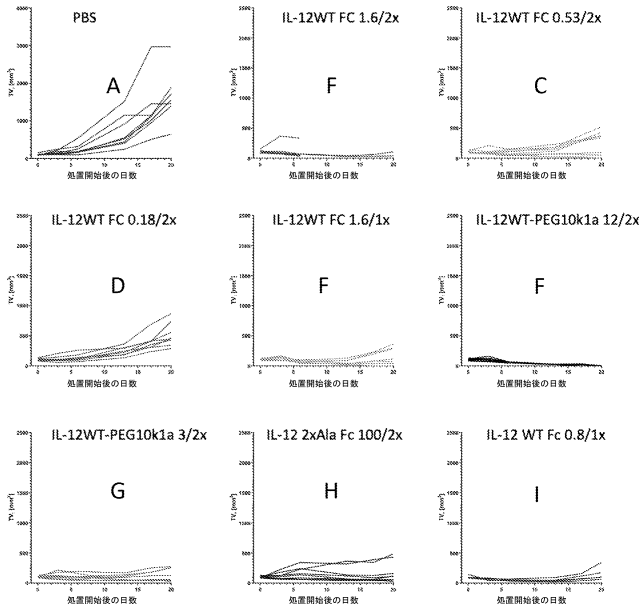
	WT	2x Ala	3x Ala
最高値	48.64	2300	98.29
IC50	0.1120	不安定	15171

	WT Fc	2x Ala Fc	3x Ala Fc
最高値	54.85	22.34	18.90
IC50	0.01185	0.03248	0.01533

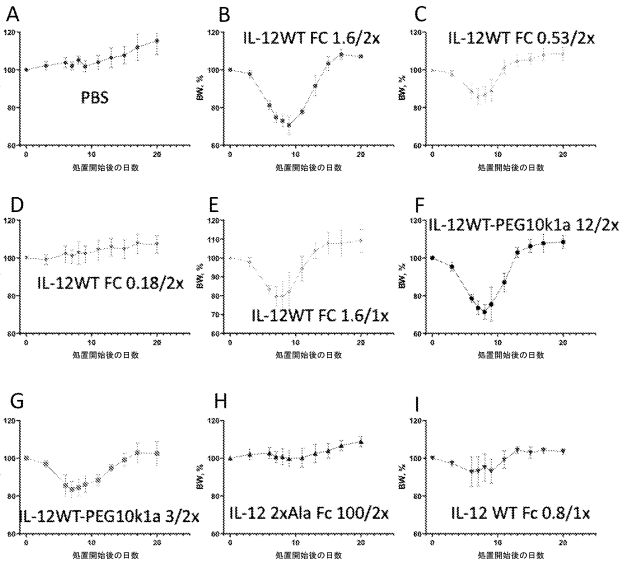
	WT	2x Ala	3x Ala
最高値	86.83	9415	13295
IC50	0.01920	不安定	不安定

