

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-516045

(P2021-516045A)

(43) 公表日 令和3年7月1日(2021.7.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/24 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 7
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 143 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-545148 (P2020-545148)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月26日 (2019.2.26)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月27日 (2020.10.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2019/051539
 (87) 国際公開番号 W02019/166946
 (87) 国際公開日 令和1年9月6日 (2019.9.6)
 (31) 優先権主張番号 62/636, 362
 (32) 優先日 平成30年2月28日 (2018.2.28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/636, 371
 (32) 優先日 平成30年2月28日 (2018.2.28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 593141953
 ファイザー・インク
 アメリカ合衆国10017ニューヨーク州
 ニューヨーク市イースト・フォーティーセ
 カンド・ストリート235
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74) 代理人 100120112
 弁理士 中西 基晴
 (74) 代理人 100107386
 弁理士 泉谷 玲子

最終頁に続く

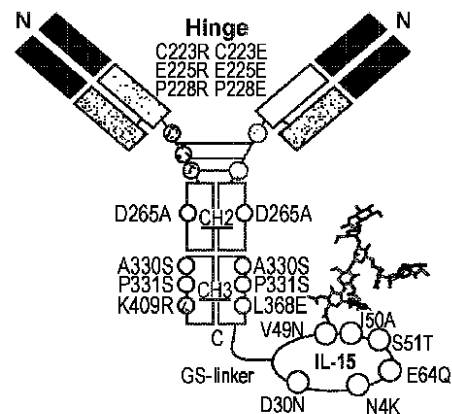
(54) 【発明の名称】 IL-15バリエントおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は、治療的および診断的用途を有するヒトインターロイキン15 (IL-15) バリエント、ならびにそれを作製する方法に関する。本発明はまた、ヒトIL-15バリエントを含む融合タンパク質を提供する。哺乳動物における免疫応答を刺激または抑制する方法、およびIL-15バリエントまたはこのようなIL-15バリエントの融合タンパク質を使用して障害（例えば、がん）を処置する方法もまた提供される。

【選択図】 図1A

Figure 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の a) V 4 9 および I 5 1 位または b) V 4 9、I 5 0、および S 5 1 位においてアミノ酸置換を含み、配列番号 1 の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 5 3、G 5 5、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、L 9 1、M 1 0 9、および／または I 1 1 1 位において 1 つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、単離されたヒトインターロイキン 1 5 (I L-1 5) バリエーションであって、I L-1 5 バリエーションが、野生型ヒト I L-1 5 ポリペプチドまたは野生型 I L-1 5 受容体アルファ-I L-1 5 融合ポリペプチドと比較して、ヒト I L-1 5 受容体アルファ (I L-1 5 R α) およびヒト I L-2 受容体ベータ／ガンマ (I L-2 R β γ) への結合が減少しているかまたはそれらと結合せず、V 4 9 位におけるアミノ酸置換がグリコシル化されている、単離されたヒトインターロイキン 1 5 (I L-1 5) バリエーション。

10

【請求項 2】

I L-1 5 バリエーションが、

- a) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、および E 6 4；
- b) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、E 6 4、および I 6 8；
- c) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、E 6 4、M 1 0 9；
- d) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9；
- e) V 4 9、I 5 0、S 5 1、D 3 0、E 6 4、および I 6 8；
- f) V 4 9、I 5 0、S 5 1、D 3 0、E 6 4、M 1 0 9；
- g) V 4 9、I 5 0、S 5 1、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9；
- h) N 1、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- i) N 4、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- j) S 7、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- k) K 1 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- l) K 1 1、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- m) S 2 9、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- n) V 3 1、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- o) H 3 2、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- p) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4；
- q) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 6 8；
- r) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および L 6 9；
- s) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 1 1 1；
- t) N 4、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4；
- u) N 1、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- v) N 4、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- w) S 7、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- x) K 1 0、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- y) K 1 1、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- z) S 2 9、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- a a) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4；
- b b) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 6 8；
- c c) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および L 6 9；ならびに
- d d) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 1 1 1

20

30

40

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の単離された I L-1 5 バリエーション。

【請求項 3】

アミノ酸置換が、

- a) V 4 9 N、V 4 9 K、V 4 9 E、V 4 9 H、V 4 9 Q もしくは V 4 9 R；
- b) I 5 0 A もしくは I 5 0 G；

50

- c) S 5 1 T ;
 - d) N 1 K、N 1 G、N 1 Q、N 1 R、N 1 E、N 1 A、もしくはN 1 D ;
 - e) N 4 K、N 4 G、N 4 A、N 4 S、N 4 D、N 4 E、N 4 I、N 4 L、N 4 R、N 4 T、N 4 W、もしくはN 4 Q ;
 - f) S 7 E、S 7 G、S 7 D、S 7 K、S 7 N、S 7 R、S 7 H、もしくはS 7 T ;
 - g) K 1 0 A、K 1 0 S、K 1 0 E、K 1 0 L、K 1 0 M、K 1 0 D、もしくはK 1 0 G ;
 - h) K 1 1 D、K 1 1 S、もしくはK 1 1 W ;
 - i) D 3 0 N ;
 - j) E 6 4 Q、E 6 4 K、E 6 4 A、E 6 4 S、E 6 4 N、E 6 4 H、E 6 4 T、もしくはE 6 4 R ;
 - k) E 5 3 N ;
 - l) G 5 5 SもしくはG 5 5 T ;
 - m) E 8 9 N ;
 - n) L 9 1 SもしくはL 9 1 T ;
 - o) Y 2 6 K、Y 2 6 R、もしくはY 2 6 H ;
 - p) S 2 9 N ;
 - q) V 3 1 S、V 3 1 D、もしくはV 3 1 K ;
 - r) H 3 2 G ;
 - s) I 6 8 S、I 6 8 A、I 6 8 R、I 6 8 T、I 6 8 K、I 6 8 N、I 6 8 M、I 6 8 F、I 6 8 Y、I 6 8 E、もしくはI 6 8 H ;
 - t) L 6 9 A、L 6 9 S、L 6 9 D、L 6 9 T、L 6 9 M、L 6 9 G、L 6 9 Q、L 6 9 I、L 6 9 E、もしくはL 6 9 V ;
 - u) M 1 0 9 A、M 1 0 9 S、M 1 0 9 D、もしくはM 1 0 9 K ; および／または
 - v) I 1 1 1 A、I 1 1 1 K、I 1 1 1 S、もしくはI 1 1 1 D
- において1つまたは複数の特定の置換を含む、請求項1から2のいずれか一項に記載の単離されたI L-15バリエント。

【請求項4】

I L-15バリエントが、

- a) N 4 K、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、およびE 6 4 Q ;
- b) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、およびS 5 1 T ;
- c) D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、およびE 6 4 Q ;
- d) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、およびE 6 4 Q ;
- e) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、およびS 5 1 T ;
- f) V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、およびE 6 4 Q ; ならびに
- g) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、およびE 6 4 Q

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の単離されたI L-15バリエント。

【請求項5】

配列番号1のE 4 6およびV 4 9位におけるアミノ酸置換、ならびに配列番号1のN 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、D 2 2、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 5 3、G 5 5、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、E 9 3、M 1 0 9および／またはI 1 1 1位における少なくとも1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、単離されたヒトインターロイキン15 (I L-15) バリエントであって、I L-15バリエントが、ヒトI L-15受容体アルファ (I L-15 R α) と結合せず、野生型ヒトI L-15ポリペプチドまたは野生型I L-15受容体アルファ-I L-15融合ポリペプチドと比較して、ヒトI L-2受容体ベータ／ガンマ (I L-2 R β γ) への結合が減少している、単離されたヒトインターロイキン15 (I L-15) バリエント。

【請求項6】

I L-15バリエントが、

- a) N 1、E 4 6、および V 4 9；
- b) N 4、E 4 6、および V 4 9；
- c) S 7、E 4 6、および V 4 9；
- d) K 1 0、E 4 6、および V 4 9；
- e) K 1 1、E 4 6、および V 4 9；
- f) S 2 9、E 4 6、および V 4 9；
- g) V 3 1、E 4 6、および V 4 9；
- h) H 3 2、E 4 6、および V 4 9；
- i) E 4 6、V 4 9、および E 6 4；
- j) E 4 6、V 4 9、および I 6 8；
- k) E 4 6、V 4 9、および L 6 9；
- l) E 4 6、V 4 9、および I 1 1 1；
- m) N 4、E 4 6、V 4 9、および E 6 4；
- n) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、および E 6 4；
- o) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、E 6 4、および I 6 8；
- p) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、E 6 4、および M 1 0 9；
- q) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9；
- r) N 1、D 3 0、E 4 6、および V 4 9；
- s) N 4、D 3 0、E 4 6、および V 4 9；
- t) S 7、D 3 0、E 4 6、および V 4 9；
- u) K 1 0、D 3 0、E 4 6、および V 4 9；
- v) K 1 1、D 3 0、E 4 6、および V 4 9；
- w) S 2 9、D 3 0、E 4 6、および V 4 9；
- x) D 3 0、E 4 6、V 4 9、および E 6 4；
- y) D 3 0、E 4 6、V 4 9 R、および I 6 8；
- z) D 3 0、E 4 6、V 4 9 R、および L 6 9；
- a a) D 3 0、E 4 6、V 4 9 R、および I 1 1 1；
- b b) N 1、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9；
- c c) N 4、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9；
- d d) S 7、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9；
- e e) K 1 0、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9；
- f f) K 1 1、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9；
- g g) D 3 0、E 4 6、V 4 9、E 6 4、および M 1 0 9；
- h h) D 3 0、E 4 6、V 4 9、I 6 8、および M 1 0 9；
- i i) D 3 0、E 4 6、V 4 9、L 6 9、および M 1 0 9；
- j j) D 3 0、E 4 6、V 4 9、M 1 0 9、および I 1 1 1；
- k k) D 3 0、E 4 6、V 4 9、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9；
- l l) E 4 6、V 4 9、D 3 0、E 6 4、および I 6 8；
- mm) E 4 6、V 4 9、E 6 4、および M 1 0 9；
- nn) E 4 6、V 4 9、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9；
- oo) D 2 2、Y 2 6、V 4 9、E 4 6、E 5 3、E 8 9、および E 9 3；ならびに
- pp) N 1、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および E 6 4

10

20

30

40

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 5 に記載の単離された I L-15 バリエント。

【請求項 7】

アミノ酸置換が、

- a) N 1 Q、N 1 K、N 1 R、N 1 E、N 1 A、N 1 D、もしくは N 1 G；
- b) N 4 K、N 4 G、N 4 A、N 4 S、N 4 D、N 4 E、N 4 R、N 4 T、N 4 I、N 4 L、N 4 W、もしくは N 4 Q；
- c) S 7 E、S 7 G、S 7 D、S 7 K、S 7 N、S 7 R、S 7 H、もしくは S 7 T；

50

d) K 1 0 D、K 1 0 A、K 1 0 S、K 1 0 E、K 1 0 L、K 1 0 M、K 1 0 D、もしくはK 1 0 G；

e) K 1 1 D、K 1 1 S、もしくはK 1 1 W；

f) D 2 2 N；

g) Y 2 6 K、Y 2 6 R、もしくはY 2 6 H；

h) S 2 9 N；

i) D 3 0 N；

j) V 3 1 S、V 3 1 D、もしくはV 3 1 K；

k) H 3 2 G；

l) E 4 6 GもしくはE 4 6 Q；

10

m) V 4 9 N、V 4 9 K、もしくはV 4 9 R、V 4 9 E、V 4 9 H、もしくはV 4 9 Q；

n) E 5 3 Q；

o) G 5 5 SもしくはG 5 5 T

p) E 6 4 Q、E 6 4 K、E 6 4 A、E 6 4 S、E 6 4 N、E 6 4 H、E 6 4 T、もしくはE 6 4 R；

q) I 6 8 S、I 6 8 A、I 6 8 R、I 6 8 T、I 6 8 K、I 6 8 N、I 6 8 M、I 6 8 F、I 6 8 Y、I 6 8 E、もしくはI 6 8 H；

r) L 6 9 S、L 6 9 A、L 6 9 D、L 6 9 T、L 6 9 M、L 6 9 G、L 6 9 Q、L 6 9 I、L 6 9 E、もしくはL 6 9 V；

20

s) E 8 9 Q；

t) E 9 3 Q；

u) M 1 0 9 A、M 1 0 9 S、M 1 0 9 D、もしくはM 1 0 9 K；および／または

v) I 1 1 1 A、I 1 1 1 K、I 1 1 1 S、もしくはI 1 1 1 D

において1つまたは複数の特定の置換を含む、請求項5または6に記載の単離されたI L－1 5バリエント。

【請求項8】

I L－1 5バリエントが、

a) N 1 K、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

b) N 4 K、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

30

c) N 4 Q、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

d) S 7 T、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

e) V 3 1 S、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

f) V 3 1 K、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

g) E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q；

h) E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 K；

i) N 4 Q、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q；

j) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

k) N 1 K、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

l) N 1 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

40

m) N 4 G、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

n) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

o) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

p) S 7 E、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

q) S 7 G、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

r) S 7 T、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

s) K 1 0 D、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R；

t) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 A；

u) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q；

v) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 K；

50

- w) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S ;
- x) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 K ;
- y) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K ;
- z) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K ;
- a a) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q ;
- b b) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q ;
- c c) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S ;
- d d) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、E 6 4 Q、および I 6 8 S ;
- e e) N 1 A、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R ; ならびに
- f f) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q

10

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 5 から 7 のいずれか一項に記載の単離された I L - 1 5 バリエーション。

【請求項 9】

1) F c ドメインを含む抗体；ならびに b) 配列番号 1 の a) V 4 9 および I 5 1 位または b) V 4 9、I 5 0、および S 5 1 位においてアミノ酸置換を含むヒトインターロイキン 1 5 (I L - 1 5) バリエーションを含む単離された融合タンパク質であって、配列番号 1 の V 4 9 位におけるアミノ酸置換がグリコシル化されており、配列番号 1 の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 5 3、G 5 5、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、L 9 1、M 1 0 9、および／または I 1 1 1 位において 1 つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含み、I L - 1 5 バリエーションが抗体の F c ドメインと共有結合し、F c ドメインが野生型 F c と比較して、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性を有さない、単離された融合タンパク質。

20

【請求項 1 0】

I L - 1 5 バリエーションが、

- a) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、および E 6 4 ;
- b) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、E 6 4、および I 6 8 ;
- c) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、E 6 4、M 1 0 9 ;
- d) V 4 9、I 5 0、S 5 1、N 4、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9 ;
- e) V 4 9、I 5 0、S 5 1、D 3 0、E 6 4、および I 6 8 ;
- f) V 4 9、I 5 0、S 5 1、D 3 0、E 6 4、M 1 0 9 ;
- g) V 4 9、I 5 0、S 5 1、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9 ;
- h) N 1、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- i) N 4、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- j) S 7、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- k) K 1 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- l) K 1 1、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- m) S 2 9、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- n) V 3 1、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- o) H 3 2、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- p) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4 ;
- q) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 6 8 ;
- r) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および L 6 9 ;
- s) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 1 1 1 ;
- t) N 4、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4 ;
- u) N 1、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- v) N 4、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- w) S 7、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- x) K 1 0、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;
- y) K 1 1、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1 ;

30

40

50

- z) S 2 9、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；
- aa) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4；
- bb) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 6 8；
- cc) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および L 6 9；ならびに
- dd) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 1 1 1

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 1】

アミノ酸置換が、

- a) V 4 9 N、V 4 9 K、もしくは V 4 9 R；
- b) I 5 0 A もしくは I 5 0 G；
- c) S 5 1 T；
- d) N 1 K、N 1 G、N 1 Q、N 1 R、N 1 E、N 1 A、もしくは N 1 D；
- e) N 4 K、N 4 G、N 4 A、N 4 S、N 4 D、N 4 E、N 4 L、N 4 R、N 4 T、もしくは N 4 Q；
- f) S 7 E、S 7 G、S 7 D、S 7 K、S 7 N、S 7 R、S 7 H、もしくは S 7 T；
- g) K 1 0 A、K 1 0 S、K 1 0 E、K 1 0 L、K 1 0 M、K 1 0 D、もしくは K 1 0 G；
- h) K 1 1 D、K 1 1 S、もしくは K 1 1 W；
- i) D 3 0 N；
- j) E 6 4 Q、E 6 4 K、E 6 4 A、E 6 4 S、E 6 4 N、E 6 4 H、E 6 4 T、もしくは E 6 4 R；
- k) E 5 3 N；
- l) G 5 5 S もしくは G 5 5 T；
- m) E 8 9 N；
- n) L 9 1 S もしくは L 9 1 T；
- o) Y 2 6 K、Y 2 6 R、もしくは Y 2 6 H；
- p) S 2 9 N；
- q) V 3 1 S、V 3 1 D、もしくは V 3 1 K；
- r) H 3 2 G；
- s) I 6 8 S、I 6 8 A、I 6 8 R、I 6 8 T、I 6 8 K、I 6 8 N、I 6 8 M、I 6 8 F、I 6 8 Y、I 6 8 E、もしくは I 6 8 H；
- t) L 6 9 S、L 6 9 A、L 6 9 D、L 6 9 T、L 6 9 M、L 6 9 G、L 6 9 Q、L 6 9 I、L 6 9 E、もしくは L 6 9 V；
- u) M 1 0 9 A、M 1 0 9 S、M 1 0 9 D、もしくは M 1 0 9 K；および／または
- v) I 1 1 1 A、I 1 1 1 K、I 1 1 1 S、もしくは I 1 1 1 D

において 1 つまたは複数の特定の置換を含む、請求項 9 または 1 0 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 2】

I L－1 5 バリエントが、

- a) N 4 K、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；
- b) Y 2 6 K、V 4 9 R、N 4 K、D 3 0 N、および E 6 4 Q；
- c) Y 2 6 K、V 4 9 K、N 4 K、D 3 0 N、および E 6 4 Q；
- d) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、および S 5 1 T；
- e) D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；
- f) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；
- g) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、および S 5 1 T；
- h) V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；ならびに
- i) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 9 から 1 1 のいずれ

か一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

1) Fcドメインを含む抗体；ならびにb) 配列番号1のE46およびV49位におけるアミノ酸置換、ならびに配列番号1のN1、N4、S7、K10、K11、D22、Y26、S29、D30、V31、H32、E53、G55、E64、I68、L69、E89、E93、M109および／またはI111位における少なくとも1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトインターロイキン15 (IL-15) バリエントを含む単離された融合タンパク質であって、IL-15 バリエントが抗体のFcドメインと共有結合し、Fcドメインが野生型Fcと比較して、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性を有さない、単離された融合タンパク質。

10

【請求項 14】

IL-15 バリエントが、

- a) N1、E46、およびV49；
- b) N4、E46、およびV49；
- c) S7、E46、およびV49；
- d) K10、E46、およびV49；
- e) K11、E46、およびV49；
- f) S29、E46、およびV49；
- g) V31、E46、およびV49；
- h) H32、E46、およびV49；
- i) E46、V49、およびE64；
- j) E46、V49、およびI68；
- k) E46、V49、およびL69；
- l) E46、V49、およびI111；
- m) N4、E46、V49、およびE64；
- n) E46、V49、N4、D30、およびE64；
- o) E46、V49、N4、D30、E64、およびI68；
- p) E46、V49、N4、D30、E64、およびM109；
- q) E46、V49、N4、D30、E64、I68、およびM109；
- r) N1、D30、E46、およびV49；
- s) N4、D30、E46、およびV49；
- t) S7、D30、E46、およびV49；
- u) K10、D30、E46、およびV49；
- v) K11、D30、E46、およびV49；
- w) S29、D30、E46、およびV49；
- x) D30、E46、V49、およびE64；
- y) D30、E46、V49R、およびI68；
- z) D30、E46、V49R、およびL69；
- aa) D30、E46、V49R、およびI111；
- bb) N1、D30、E46、V49、およびM109；
- cc) N4、D30、E46、V49、およびM109；
- dd) S7、D30、E46、V49、およびM109；
- ee) K10、D30、E46、V49、およびM109；
- ff) K11、D30、E46、V49、およびM109；
- gg) D30、E46、V49、E64、およびM109；
- hh) D30、E46、V49、I68、およびM109；
- ii) D30、E46、V49、L69、およびM109；
- jj) D30、E46、V49、M109、およびI111；
- kk) D30、E46、V49、E64、I68、およびM109；