	WT Fc	2x Ala Fc	3x Ala Fc
最高値	90.08	93.14	118.9
IC50	0.005062	9.588	1538

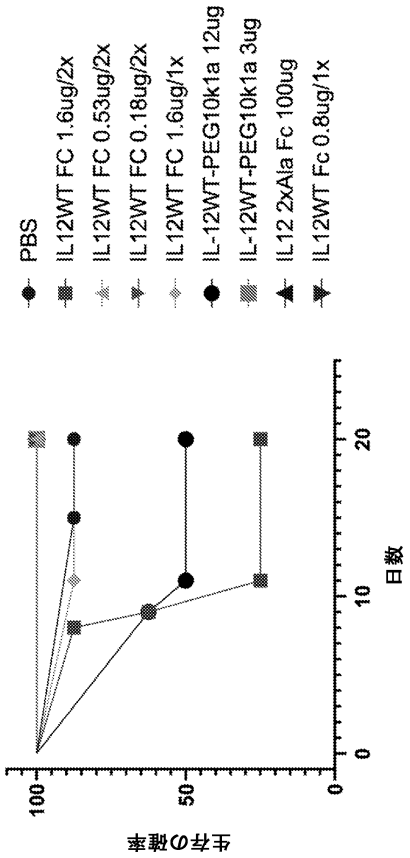
【図３】



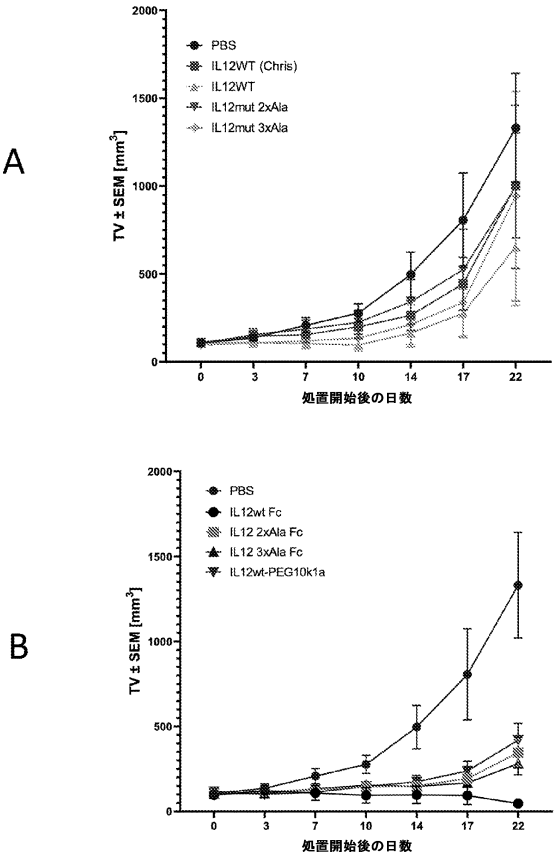
【図４】



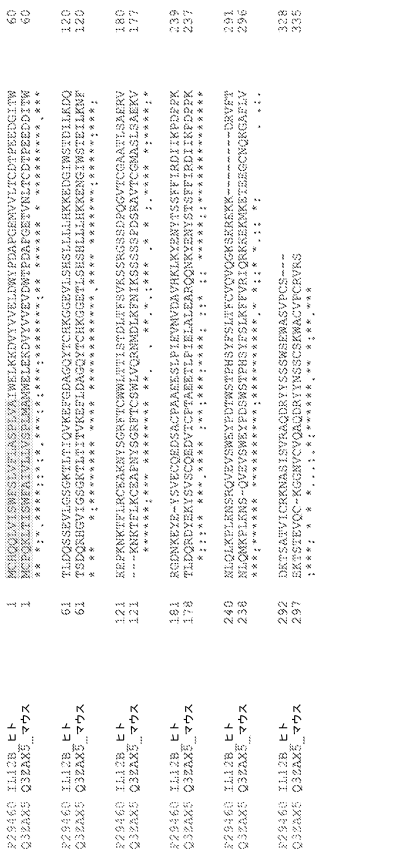
【図５】


PBS
IL12WT FC 1.6ug/2x
IL12WT FC 0.53ug/2x
IL12WT FC 0.18ug/2x
IL12WT FC 1.6ug/1x
IL-12WT-PEG10k1a 12ug
IL-12WT-PEG10k1a 3ug
IL12 2xAla Fc 100ug
IL12WT Fc 0.8ug/1x
生存の確率
100
50
0
0
10
20
日数