20

30

40

50

- l l) E 4 6、V 4 9、D 3 0、E 6 4、および I 6 8 ;
 mm) E 4 6、V 4 9、E 6 4、および M 1 0 9 ;
 nn) E 4 6、V 4 9、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9 ;
 oo) D 2 2、Y 2 6、V 4 9、E 4 6、E 5 3、E 8 9、および E 9 3 ; ならびに
 pp) N 1、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および E 6 4

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 1 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 5】

I L - 1 5 バリエントが、

- a) N 1 Q、N 1 K、N 1 R、N 1 E、N 1 A、N 1 D、または N 1 G ; 10
 b) N 4 K、N 4 G、N 4 A、N 4 S、N 4 D、N 4 E、N 4 L、N 4 R、N 4 T、または N 4 Q ;
 c) S 7 E、S 7 G、S 7 D、S 7 K、S 7 N、S 7 R、S 7 H、または S 7 T ;
 d) K 1 0 D、K 1 0 A、K 1 0 S、K 1 0 E、K 1 0 L、K 1 0 M、K 1 0 D、K 1 0 G ;
 e) K 1 1 D、K 1 1 S、または K 1 1 W ;
 f) D 2 2 N ;
 g) Y 2 6 K、Y 2 6 R、または Y 2 6 H ;
 h) S 2 9 N ;
 i) D 3 0 N ; 20
 j) V 3 1 S、V 3 1 D、または V 3 1 K
 k) H 3 2 G ;
 l) E 4 6 G または E 4 6 Q ;
 m) V 4 9 N、V 4 9 K、または V 4 9 R、V 4 9 E、V 4 9 H、または V 4 9 Q ;
 n) E 5 3 Q ;
 o) G 5 5 S または G 5 5 T ;
 p) E 6 4 Q、E 6 4 K、E 6 4 A、E 6 4 S、E 6 4 N、E 6 4 H、E 6 4 T、または E 6 4 R ;
 q) I 6 8 S、I 6 8 A、I 6 8 R、I 6 8 T、I 6 8 K、I 6 8 N、I 6 8 M、I 6 8 F、I 6 8 Y、I 6 8 E または I 6 8 H ; 30
 r) L 6 9 S、L 6 9 A、L 6 9 D、L 6 9 T、L 6 9 M、L 6 9 G、L 6 9 Q、L 6 9 I、L 6 9 E、または L 6 9 V ;
 s) E 8 9 Q ;
 t) E 9 3 Q ;
 u) M 1 0 9 A、M 1 0 9 S、M 1 0 9 D、または M 1 0 9 K ; および
 v) I 1 1 1 A、I 1 1 1 K、I 1 1 1 S、または I 1 1 1 D

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 6】

I L - 1 5 バリエントが、 40

- a) N 1 K、E 4 6 G、および V 4 9 R ;
 b) N 4 K、E 4 6 G、および V 4 9 R ;
 c) N 4 Q、E 4 6 G、および V 4 9 R ;
 d) S 7 T、E 4 6 G、および V 4 9 R ;
 e) V 3 1 S、E 4 6 G、および V 4 9 R ;
 f) V 3 1 K、E 4 6 G、および V 4 9 R ;
 g) E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q ;
 h) E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K ;
 i) N 4 Q、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q ;
 j) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R ; 50

- k) N 1 K、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- l) N 1 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- m) N 4 G、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- n) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- o) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- p) S 7 E、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- q) S 7 G、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- r) S 7 T、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- s) K 1 0 D、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；
- t) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 A；
- u) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；
- v) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；
- w) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S；
- x) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 K；
- y) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；
- z) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；
- a a) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；
- b b) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；
- c c) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S；
- d d) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、E 6 4 Q、および I 6 8 S；
- e e) N 1 A、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；ならびに
- f f) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q

10

20

からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、請求項 1 3 から 1 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 7】

配列番号 8 6、8 7、8 9、または 9 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 から 1 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 8】

抗体が、I g G₁、I g G₂、I g G_{2 Δ a}、I g G₄、I g G_{4 Δ b}、I g G_{4 Δ c}、I g G_{4 S 2 2 8 P}、I g G_{4 Δ b S 2 2 8 P}、および I g G_{4 Δ c S 2 2 8 P} からなる群から選択されるアイソタイプを有する、請求項 9 から 1 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 1 9】

a) 抗体が I g G 2 であり、抗体可変ドメインが、ヒンジ領域における 2 2 3、2 2 5、および／もしくは 2 2 8 位において、ならびにヒト I g G 2 (配列番号 3) の C H 3 領域における 4 0 9 および／もしくは 3 6 8 位 (E U 番号付けスキーム) においてアミノ酸修飾を含み；b) 抗体が I g G 1 であり、抗体可変ドメインが、ヒンジ領域における 2 2 1 および／もしくは 2 2 8 位において、ならびにヒト I g G 1 (配列番号 2) の C H 3 領域における 4 0 9 および／もしくは 3 6 8 位 (E U 番号付けスキーム) においてアミノ酸修飾を含み；または c) 抗体が I g G 1 であり、抗体可変ドメインが、ヒト I g G 1 (配列番号 2) の C H 3 領域における 3 4 9、3 5 4、3 6 6、3 6 8、および／もしくは 4 0 7 位 (E U 番号付けスキーム) においてアミノ酸修飾を含む、請求項 1 8 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 2 0】

抗体が、a) ヒト I g G 2 (配列番号 3) の 1 つもしくは複数の 2 6 5、3 3 0、および／もしくは 3 3 1 位；または b) ヒト I g G 1 (配列番号 2) の 1 つもしくは複数の 2 3 4、2 3 5、および／もしくは 2 3 7 位においてアミノ酸修飾をさらに含む、請求項 1 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 1】

抗体が、抗 C T L A - 4 抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 8 抗体、抗 4 - 1

50

B B抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗ITGIT抗体、抗OX40抗体、抗IL-8抗体、抗IL-7Rアルファ（CD127）抗体、抗IL15抗体、抗HVEM抗体、抗BTLA抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗CD47抗体、抗CSF1R抗体、抗CSF1抗体、抗MARCO抗体、抗CXCR4抗体、抗VEGFR1抗体、抗VEGFR2抗体、抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD3二重特異性抗体、抗CD19抗体、抗CD20、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗ICOS抗体、抗CD22抗体、抗CD52抗体、抗CCR4抗体、抗CCR8抗体、抗CD200R抗体、抗VISG4抗体、抗CCR2抗体、抗ILLRb2抗体、抗CXCR4抗体、抗CD206抗体、抗CD163抗体、抗KLRG1抗体、抗FLT3抗体、抗B7-H4抗体、抗B7-H3抗体、KLRG1抗体、および抗GITR抗体からなる群から選択される、請求項9から20のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項22】

抗体が、配列番号14、15、80、81、91、もしくは92のアミノ酸配列を含むVH相補性決定領域1（CDR1）、配列番号16、17、82、もしくは83のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および配列番号18もしくは62に示されるアミノ酸配列を含むVH CDR3を含む重鎖可変（VH）領域、ならびに／または配列番号19もしくは31に示されるアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号20もしくは32に示されるアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号21もしくは33に示されるアミノ酸配列を含むVL CDR3を含むPD-1抗体である、請求項21に記載の融合タンパク質。

20

【請求項23】

抗体が、配列番号12、34、78、もしくは36のアミノ酸配列を有するVHのCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVH領域、ならびに／または配列番号13、35、79、もしくは37のアミノ酸配列を有するVLのCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVL領域を含むPD-1抗体である、請求項21に記載の融合タンパク質。

【請求項24】

IL-15バリエントが、ポリペプチドリンカーおよび／またはポリペプチドタグによって抗体と共有結合している、請求項9から23のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項25】

請求項1から8のいずれか一項に記載のIL-15バリエントまたは請求項9から24のいずれか一項に記載のIL-15融合タンパク質を産生する単離された細胞株。

【請求項26】

請求項1から8のいずれか一項に記載のIL-15バリエントまたは請求項9から24のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項27】

請求項26に記載の核酸を含む組換え発現ベクター。

【請求項28】

請求項26に記載の単離された核酸または請求項27に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

40

【請求項29】

請求項1から8のいずれか一項に記載のIL-15バリエントまたは請求項9から24のいずれか一項に記載の融合タンパク質、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項30】

請求項29に記載の医薬組成物を含む、がんを処置するためのキット。

【請求項31】

がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、がんに関連する1つまたは複数の症状が対象において改善されるように、有効量の請求項1から8のいずれ

50

か一項に記載の I L - 1 5 バリエーション、請求項 9 から 2 4 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、または請求項 2 9 に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 3 2】

がんが固形がんまたは液体がんである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

固形がんが、胃がん (g a s t r i c c a n c e r)、小腸がん、肉腫、頭頸部がん、胸腺がん、上皮がん、唾液腺がん、肝がん、胆管がん、神経内分泌腫瘍、胃がん (s t o m a c h c a n c e r)、甲状腺がん、肺がん、中皮腫、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、膵がん、神経膠腫、腎がん、膀胱がん、子宮頸がん、子宮がん、外陰がん、陰茎がん、精巣がん、肛門がん、絨毛癌、大腸がん、口腔がん、皮膚がん、メルケル細胞癌、膠芽腫、脳腫瘍、骨がん、眼がん、および黒色腫からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

液体がんが、多発性骨髄腫、悪性形質細胞腫、ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、カーラー病および骨髄腫症、形質細胞白血病、形質細胞腫、B 細胞前リンパ球性白血病、ヘアリー細胞白血病、B 細胞非ホジキンリンパ腫 (N H L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、急性リンパ球性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫 (B u r k i t t ' s l y m p h o m a)、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、大細胞リンパ腫、前駆 B リンパ芽球性リンパ腫、骨髄性白血病、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症 (W a l d e n s t r o m ' s m a c r o g l o b u l i n e m i a)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、小細胞リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫 (B u r k i t t l y m p h o m a)、縦隔 (胸腺) 原発大細胞型 B 細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症 (W a l d e n s t r o m m a c r o g l o b u l i n e m i a)、節性辺縁帯 B 細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、T 細胞／組織球豊富型大細胞型 B 細胞リンパ腫、中枢神経系原発リンパ腫、原発性皮膚びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (脚型)、高齢者の E B V 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、炎症を伴うびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫、A L K 陽性大細胞型 B 細胞リンパ腫、形質芽球性リンパ腫、H H V 8 関連多中心性キャッスルマン病で発生する大細胞型 B 細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫とバーキットリンパ腫との間の中間的な特徴を有する分類されない B 細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫と古典的ホジキンリンパ腫との間の中間的な特徴を有する分類されない B 細胞リンパ腫、および他の造血細胞関連がんからなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。

20

30

【請求項 3 5】

がんが、再発性、難治性、または転移性である、請求項 2 9 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

有効量の第 2 の治療剤を投与するステップをさらに含む、ここにおいて、任意選択で、前記投与は、別々、連続、または同時である、ステップをさらに含む、請求項 2 9 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 7】

第 2 の治療剤が、抗 C T L A - 4 抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 8 抗体、抗 4 - 1 B B 抗体、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、抗 T I M 3 抗体、抗 L A G 3 抗体、抗 T I G I T 抗体、抗 O X 4 0 抗体、抗 I L - 7 R アルファ (C D 1 2 7) 抗体、抗 I L - 8 抗体、抗 I L - 1 5 抗体、抗 H V E M 抗体、抗 B T L A 抗体、抗 C D 4 0 抗体、抗 C D 4 0 L 抗体、抗 C D 4 7 抗体、抗 C S F 1 R 抗体、抗 C S F 1 抗体、抗 I L - 7 R 抗体、抗 M A R C O 抗体、抗 C X C R 4 抗体、抗 V E G F 抗体、抗 V E G F R 1 抗体、抗

50

VEGFR2抗体、抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD3二重特異性抗体、抗CD19抗体、抗CD20、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗ICOS抗体、抗CD22抗体、抗CD52抗体、抗CCR4抗体、抗CCR8抗体、抗CD200R抗体、抗VIGS4抗体、抗CCR2抗体、抗ILLRb2抗体、抗CXCR4抗体、抗CD206抗体、抗CD163抗体、抗KLRG1抗体、抗FLT3抗体、抗B7-H4抗体、抗B7-H3抗体、KLRG1抗体、BTN1A1抗体、および抗GITR抗体からなる群から選択される抗体である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

第2の治療剤が、サイトカイン、免疫サイトカイン、TNF α 、PAP阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、キナーゼ阻害剤、ALK阻害剤、MEK阻害剤、IDO阻害剤、GLS1阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、CART細胞もしくはT細胞療法、TLRアゴニスト、または腫瘍ワクチンである、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

任意選択で固形がんもしくは液体がんであり、および／または再発性、難治性、もしくは転移性であるがんの処置に使用するための、請求項1から8のいずれか一項に記載のIL-15バリエーション、請求項9から24のいずれか一項に記載の融合タンパク質、または請求項29に記載の医薬組成物。

【請求項40】

使用が第2の治療剤との併用であり、任意選択で併用が、同時、並行してまたは同時に投与するためである、請求項39に記載の使用するための、請求項1から8のいずれか一項に記載のIL-15バリエーション、請求項9から24のいずれか一項に記載の融合タンパク質、または請求項29に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療的および診断的用途を有するインターロイキン15（IL-15）バリエーション、ならびにそれを作製する方法に関する。本発明はまた、このようなIL-15バリエーションを含む融合タンパク質を提供する。哺乳動物における免疫応答を刺激または抑制する方法、およびIL-15バリエーションまたはこのようなIL-15バリエーションの融合タンパク質を使用して障害（例えば、がん）を処置する方法もまた提供される。

【背景技術】

【0002】

サイトカインは免疫応答の強力なモジュレーターであり、免疫腫瘍学的治療アプローチに対する転帰に劇的に影響を及ぼす可能性を保持している。しかしながら、ヒト対象においてサイトカインを利用するこれまでの取り組みでは、わずかな有効性および有意な毒性しか得られていない。最近の研究は、抗体-サイトカイン融合タンパク質などの「標的化サイトカイン」が末梢曝露およびしたがって毒性を最小限にしながら、所望の細胞型にサイトカインを送達し得ることを示唆している。例えば、Guoら、Cytokine Growth Factor Rev. 38:10~21ページ（2017）；Jakobisiak Mら、Cytokine Growth Factor Rev. 22（2）：99~108ページ（2011）；Robinson, T. & Schluns, K. S.、Immunol. Lett. 190:159~168ページ（2017）；Rhodeら、Cancer Immunol. Res. 4（1）：49~60ページ（2016）；Conlonら、J Clin. Oncol. 33（1）：74~82ページ（2015）を参照のこと。したがって、標的化サイトカインに基づく治療剤の開発は、がんなどの種々の疾患の処置において大きな価値がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本明細書に開示されている本発明は、ヒトインターロイキン15（IL-15）バリエーションおよびそれを含む融合タンパク質に関する。本発明のIL-15バリエーションは、野生型ヒトIL-15ポリペプチドまたは野生型IL-15受容体アルファ-IL-15融合ポリペプチドと比較して、IL-15受容体アルファ（CD215）への結合が減少しているかもしくはそれと結合せず、ならびに／またはIL-15と、IL-2受容体ベータ（CD122）および共通ガンマ鎖（CD132）から構成される、そのシグナル伝達受容体との相互作用が低減していることが実証される。本発明の第2の側面では、抗体融合キメラタンパク質として提示される場合、これらの親和性が低減したIL-15バリエーションは、所望の細胞型（抗体標的を発現するそれらの細胞）に選択的に標的化される。IL-15受容体複合体を発現するが、抗体標的を発現しない細胞型は、両方の成分を発現するそれらの細胞と比較して、ほとんど活性化されないか、または活性化されない。したがって、本発明のIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質は、抗腫瘍活性などの生物活性を効果的かつ安全に促進するために細胞サブセットの活性化を選択的にモジュレートする。本発明の第3の側面では、これらの親和性が低減したIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質は、分泌型または膜係留（membrane-tethered）型のいずれかとして、CAR（キメラ抗原受容体）T細胞においてポリヌクレオチドとして発現される場合、活性および増殖を含むCAR T機能を増強するために使用される。

【0004】

したがって、一つの側面では、本発明は、配列番号1のa) V49およびI51位またはb) V49、I50、およびS51位においてアミノ酸置換を含み、配列番号1のN1、N4、S7、K10、K11、Y26、S29、D30、V31、H32、E53、G55、E64、I68、L69、E89、L91、M109、および／またはI111位において1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、単離されたヒトインターロイキン15（IL-15）バリエーションであって、IL-15バリエーションが、野生型ヒトIL-15ポリペプチドまたは野生型IL-15受容体アルファ-IL-15融合ポリペプチドと比較して、ヒトIL-15受容体アルファ（IL-15R α ）およびヒトIL-2受容体ベータ／ガンマ（IL-2R $\beta\gamma$ ）への結合が減少しているかまたはそれらと結合せず、V49位におけるアミノ酸置換がグリコシル化されている、単離されたヒトインターロイキン15（IL-15）バリエーションを提供する。

【0005】

別の側面では、1) Fcドメインを含む抗体；ならびにb) 配列番号1のa) V49およびI51位またはb) V49、I50、およびS51位においてアミノ酸置換を含むヒトインターロイキン15（IL-15）バリエーションを含む単離された融合タンパク質であって、配列番号1のV49位におけるアミノ酸置換がグリコシル化されており、配列番号1のN1、N4、S7、K10、K11、Y26、S29、D30、V31、H32、E53、G55、E64、I68、L69、E89、L91、M109、および／またはI111位において1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、IL-15バリエーションが抗体のFcドメインと共有結合し、Fcドメインが野生型Fcと比較して、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を有さない、単離された融合タンパク質が提供される。

【0006】

一部の態様では、IL-15バリエーションはV49Nにおいてアミノ酸置換を含み、V49Nはグリコシル化されている。一部の態様では、配列番号1のE53および／またはE89におけるアミノ酸置換もまた、グリコシル化されている。

【0007】

一部の態様では、IL-15バリエーションは、a) V49、I50、S51、N4、D30、およびE64；b) V49、I50、S51、N4、D30、E64、およびI68；c) V49、I50、S51、N4、D30、E64、M109；d) V49、I50、S51、N4、D30、E64、I68、およびM109；e) V49、I50、S5