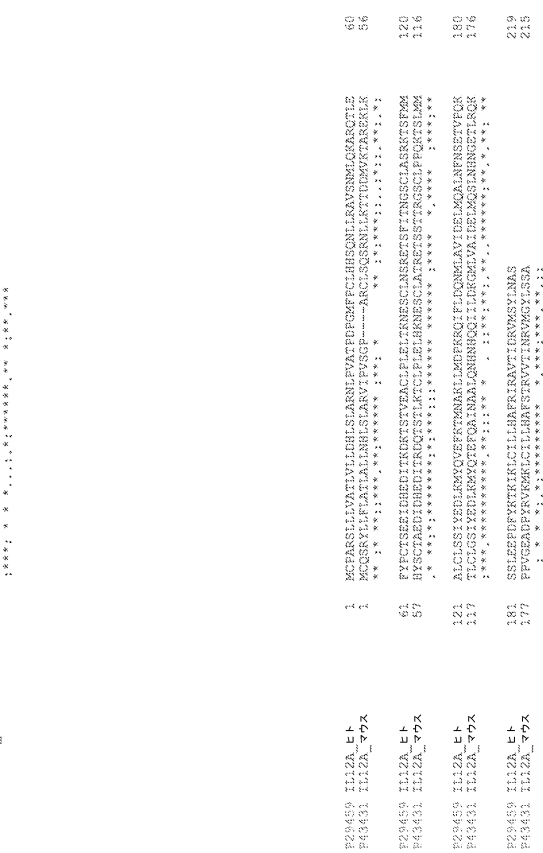
【図６】


A
PBS
IL12WT (Chris)
IL12WT
IL12mut 2xAla
IL12mut 3xAla
TV ± SEM [mm3]
2000
1500
1000
500
0
0
3
7
10
14
17
22
処置開始後の日数
B
PBS
IL12wt Fc
IL12 2xAla Fc
IL12 3xAla Fc
IL12wt-PEG10k1a
TV ± SEM [mm3]
2000
1500
1000
500
0
0
3
7
10
14
17
22
処置開始後の日数