10

20

30

40

50

1、D30、E64、およびI68；f) V49、I50、S51、D30、E64、M109；g) V49、I50、S51、D30、E64、I68、およびM109；h) N1、V49、I50、およびS51；i) N4、V49、I50、およびS51；j) S7、V49、I50、およびS51；k) K10、V49、I50、およびS51；l) K11、V49、I50、およびS51；m) S29、V49、I50、およびS51；n) V31、V49、I50、およびS51；o) H32、V49、I50、およびS51；p) V49、I50、S51、およびE64；q) V49、I50、S51、およびI68；r) V49、I50、S51、およびL69；s) V49、I50、S51、およびI111；t) N4、V49、I50、S51、およびE64；u) N1、D30、V49、I50、およびS51；v) N4、D30、V49、I50、およびS51；w) S7、D30、V49、I50、およびS51；x) K10、D30、V49、I50、およびS51；y) K11、D30、V49、I50、およびS51；z) S29、D30、V49、I50、およびS51；aa) D30、V49、I50、S51、およびE64；bb) D30、V49、I50、S51、およびI68；cc) D30、V49、I50、S51、およびL69；ならびにdd) D30、V49、I50、S51、およびI111からなる群から選択される位置において配列番号1のアミノ酸置換を含む。

【0008】

一部の態様では、IL-15バリエントは、a) V49N、V49K、V49E、V49H、V49QもしくはV49R；b) I50AもしくはI50G；c) S51T；d) N1K、N1G、N1Q、N1R、N1E、N1A、もしくはN1D；e) N4K、N4G、N4A、N4S、N4D、N4E、N4L、N4R、N4T、もしくはN4Q；f) S7E、S7G、S7D、S7K、S7N、S7R、S7H、もしくはS7T；g) K10A、K10S、K10E、K10L、K10M、K10D、もしくはK10G；h) K11D、K11S、もしくはK11W；i) D30N；j) E64Q、E64K、E64A、E64S、E64N、E64H、E64T、もしくはE64R；k) E53N；l) G55SもしくはG55T；m) E89N；n) L91SもしくはL91T；o) Y26K、Y26R、もしくはY26H；p) S29N；q) V31S、V31D、もしくはV31K；r) H32G；s) I68S、I68A、I68R、I68T、I68K、I68N、I68M、I68F、I68Y、I68E、もしくはI68H；t) L69A、L69S、L69D、L69T、L69M、L69G、L69Q、L69I、L69E、もしくはL69V；u) M109A、M109S、M109D、もしくはM109K；および／またはv) I111A、I111K、I111S、もしくはI111Dにおいて1つまたは複数の特定の置換を含むアミノ酸置換を含む。一部の態様では、IL-15バリエントは、a) N4K、D30N、V49N、I50A、S51T、およびE64Q；b) N4Q、D30N、V49N、I50A、およびS51T；c) D30N、V49N、I50A、S51T、およびE64Q；d) N4Q、D30N、V49N、I50A、S51T、およびE64Q；e) N4Q、V49N、I50A、およびS51T；f) V49N、I50A、S51T、およびE64Q；ならびにg) N4Q、V49N、I50A、S51T、およびE64Qからなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む。

【0009】

別の側面では、配列番号1のE46およびV49位におけるアミノ酸置換、ならびに配列番号1のN1、N4、S7、K10、K11、D22、Y26、S29、D30、V31、H32、E53、G55、E64、I68、L69、E89、E93、M109および／またはI111位における少なくとも1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、単離されたヒトインターロイキン15 (IL-15) バリエントであって、IL-15バリエントが、ヒトIL-15受容体アルファ (IL-15R α) と結合せず、野生型ヒトIL-15ポリペプチドまたは野生型IL-15受容体アルファ-IL-15融合ポリペプチドと比較して、ヒトIL-2受容体ベータ/ガンマ (IL-2R $\beta\gamma$) への結合が減少している、単離されたヒトインターロイキン15 (IL-15) バリエントが提供される。

【0010】

別の側面では、1) Fcドメインを含む抗体；ならびにb) 配列番号1のE46およびV49位におけるアミノ酸置換、ならびに配列番号1のN1、N4、S7、K10、K11、D22、Y26、S29、D30、V31、H32、E53、G55、E64、I68、L69、E89、E93、M109および／またはI111位における少なくとも1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトインターロイキン15 (IL-15) バリエーションを含む単離された融合タンパク質であって、IL-15 バリエーションが抗体のFcドメインと共有結合し、Fcドメインが野生型Fcと比較して、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を有さない、単離された融合タンパク質が提供される。

10

【0011】

一部の態様では、IL-15 バリエーションは、a) N1、E46、およびV49；b) N4、E46、およびV49；c) S7、E46、およびV49；d) K10、E46、およびV49；e) K11、E46、およびV49；f) S29、E46、およびV49；g) V31、E46、およびV49；h) H32、E46、およびV49；i) E46、V49、およびE64；j) E46、V49、およびI68；k) E46、V49、およびL69；l) E46、V49、およびI111；m) N4、E46、V49、およびE64；n) E46、V49、N4、D30、およびE64；o) E46、V49、N4、D30、E64、およびI68；p) E46、V49、N4、D30、E64、およびM109；q) E46、V49、N4、D30、E64、I68、およびM109；r) N1、D30、E46、およびV49；s) N4、D30、E46、およびV49；t) S7、D30、E46、およびV49；u) K10、D30、E46、およびV49；v) K11、D30、E46、およびV49；w) S29、D30、E46、およびV49；x) D30、E46、V49、およびE64；y) D30、E46、V49R、およびI68；z) D30、E46、V49R、およびL69；aa) D30、E46、V49R、およびI111；bb) N1、D30、E46、V49、およびM109；cc) N4、D30、E46、V49、およびM109；dd) S7、D30、E46、V49、およびM109；ee) K10、D30、E46、V49、およびM109；ff) K11、D30、E46、V49、およびM109；gg) D30、E46、V49、E64、およびM109；hh) D30、E46、V49、I68、およびM109；ii) D30、E46、V49、L69およびM109；jj) D30、E46、V49、M109、およびI111；kk) D30、E46、V49、E64、I68、およびM109；ll) E46、V49、D30、E64、およびI68；mm) E46、V49、E64、およびM109；nn) E46、V49、D30、E64、I68、およびM109；oo) D22、Y26、V49、E46、E53、E89、およびE93；ならびにpp) N1、D30、E46、V49、およびE64からなる群から選択される位置において配列番号1におけるアミノ酸置換を含む。

20

30

【0012】

一部の態様では、IL-15 バリエーションは、a) N1Q、N1K、N1R、N1E、N1A、N1D、もしくはN1G；b) N4K、N4G、N4A、N4S、N4D、N4E、N4R、N4T、N4I、N4L、N4W、もしくはN4Q；c) S7E、S7G、S7D、S7K、S7N、S7R、S7H、もしくはS7T；d) K10D、K10A、K10S、K10E、K10L、K10M、K10D、もしくはK10G；e) K11D、K11S、もしくはK11W；f) D22N；g) Y26K、Y26R、もしくはY26H；h) S29N；i) D30N；j) V31S、V31D、もしくはV31K；k) H32G；l) E46GもしくはE46Q；m) V49N、V49K、もしくはV49R、V49E、V49H、もしくはV49Q；n) E53Q；o) G55SもしくはG55T；p) E64Q、E64K、E64A、E64S、E64N、E64H、E64T、もしくはE64R；q) I68S、I68A、I68R、I68T、I68K、I68N、I68M、I68F、I68Y、I68E、もしくはI68H；r) L69S、L69A、

40

50

L 6 9 D、L 6 9 T、L 6 9 M、L 6 9 G、L 6 9 Q、L 6 9 I、L 6 9 E、もしくは L 6 9 V；s) E 8 9 Q；t) E 9 3 Q；u) M 1 0 9 A、M 1 0 9 S、M 1 0 9 D、もしくは M 1 0 9 K；および／または v) I 1 1 1 A、I 1 1 1 K、I 1 1 1 S、もしくは I 1 1 1 D において 1 つまたは複数の特定の置換を含むアミノ酸置換を含む。一部の態様では、I L-1 5 バリエーションは、a) N 1 K、E 4 6 G、および V 4 9 R；b) N 4 K、E 4 6 G、および V 4 9 R；c) N 4 Q、E 4 6 G、および V 4 9 R；d) S 7 T、E 4 6 G、および V 4 9 R；e) V 3 1 S、E 4 6 G、および V 4 9 R；f) V 3 1 K、E 4 6 G、および V 4 9 R；g) E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；h) E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；i) N 4 Q、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；j) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；k) N 1 K、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；l) N 1 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；m) N 4 G、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；n) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；o) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；p) S 7 E、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；q) S 7 G、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；r) S 7 T、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；s) K 1 0 D、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；t) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 A；u) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；v) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；w) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S；x) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 K；y) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；z) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；a a) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；b b) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；c c) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S；d d) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、E 6 4 Q、および I 6 8 S；e e) N 1 A、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；ならびに f f) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む。

【0013】

別の側面では、配列番号 1 の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、D 2 2、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 4 6、E 5 3、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、E 9 3、M 1 0 9、および／または I 1 1 1 位において 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む単離されたヒト I L-1 5 バリエーションであって、I L-1 5 バリエーションが、野生型ヒト I L-1 5 ポリペプチドまたは野生型 I L-1 5 受容体アルファ-I L-1 5 融合ポリペプチドと比較して、ヒト I L-1 5 受容体アルファ (I L-1 5 R α) および／またはヒト I L-2 受容体ベータ (I L-2 R β) および／または I L-2 受容体ガンマ (I L-2 R γ) への結合が減少しているかまたはそれらと結合しない、単離されたヒト I L-1 5 バリエーションが提供される。

【0014】

別の側面では、配列番号 93 に示されるアミノ酸配列を含む単離されたヒト I L-1 5 バリエーションが提供される。一部の態様では、I L-1 5 バリエーションは膜貫通ドメインをさらに含む。

【0015】

別の側面では、1) Fc ドメインを含む抗体；ならびに b) 配列番号 1 の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、D 2 2、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 4 6、E 5 3、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、E 9 3、M 1 0 9、および／または I 1 1 1 位において 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトインターロイキン 15 (I L-1 5) バリエーションを含む単離された融合タンパク質であって、I L-1 5 バリエーションが抗体の Fc ドメインと共有結合し、Fc ドメインが、野生型 Fc と比較して、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を有さない、単離された融合タンパク質が提供される。

【0016】

別の側面では、1) Fc ドメインを含む I L-1 5 抗体；および b) 配列番号 1 のヒト

インターロイキン15（IL-15）タンパク質を含む単離された融合タンパク質であって、IL-15が抗体のFcドメインと共有結合している、単離された融合タンパク質が提供される。

【0017】

一部の態様では、本発明のIL-15融合タンパク質における抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または二重特異性抗体であってもよい。

一部の態様では、本発明のIL-15融合タンパク質における抗体は、ヒトIgG₁、IgG₂、IgG_{2Δa}、IgG₃、IgG₄、IgG_{4Δb}、IgG_{4Δc}、IgG_{4S228P}、IgG_{4ΔbS228P}、およびIgG_{4ΔcS228P}サブクラスのものである。

10

【0018】

一部の態様では、a) 本発明のIL-15融合タンパク質の抗体はIgG₂であり、抗体可変ドメインは、ヒンジ領域における223、225、および228位において、ならびにヒトIgG₂（配列番号3）のCH3領域における409もしくは368位（EU番号付けスキーム）においてアミノ酸修飾を含み；b) 本発明のIL-15融合タンパク質の抗体はIgG₁であり、抗体可変ドメインは、ヒンジ領域における221および228位において、ならびにヒトIgG₁（配列番号2）のCH3領域における409もしくは368位（EU番号付けスキーム）においてアミノ酸修飾を含み；またはc) 本発明のIL-15融合タンパク質の抗体はIgG₁であり、抗体可変ドメインは、ヒトIgG₁（配列番号2）のCH3領域における349、354、366、368、および／もしくは407位（EU番号付けスキーム）においてアミノ酸修飾を含む。一部の態様では、抗体は、a) ヒトIgG₂（配列番号3）の1つもしくは複数の265、330、および／もしくは331位；またはb) ヒトIgG₁（配列番号2）の1つもしくは複数の234、235、237、および／もしくは322位においてアミノ酸修飾をさらに含む。一部の態様では、抗体は、ヒトIgG₁（配列番号74および75）の1つまたは複数の234、235、237、349、354、366、368および／または407位においてアミノ酸修飾をさらに含む。

20

【0019】

一部の態様では、IL-15融合タンパク質に対する抗体は、抗CTLA-4抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗4-1BB抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗TIGIT抗体、抗OX40抗体、抗IL-7Rアルファ（CD127）抗体、抗IL-8抗体、抗IL-15抗体、抗HVE M抗体、抗BTLA抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗CD47抗体、抗CSF1R抗体、抗CSF1抗体、抗MARCO抗体、抗CXCR4抗体、抗VEGF抗体、抗VEGFR1抗体、抗VEGFR2抗体、抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD3二重特異性抗体、抗CD19抗体、抗CD20、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗ICOS抗体、抗CD22抗体、抗CD52抗体、抗CCR4抗体、抗CCR8抗体、抗CD200R抗体、抗VISG4抗体、抗CCR2抗体、抗IL1Rb2抗体、抗CXCR4抗体、抗CD206抗体、抗CD163抗体、抗KLRG1抗体、抗FLT3抗体、抗B7-H4抗体、抗B7-H3抗体、KLRG1抗体、および抗GITR抗体からなる群から選択される。

30

40

【0020】

一部の態様では、本発明のIL-15融合タンパク質は、ポリペプチドリinkerおよび／またはポリペプチドタグによって抗体と共有結合している。

別の側面では、本発明は、本明細書に記載されている治療有効量のIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0021】

別の側面では、本発明は、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド

50

を提供する。別の側面では、本発明はポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0022】

別の側面では、本発明は、本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションまたは I L - 1 5 融合タンパク質を組換えにより産生する単離された宿主細胞または細胞株を提供する。一部の態様では、宿主細胞または細胞株は操作された免疫細胞であり、操作された免疫細胞はキメラ抗原受容体 (C A R) を含む。一部の態様では、C A R 発現細胞は T 細胞であり、T 細胞は、分泌型または膜係留型において本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションまたは I L - 1 5 融合タンパク質を発現する。

【0023】

別の側面では、本発明は、I L - 1 5 バリエーションまたは I L - 1 5 融合タンパク質を産生する方法であって、タンパク質バリエーションまたは融合タンパク質が産生される条件下で、本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションまたは I L - 1 5 融合タンパク質を組換えにより産生する細胞株を培養するステップ、およびタンパク質バリエーションまたは融合タンパク質を回収するステップを含む方法を提供する。

【0024】

別の側面では、本発明は、本明細書に記載されている有効量の医薬組成物を、状態の処置を必要とする対象に投与するステップを含む、対象における状態を処置する方法を提供する。一部の態様では、状態はがんである。一部の態様では、がんは液体がんまたは固形がんである。一部の態様では、がんは、再発性、難治性、または転移性である。

【0025】

別の側面では、本発明は、本明細書に記載されている有効量の医薬組成物を、対象に投与するステップを含む、腫瘍を有する対象における腫瘍成長または腫瘍進行を阻害する方法を提供する。

【0026】

別の側面では、本発明は、本明細書に記載されている有効量の医薬組成物を、がん細胞の転移の阻害または阻止を必要とする対象に投与するステップを含む、対象におけるがん細胞の転移を阻害または阻止する方法を提供する。

【0027】

別の側面では、本発明は、本明細書に記載されている有効量の医薬組成物を、対象に投与するステップを含む、腫瘍退縮の誘導を必要とする対象における腫瘍退縮を誘導する方法を提供する。

【0028】

一部の態様では、本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションおよび I L - 1 5 融合タンパク質は、対象において非経口的に投与され得る。一部の態様では、対象はヒトである。

【0029】

一部の態様では、方法は、有効量の第 2 の治療剤を投与するステップをさらに含み得る。一部の態様では、第 2 の治療剤はバイオ治療剤である。

一部の態様では、第 2 の治療剤は、サイトカイン、免疫サイトカイン (例えば、抗 E D A - I L 1 0 融合タンパク質)、T N F α 、P A P 阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、キナーゼ阻害剤、A L K 阻害剤 (例えば、スニチニブまたはクリゾチニブ)、M E K 阻害剤、I D O 阻害剤、G L S 1 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤 (例えば、アキシチニブまたはパルボシクリブ)、C A R (キメラ抗原受容体) - T 細胞もしくは T 細胞療法、T L R (T o l l 様受容体) アゴニスト (例えば、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 7、T L R 9) などの P R R (パターン認識受容体) アゴニスト、または腫瘍ワクチンである。

【0030】

また、がんの処置または腫瘍成長もしくは腫瘍進行の阻害を必要とする対象におけるがんを処置するためまたは腫瘍成長もしくは腫瘍進行を阻害するための医薬の製造における、本明細書に提供されている I L - 1 5 バリエーションまたは I L - 1 5 融合タンパク質のいずれかの使用も提供される。

10

20

30

40

50

【0031】

一つの側面では、本発明は、第1の治療剤および第2の治療剤を含む併用療法を対象に投与するステップを含む、対象におけるがんを処置する方法であって、第1の治療剤がIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質である、方法を提供する。

【0032】

一部の態様では、第1の治療剤はIL-15バリエーションである。一部の態様では、第1の治療剤はIL-15融合タンパク質である。一部の態様では、第1の治療剤は本発明のいずれかのIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質である。一部の態様では、第1の治療剤は、配列番号84、85、86、87、89、または90に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0033】

一部の態様では、第2の治療剤は免疫サイトカインである。一部の態様では、第2の治療剤は、サイトカインとコンジュゲートまたは融合している、抗体、またはその断片を含む免疫サイトカイン（例えば融合タンパク質）である。一部の態様では、抗体、またはその断片は、フィブロネクチンのエクストラドメイン-A（EDA）アイソフォームに結合している（例えば抗EDA抗体）。一部の態様では、抗EDA抗体、またはその断片は、配列番号94に示される重鎖可変（VH）領域のCDR1、CDR2およびCDR3ならびに／または配列番号96に示される軽鎖可変（VL）領域のCDR1、CDR2およびCDR3を含む。一部の態様では、抗EDA抗体、またはその断片は、配列番号94のアミノ酸配列を有するVH領域および／または配列番号96のアミノ酸配列を有するVL領域を含む。一部の態様では、サイトカインはIL-10である。一部の態様では、IL-10は配列番号98のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、免疫サイトカインは少なくとも1つのリンカーを含む。一部の態様では、リンカーは配列番号95および／または97を含む。一部の態様では、免疫サイトカインは、配列番号99に示されるアミノ酸配列を含む抗EDA-IL-10融合タンパク質である。

20

【0034】

一部の態様では、本発明は、第1の治療剤および第2の治療剤を含む併用療法を対象に投与するステップを含む、対象におけるがんを処置する方法であって、第1の治療剤はIL-15融合タンパク質であり、第2の薬剤は抗EDA-IL-10融合タンパク質である、方法を提供する。一部の態様では、IL-15融合タンパク質は、配列番号84、85、86、87、89、または90に示されるアミノ酸配列を含み、抗EDA-IL-10融合タンパク質は、配列番号99に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0035】

一部の態様では、併用療法は、1、2、3、4または5種のさらなる治療剤をさらに含んでもよい。一部の態様では、併用療法は、抗PD-1または抗PD-L1抗体をさらに含む。一部の態様では、抗PD-1抗体は、BCD-100、カムレリズマブ（SHR-1210）、センプリマブ（REGN2810）、ゲノリムズマブ（genolimzumab）（CBT-501）、MED10680、ニボルマブ（OPDIVO（登録商標））、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA（登録商標））、PF-06801591（RN888）、シンチリマブ（IBI-308）、スパルタリズマブ（PDR-001）、STI-A1110、チスレリズマブ（BGB-A317）、またはTSR-042である。一部の態様では、抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブ（TECENTRIQ（登録商標））、デュルバルマブ（IMFINZI（登録商標））、BMS-936559（MDX-1105）、またはLY3300054である。