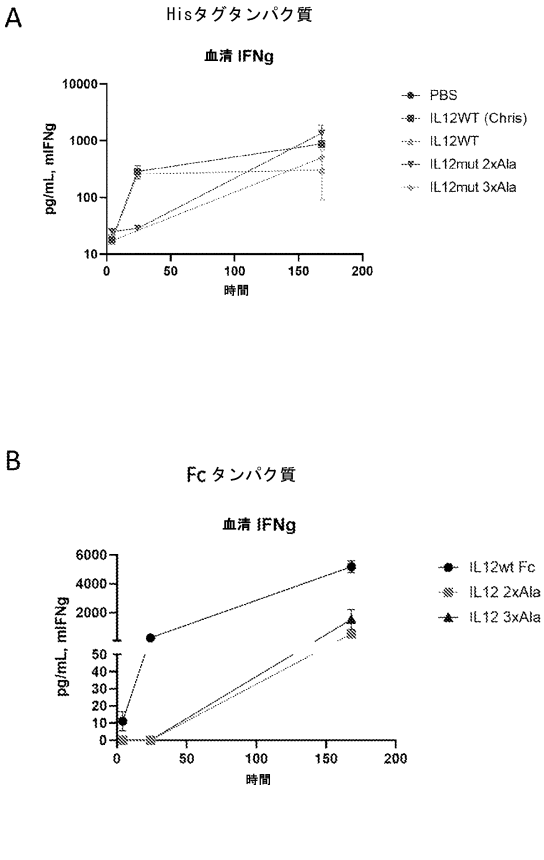
【図７】



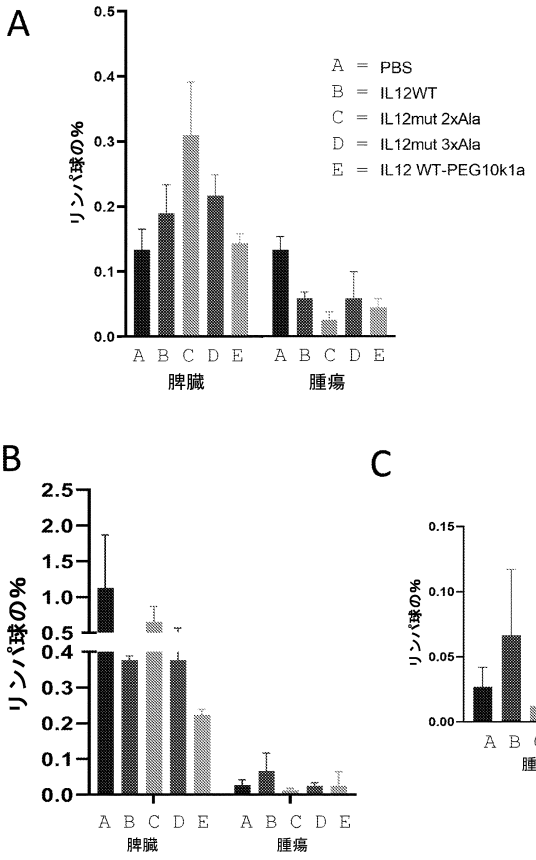
【図８】



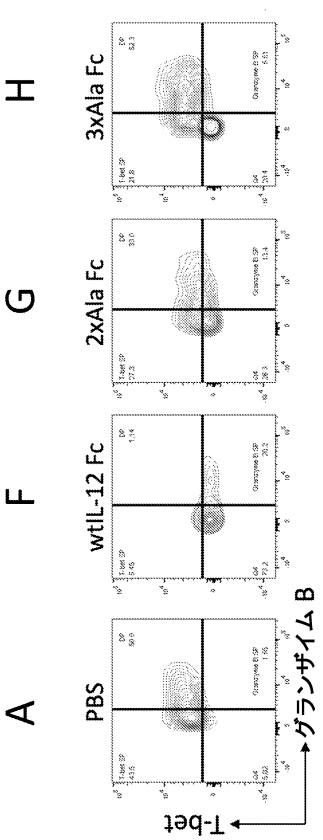
【図９】



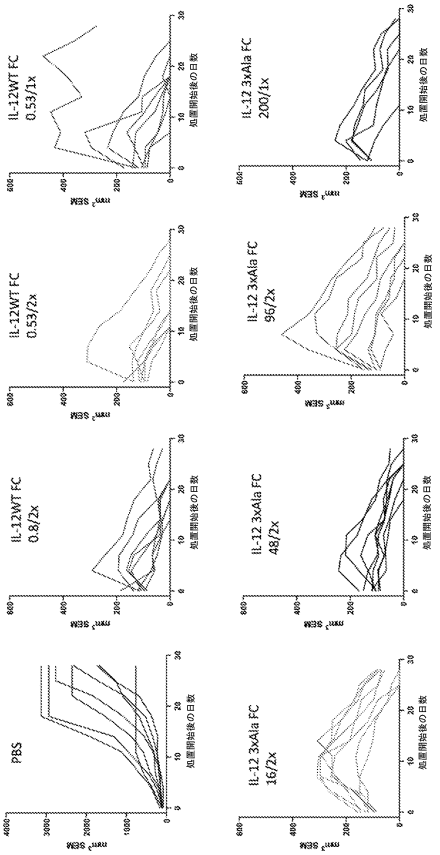
【図１０】



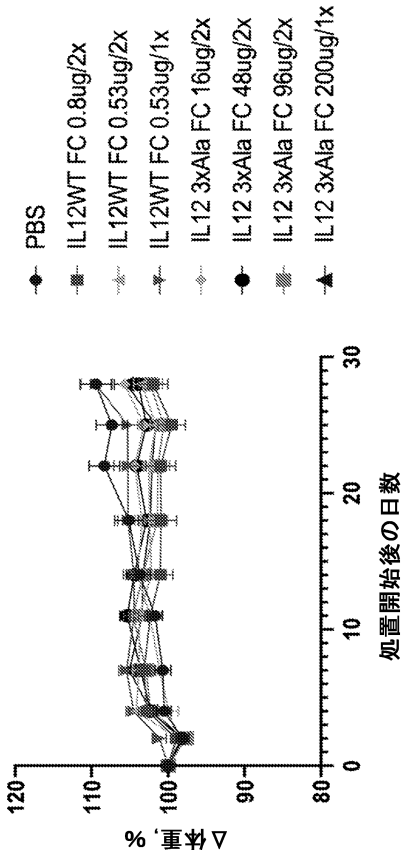
【図１１】