40

【0036】

一部の態様では、併用療法における各治療剤は、同時に（例えば、同じ医薬中でまたは一緒に）、並行して（すなわち、任意の順序で次々と投与される別個の医薬中で）、または任意の順序で連続して投与され得る。

【図面の簡単な説明】

【0037】

50

【図 1 A】ターゲティング抗体アームとして N 末端に二価 F a b ; C H 2 および C H 3 (D 2 6 5 A、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S) での F c γ R 結合を無効にする突然変異、ヒンジ上の二重特異性突然変異 (C 2 2 3 R / E、E 2 2 5 R / E、および P 2 2 8 R / E)、ならびにフレキシブルグリシン-セリン (G S) - リンカーを介する C 末端における I L - 1 5 突然変異タンパク質分子の一価連結のための C H 3 (K 4 0 9 R または L 3 6 8 E) を有するヘテロ二量体 F c を含む完全ヒト h I g G 2 Δ a を含む抗マウス P D 1 抗体 - I L - 1 5 融合タンパク質構築物を示す概略図である。I L - 1 5 タンパク質における突然変異には、(配列番号 1 の) N 4 K、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T および E 6 4 Q が含まれ; V 4 9 N - I 5 0 A - S 5 1 T は、N-結合型グリコシル化部位 (V 4 9 N 位から突き出る概略的な炭水化物モチーフで示される) である。

10

【図 1 B】図 1 A に示されるように抗体上に同じ突然変異を有する別の抗マウス P D 1 抗体 - I L - 1 5 突然変異体融合タンパク質構築物、ならびに N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G (または Y 2 6 K)、V 4 9 R (または V 4 9 K) および E 6 4 Q を含む I L - 1 5 タンパク質における突然変異の相違を示す図である。

【図 1 C】ターゲティング抗体アームとして N 末端に二価 F a b ; ヒンジ上の二重特異性突然変異 (L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、および G 2 3 7 A) ならびにフレキシブルグリシン-セリン (G S) - リンカーを介した C 末端での I L - 1 5 突然変異タンパク質分子の一価連結のための C H 3 (Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V) を有する完全ヒト I g G 1 を含む抗マウス P D 1 抗体 - I L - 1 5 融合タンパク質構築物 (「M 2」) を示す概略図である。I L - 1 5 タンパク質における突然変異には、(配列番号 1 の) E 4 6 G、V 4 9 R、E 6 4 Q、D 3 0 N、および N 1 G が含まれる。

20

【図 1 D】図 1 C に示されるように抗体上に同じ突然変異を有する別の抗マウス P D 1 抗体 - I L - 1 5 突然変異体融合タンパク質構築物 (「M 1」) を示す図であり、(配列番号 1 の) E 4 6 G、V 4 9 R、D 3 0 N、および N 1 A を含む I L - 1 5 タンパク質における突然変異に相違がある。

【図 2 A】図 2 A、図 2 B、図 2 C、および図 2 D は、I L - 1 5 受容体 (C D 1 2 2 + C D 1 3 2)、および一部の場合では同様に P D - 1 を発現する細胞への抗体または抗体-サイトカイン融合分子の直接結合を示す。分子には、抗マウス P D - 1 抗体 (図 2 A) ; アイソタイプ対照抗体 (A b 8 . 8) - a S u - I L - 1 5 (図 2 B) ; 抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5 (図 2 C) ; および抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 N Q (図 2 D) が含まれる。

30

【図 2 B】図 2 A、図 2 B、図 2 C、および図 2 D は、I L - 1 5 受容体 (C D 1 2 2 + C D 1 3 2)、および一部の場合では同様に P D - 1 を発現する細胞への抗体または抗体-サイトカイン融合分子の直接結合を示す。分子には、抗マウス P D - 1 抗体 (図 2 A) ; アイソタイプ対照抗体 (A b 8 . 8) - a S u - I L - 1 5 (図 2 B) ; 抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5 (図 2 C) ; および抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 N Q (図 2 D) が含まれる。

【図 2 C】図 2 A、図 2 B、図 2 C、および図 2 D は、I L - 1 5 受容体 (C D 1 2 2 + C D 1 3 2)、および一部の場合では同様に P D - 1 を発現する細胞への抗体または抗体-サイトカイン融合分子の直接結合を示す。分子には、抗マウス P D - 1 抗体 (図 2 A) ; アイソタイプ対照抗体 (A b 8 . 8) - a S u - I L - 1 5 (図 2 B) ; 抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5 (図 2 C) ; および抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 N Q (図 2 D) が含まれる。

40

【図 2 D】図 2 A、図 2 B、図 2 C、および図 2 D は、I L - 1 5 受容体 (C D 1 2 2 + C D 1 3 2)、および一部の場合では同様に P D - 1 を発現する細胞への抗体または抗体-サイトカイン融合分子の直接結合を示す。分子には、抗マウス P D - 1 抗体 (図 2 A) ; アイソタイプ対照抗体 (A b 8 . 8) - a S u - I L - 1 5 (図 2 B) ; 抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5 (図 2 C) ; および抗マウス P D - 1 - I L - 1 5 N Q (図 2 D) が含まれる。

50

【図 3 A】図 3 A、図 3 B、および図 3 C は、フローサイトメトリー分析により p S T A T 5 に対して陽性としても染色された所与のアッセイにおいて P D - 1 + または P D - 1 (低) のいずれかである細胞のパーセンテージをプロットすることによって、レポーターアッセイにおける非標的化 I L - 1 5、x m P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5 (野生型 I L - 1 5)、および x m P D - 1 - I L 1 5 N Q バリエーションの比較を示す。

【図 3 B】図 3 A、図 3 B、および図 3 C は、フローサイトメトリー分析により p S T A T 5 に対して陽性としても染色された所与のアッセイにおいて P D - 1 + または P D - 1 (低) のいずれかである細胞のパーセンテージをプロットすることによって、レポーターアッセイにおける非標的化 I L - 1 5、x m P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5 (野生型 I L - 1 5)、および x m P D - 1 - I L 1 5 N Q バリエーションの比較を示す。

【図 3 C】図 3 A、図 3 B、および図 3 C は、フローサイトメトリー分析により p S T A T 5 に対して陽性としても染色された所与のアッセイにおいて P D - 1 + または P D - 1 (低) のいずれかである細胞のパーセンテージをプロットすることによって、レポーターアッセイにおける非標的化 I L - 1 5、x m P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5 (野生型 I L - 1 5)、および x m P D - 1 - I L 1 5 N Q バリエーションの比較を示す。

【図 4 A】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 4 B】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 4 C】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 4 D】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 4 E】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 4 F】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 4 G】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 4 H】図 4 A、4 B、4 C、4 D、4 E、4 F、4 G、および 4 H は、様々な突然変異タンパク質 (突然変異体またはバリエーションは交換可能に使用される) のプロットを示し、これらの全ては x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 に基づく。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 5 A】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、および 5 G は、様々な突然変異タンパク質のプロットを示し、これらの全ては I L - 1 5 R a S u ドメインを欠き、I L - 1 5 R a への結合を低減させるかまたは断ち切る突然変異を含有する。アッセイした特定の

10

20

30

40

50

分子を各プロットに示す。

【図 5 B】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、および 5 G は、様々な突然変異タンパク質のプロットを示し、これらの全ては I L-1 5 R a S u ドメインを欠き、I L-1 5 R a への結合を低減させるかまたは断ち切る突然変異を含有する。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 5 C】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、および 5 G は、様々な突然変異タンパク質のプロットを示し、これらの全ては I L-1 5 R a S u ドメインを欠き、I L-1 5 R a への結合を低減させるかまたは断ち切る突然変異を含有する。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 5 D】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、および 5 G は、様々な突然変異タンパク質のプロットを示し、これらの全ては I L-1 5 R a S u ドメインを欠き、I L-1 5 R a への結合を低減させるかまたは断ち切る突然変異を含有する。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 5 E】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、および 5 G は、様々な突然変異タンパク質のプロットを示し、これらの全ては I L-1 5 R a S u ドメインを欠き、I L-1 5 R a への結合を低減させるかまたは断ち切る突然変異を含有する。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 5 F】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、および 5 G は、様々な突然変異タンパク質のプロットを示し、これらの全ては I L-1 5 R a S u ドメインを欠き、I L-1 5 R a への結合を低減させるかまたは断ち切る突然変異を含有する。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 5 G】図 5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、および 5 G は、様々な突然変異タンパク質のプロットを示し、これらの全ては I L-1 5 R a S u ドメインを欠き、I L-1 5 R a への結合を低減させるかまたは断ち切る突然変異を含有する。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 6 A】図 6 A、6 B、6 C、6 D、6 E、6 F、および 6 G は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 6 B】図 6 A、6 B、6 C、6 D、6 E、6 F、および 6 G は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 6 C】図 6 A、6 B、6 C、6 D、6 E、6 F、および 6 G は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 6 D】図 6 A、6 B、6 C、6 D、6 E、6 F、および 6 G は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 6 E】図 6 A、6 B、6 C、6 D、6 E、6 F、および 6 G は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 6 F】図 6 A、6 B、6 C、6 D、6 E、6 F、および 6 G は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 6 G】図 6 A、6 B、6 C、6 D、6 E、6 F、および 6 G は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 A】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L-1 5 野生型と比較して変化した活性 (p S T A T 5 活性化) を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 B】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L-1 5 野

10

20

30

40

50

生型と比較して変化した活性（p S T A T 5 活性化）を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 C】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L - 1 5 野生型と比較して変化した活性（p S T A T 5 活性化）を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 D】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L - 1 5 野生型と比較して変化した活性（p S T A T 5 活性化）を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 E】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L - 1 5 野生型と比較して変化した活性（p S T A T 5 活性化）を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 F】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L - 1 5 野生型と比較して変化した活性（p S T A T 5 活性化）を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 G】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L - 1 5 野生型と比較して変化した活性（p S T A T 5 活性化）を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 7 H】図 7 A、7 B、7 C、7 D、7 E、7 F、7 G、および 7 H は、I L - 1 5 野生型と比較して変化した活性（p S T A T 5 活性化）を有する様々な突然変異タンパク質のプロットを示す。アッセイした特定の分子を各プロットに示す。