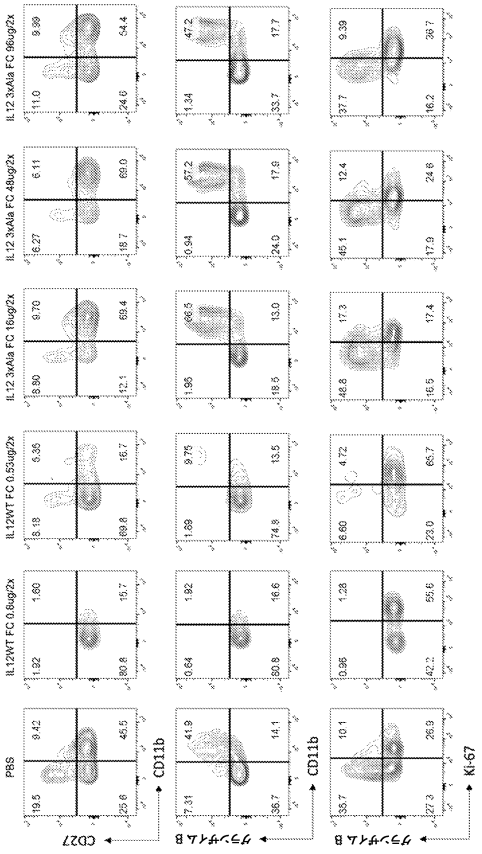
【図１２】



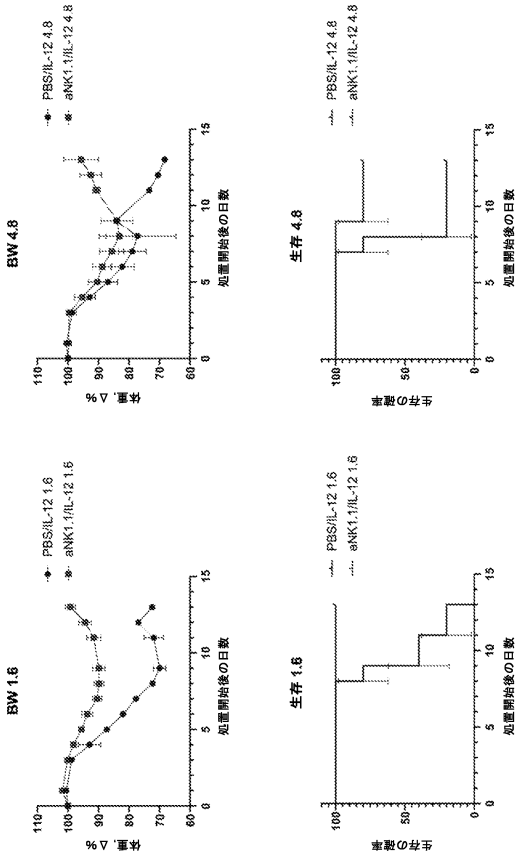
【図１３】



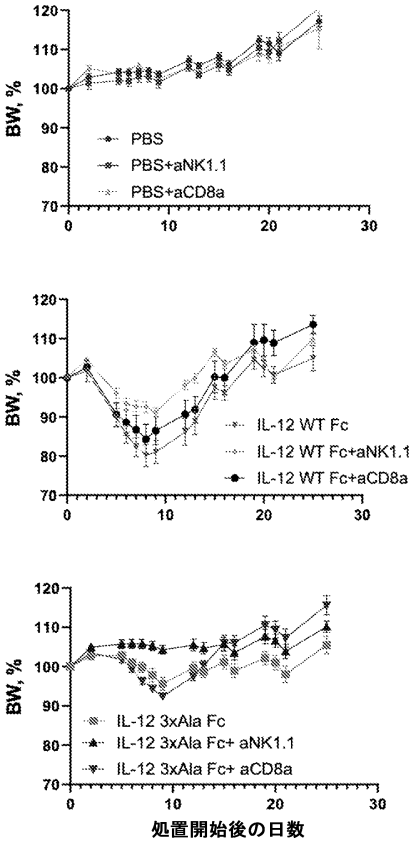
【図１４】



【図１５】



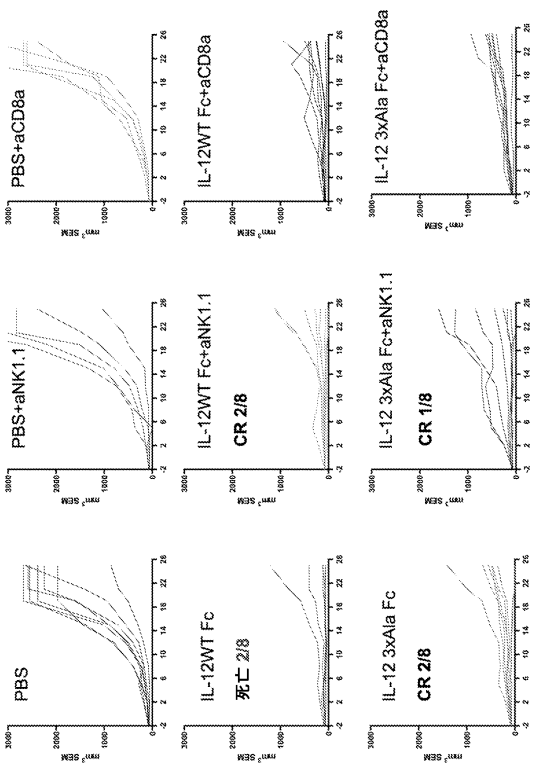
【図１６】



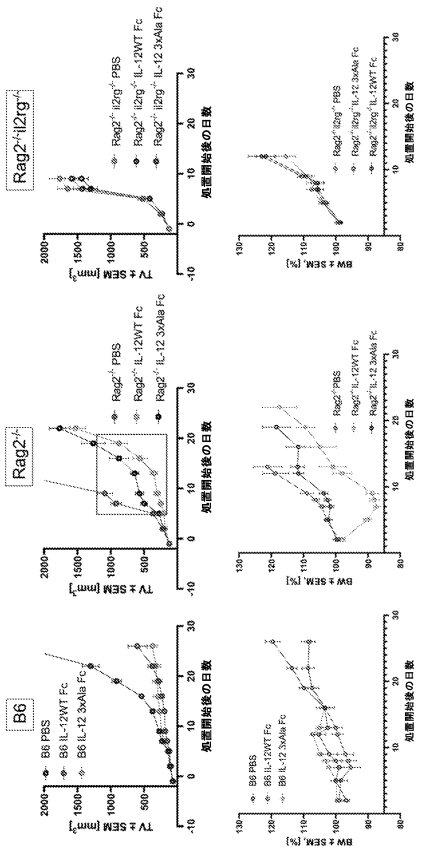
【図１７】

研究 S6-21-006

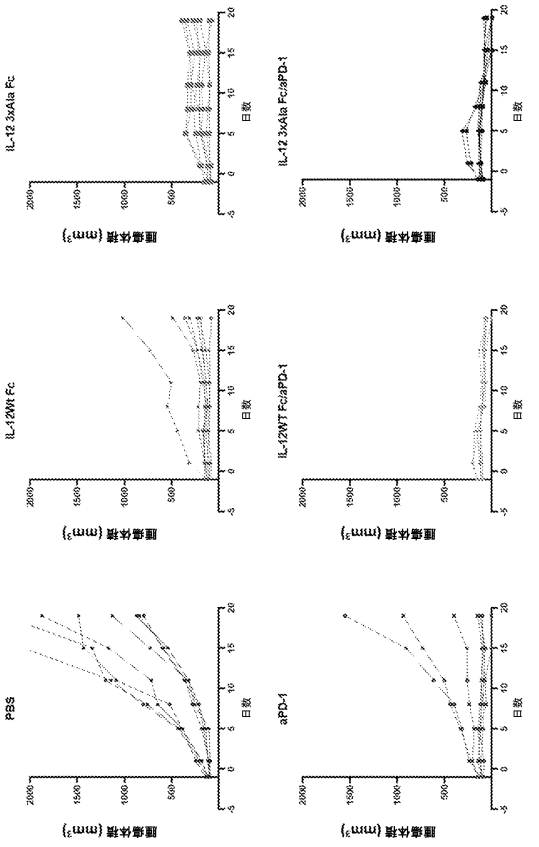
NK細胞は効力に部分的にしか寄与しない



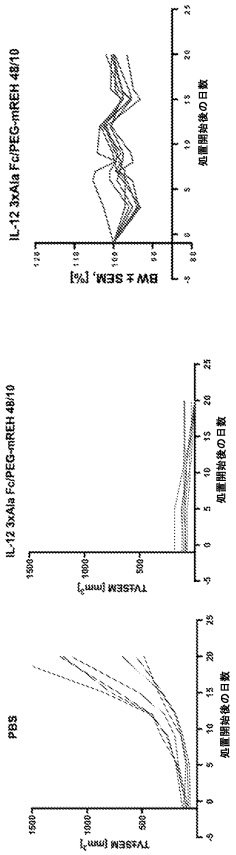
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【手続補正書】
【提出日】令和６年６月２４日(２０２４.６.２４)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
２０２４５３９１３９０００００１.ｘｍｌ

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078465

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C07K 14/54; A61K 38/20; A61P 35/00; C12N 15/62; C12N 15/79 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. - C07K 14/5434; A61K 38/208; A61P 35/00; C12N 15/62; C12N 15/79 (2023.05)

ADD. - C07K 2319/30 (2023.05)

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 database consulted during the international search (name of database 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.
A	US 2020/0362005 A1 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 19 November 2020 (19.11.2020) entire document	1, 2, 13, 14, 33-35, 46-53
A	WO 2020/086758 A1 (DRAGONFLY THERAPEUTICS INC.) 30 April 2020 (30.04.2020) entire document	1, 2, 13, 14, 33-35, 46-53
A	WO 2020/072821 A2 (XENCOR INC.) 09 April 2020 (09.04.2020) entire document	1, 2, 13, 14, 33-35, 46-53
A	WO 2021/067863 A2 (XENCOR INC.) 08 April 2021 (08.04.2021) entire document	1, 2, 13, 14, 33-35, 46-53

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 May 2023	JUL 11 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078465

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.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078465

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.: 15-17, 27-32, 54-69, 81-88
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:
See extra sheet(s).

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.:
1, 2, 13, 14, 33-35, 46-53

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078465

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-14, 18-26, 33-53, and 70-80 are drawn to IL-12 and IL-23 muteins.

The first invention of Group I+ is restricted to a heterodimeric mutein comprising a first polypeptide of formula hP40M-L1a-UH1-Fc1, and a second polypeptide of formula hP35-L2b-UH2-Fc2, where the heterodimeric mutein is selected to be hIL12Fc, where the first polypeptide is selected to be SEQ ID NO: 80, and the second polypeptide is selected to be SEQ ID NO: 81, and polynucleotides encoding the same. It is believed that claims 1, 2, 13, 14, 33-35, and 46-53, read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs: 80 and 81.

Applicant is invited to elect additional heterodimeric muteins and their respective, corresponding, SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a heterodimeric mutein comprising a first polypeptide of formula hP40M-L1a-UH1-Fc1, and a second polypeptide of formula hP35-L2b-UH2-Fc2, where the heterodimeric mutein is selected to be hIL12Fc, where the first polypeptide is selected to be SEQ ID NO: 83, and the second polypeptide is selected to be SEQ ID NO: 82, and polynucleotides encoding the same. Additional heterodimeric muteins and their respective, corresponding, SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for maximizing the anti-tumor effects of IL-12 and/or IL-23, requiring the selection of alternative heterodimeric muteins where "a heterodimeric hIL12Fc mutein, the heterodimeric hIL12Fc mutein comprising a first polypeptide of the formula #1: hP40M- L1a-UH1-Fc [1] and a second polypeptide of the formula #2: hP35-L2b-UH2-Fc2 [2] wherein: hP35 is a polypeptide having at least 90%, alternatively at least 91%, alternatively at least 92%, alternatively at least 93%, alternatively at least 94%, alternatively at least 95%, alternatively at least 96%, alternatively at least 97%, alternatively at least 98%, or alternatively at least 99% sequence identity to SEQ ID NO: 2; hP40M is a human P40 mutein comprising one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of positions W37, P39, D40, A41, K80, E81, F82, K106, E108, DI 15, H216, K217, L218, and K219 numbered in accordance with wild-type pre-human P40 (SEQ ID NO:3); L1 and L2 are GSA linkers and a and b are independently selected from 0 (absent) or 1 (present); UH1 and UH2 are each an upper hinge domain of human immunoglobulin independently selected from the group consisting of the IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 upper hinge, optionally comprising the amino acid substitution C220S (EU numbering); Fc1 is a polypeptide comprising the lower hinge, CH2 and CH3 domains of a human immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, comprising one or more amino acid substitutions promote heterodimerization with Fc2, and FC2 is a polypeptide comprising the lower hinge, CH2 and CH3 domains of a human immunoglobulin selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, comprising one or more amino acid substitutions promote heterodimerization with Fc1, and wherein the polypeptide of formula 1 and the polypeptide of formula 2 are linked by at least one interchain disulfide bond."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a heterodimeric hIL12Fc mutein, the heterodimeric hIL12Fc mutein comprising a first polypeptide of the formula #1: hP40M-L1a-UH1-Fc1 and a second polypeptide of the formula #2: hP35-L2b-UH2-Fc2, and wherein the polypeptide of formula 1 and the polypeptide of formula 2 are linked by at least one interchain disulfide bond. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2020/086758 to Dragonfly Therapeutics Inc. discloses a heterodimeric hIL12Fc mutein (the present invention provides a heterodimeric Fc-fused protein comprising a first Fc domain polypeptide and ... the multisubunit protein is IL-12 (e.g., human IL-12), such that in a heterodimeric Fc-fused protein the p35 and p40 subunits of IL-12 are bound to each other and linked to one or more end (s), Para. [0019]), the heterodimeric hIL12Fc mutein comprising a first polypeptide of the formula #1: hP40M-L1a-UH1-Fc1 (the present invention provides a heterodimeric Fc-fused protein comprising a first Fc domain polypeptide and ...the multisubunit protein is IL-12 (e.g., human IL-12), such that in a heterodimeric Fc-fused protein the p35 and p40 subunits of IL-12 are bound to each other and linked to one or more end(s), Para. [0019]; the present invention provides a heterodimeric Fc-fused protein comprising a p40 subunit of human IL-12 connected to a first human IgGl (hIgGl), Para. [0034]), and a second polypeptide of the formula #2: hP35-L2b-UH2-Fc2, wherein the polypeptide of formula 1 and the polypeptide of formula 2 are linked by at least one interchain disulfide bond (heterodimeric Fc-fused protein according to the invention includes a native heterodimer disulfide bond between p35 and p40 subunits of IL-12. Such a protein includes the native disulfide bond between C74 of p35 and C177 of p40, Para. [0050]); a nucleic acid sequence encoding a polypeptide (a nucleic acid encoding a polypeptide, Para. [0018]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｋ	*38/19*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/19		
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｐ	*15/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/00		
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ	*11/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/02		
Ａ６１Ｐ	*11/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/04		
Ａ６１Ｐ	*1/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/02		
Ａ６１Ｐ	*1/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/18		
Ａ６１Ｐ	*37/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｋ	*35/12*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｃ１２Ｐ	*21/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｗ	
			Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｋ	

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,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(74)代理人　100221741
弁理士　酒井 直子
(74)代理人　100114926
弁理士　枝松 義恵
(72)発明者　ロッカム ディープティ
アメリカ合衆国 ９４０２５ カリフォルニア州 メンロ パーク オブライエン ドライブ １５０５ スイート ディー シンセカイン インコーポレイテッド内
(72)発明者　ルパーダス パトリック ジェイ.
アメリカ合衆国 ９４０２５ カリフォルニア州 メンロ パーク オブライエン ドライブ １５０５ スイート ディー シンセカイン インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4B064　AG03 CA19 CC24 CE06 CE12 DA01

Fターム（参考） 4B065 AA90X AB01
4C084 AA02 AA07 AA13 AA19 BA01 BA08 BA22 BA41 CA53 DA01
DA12 MA02 NA05 NA14 ZA341 ZA591 ZA662 ZA671 ZA811 ZA891 ZB022
ZB072 ZB081 ZB092 ZB111 ZB211 ZB261 ZB271
4C085 AA13 AA34 BB36 BB42 DD62 EE01 EE03
4C087 AA01 AA03 BB65 CA04 MA02 NA14 ZA34 ZA59 ZA66 ZA67
ZA81 ZA89 ZB08 ZB11 ZB21 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA30 BA09 DA02 EA20 FA74 GA10 GA26