【図 8 A】図 8 A、8 B、8 C、および 8 D は、x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 または x m P D 1 - I L 1 5 N Q のいずれかにより処置したマウスの生存率および体重に対する効果を示す。より具体的には、図 8 A は、矢印で示した日（d 0、4、7）に 2、1、または 0. 2 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 を投与した動物についての体重の変化を示す。図 8 B は、これらの同じ動物の全生存率を示す。図 8 C は、0、3、および 6 日目に 1、0. 8、または 0. 5 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 を投与した動物についての体重の変化を示す。図 8 D は、0、3、および 6 日目に 3、2、または 1 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 N Q を投与した動物についての体重の変化を示す。

【図 8 B】図 8 A、8 B、8 C、および 8 D は、x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 または x m P D 1 - I L 1 5 N Q のいずれかにより処置したマウスの生存率および体重に対する効果を示す。より具体的には、図 8 A は、矢印で示した日（d 0、4、7）に 2、1、または 0. 2 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 を投与した動物についての体重の変化を示す。図 8 B は、これらの同じ動物の全生存率を示す。図 8 C は、0、3、および 6 日目に 1、0. 8、または 0. 5 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 を投与した動物についての体重の変化を示す。図 8 D は、0、3、および 6 日目に 3、2、または 1 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 N Q を投与した動物についての体重の変化を示す。

【図 8 C】図 8 A、8 B、8 C、および 8 D は、x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 または x m P D 1 - I L 1 5 N Q のいずれかにより処置したマウスの生存率および体重に対する効果を示す。より具体的には、図 8 A は、矢印で示した日（d 0、4、7）に 2、1、または 0. 2 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 を投与した動物についての体重の変化を示す。図 8 B は、これらの同じ動物の全生存率を示す。図 8 C は、0、3、および 6 日目に 1、0. 8、または 0. 5 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 を投与した動物についての体重の変化を示す。図 8 D は、0、3、および 6 日目に 3、2、または 1 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 N Q を投与した動物についての体重の変化を示す。

【図 8 D】図 8 A、8 B、8 C、および 8 D は、x m P D - 1 - I L 1 5 R a S u - I L 1 5 または x m P D 1 - I L 1 5 N Q のいずれかにより処置したマウスの生存率および体重に対する効果を示す。より具体的には、図 8 A は、矢印で示した日（d 0、4、7）

10

20

30

40

50

に2、1、または0.2 mg/kgのxmPD1-IL15RaSu-IL15を投与した動物についての体重の変化を示す。図8Bは、これらの同じ動物の全生存率を示す。図8Cは、0、3、および6日目に1、0.8、または0.5 mg/kgのxmPD1-IL15RaSu-IL15を投与した動物についての体重の変化を示す。図8Dは、0、3、および6日目に3、2、または1 mg/kgのxmPD1-IL15 NQを投与した動物についての体重の変化を示す。

【図9A】図9Aおよび9Bは、CD4+もしくはCD8+細胞またはNK細胞としてゲートされ、PD-1+としてスコア化された脾細胞または腫瘍浸潤リンパ球のパーセンテージをプロットしている(図9A)；図9Bは、実際の平均蛍光強度としてプロットされた同じ試験を示す。

【図9B】図9Aおよび9Bは、CD4+もしくはCD8+細胞またはNK細胞としてゲートされ、PD-1+としてスコア化された脾細胞または腫瘍浸潤リンパ球のパーセンテージをプロットしている(図9A)；図9Bは、実際の平均蛍光強度としてプロットされた同じ試験を示す。

【図10A】図10A、10B、および10Cは、5、3、1、もしくは0.3 mg/kgのxmPD1-IL15 NQ、または0.3 mg/kgのxmPD1-IL15RaSu-IL15により処置したマウスを用い、対照(PBS処置)群と比較した、in vivoでのB16F10腫瘍有効性試験からのデータを示す。より具体的には、図10Aでは、原発腫瘍体積を全ての群についてプロットしている。図10Bでは、試験群における動物の全生存率をプロットしている。図10Cでは、体重変化(試験開始体重に対する)を各群についてプロットしている。

【図10B】図10A、10B、および10Cは、5、3、1、もしくは0.3 mg/kgのxmPD1-IL15 NQ、または0.3 mg/kgのxmPD1-IL15RaSu-IL15により処置したマウスを用い、対照(PBS処置)群と比較した、in vivoでのB16F10腫瘍有効性試験からのデータを示す。より具体的には、図10Aでは、原発腫瘍体積を全ての群についてプロットしている。図10Bでは、試験群における動物の全生存率をプロットしている。図10Cでは、体重変化(試験開始体重に対する)を各群についてプロットしている。

【図10C】図10A、10B、および10Cは、5、3、1、もしくは0.3 mg/kgのxmPD1-IL15 NQ、または0.3 mg/kgのxmPD1-IL15RaSu-IL15により処置したマウスを用い、対照(PBS処置)群と比較した、in vivoでのB16F10腫瘍有効性試験からのデータを示す。より具体的には、図10Aでは、原発腫瘍体積を全ての群についてプロットしている。図10Bでは、試験群における動物の全生存率をプロットしている。図10Cでは、体重変化(試験開始体重に対する)を各群についてプロットしている。

【図11A】図11Aおよび11Bは、各々1または0.3 mg/kgのいずれかにて、抗PD-1抗体、xmPD1-IL15 NQ、またはアイソタイプ対照(Ab8.8)-IL15 NQのいずれかにより処置したマウスを用いたin vivoでのB16F10腫瘍有効性試験からのデータを示す。図11A、11C、11E、11G、11Iおよび11Kは、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X軸の下
の矢印は投与スケジュールを示している。図11B、11D、11F、11H、11Jおよび11Lは、各群について、ベースライン(投与開始時、d=0)からの体重の平均変化をプロットしている。

【図11B】図11Aおよび11Bは、各々1または0.3 mg/kgのいずれかにて、抗PD-1抗体、xmPD1-IL15 NQ、またはアイソタイプ対照(Ab8.8)-IL15 NQのいずれかにより処置したマウスを用いたin vivoでのB16F10腫瘍有効性試験からのデータを示す。図11A、11C、11E、11G、11Iおよび11Kは、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X軸の下
の矢印は投与スケジュールを示している。図11B、11D、11F、11H、11Jおよび11Lは、各群について、ベースライン(投与開始時、d=0)からの体重の平均変

10

20

30

40

50

化をプロットしている。

【図 1 1 C】図 1 1 C、1 1 D、1 1 E および 1 1 F は、各々 0. 1、0. 3、1 または 5 mg / k g のいずれかにて、抗 PD 1 - I L 1 5 M 1 または M 2 のいずれか（それぞれ図 1 D および 1 C に示されている）により処置したマウスを用いた *in vivo* での B 1 6 F 1 0 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 1 1 A、1 1 C、1 1 E、1 1 G、1 1 I および 1 1 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 1 1 B、1 1 D、1 1 F、1 1 H、1 1 J および 1 1 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 1 1 D】図 1 1 C、1 1 D、1 1 E および 1 1 F は、各々 0. 1、0. 3、1 または 5 mg / k g のいずれかにて、抗 PD 1 - I L 1 5 M 1 または M 2 のいずれか（それぞれ図 1 D および 1 C に示されている）により処置したマウスを用いた *in vivo* での B 1 6 F 1 0 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 1 1 A、1 1 C、1 1 E、1 1 G、1 1 I および 1 1 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 1 1 B、1 1 D、1 1 F、1 1 H、1 1 J および 1 1 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 1 1 E】図 1 1 C、1 1 D、1 1 E および 1 1 F は、各々 0. 1、0. 3、1 または 5 mg / k g のいずれかにて、抗 PD 1 - I L 1 5 M 1 または M 2 のいずれか（それぞれ図 1 D および 1 C に示されている）により処置したマウスを用いた *in vivo* での B 1 6 F 1 0 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 1 1 A、1 1 C、1 1 E、1 1 G、1 1 I および 1 1 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 1 1 B、1 1 D、1 1 F、1 1 H、1 1 J および 1 1 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 1 1 F】図 1 1 C、1 1 D、1 1 E および 1 1 F は、各々 0. 1、0. 3、1 または 5 mg / k g のいずれかにて、抗 PD 1 - I L 1 5 M 1 または M 2 のいずれか（それぞれ図 1 D および 1 C に示されている）により処置したマウスを用いた *in vivo* での B 1 6 F 1 0 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 1 1 A、1 1 C、1 1 E、1 1 G、1 1 I および 1 1 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 1 1 B、1 1 D、1 1 F、1 1 H、1 1 J および 1 1 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 1 1 G】図 1 1 G および 1 1 H は、各々 1 mg / k g にて、抗 PD - 1 抗体または抗 PD 1 - I L 1 5 M 1 のいずれかにより処置したマウスを用いた *in vivo* での B 1 6 F 1 0 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 1 1 A、1 1 C、1 1 E、1 1 G、1 1 I および 1 1 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 1 1 B、1 1 D、1 1 F、1 1 H、1 1 J および 1 1 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 1 1 H】図 1 1 G および 1 1 H は、各々 1 mg / k g にて、抗 PD - 1 抗体または抗 PD 1 - I L 1 5 M 1 のいずれかにより処置したマウスを用いた *in vivo* での B 1 6 F 1 0 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 1 1 A、1 1 C、1 1 E、1 1 G、1 1 I および 1 1 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 1 1 B、1 1 D、1 1 F、1 1 H、1 1 J および 1 1 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 1 1 I】図 1 1 I、1 1 J、1 1 K および 1 1 L は、各々 0. 1、0. 3、1 または 5 mg / k g のいずれかにて、抗 PD 1 - I L 1 5 M 1 または M 2 のいずれかにより処置したマウスを用いた *in vivo* での MC 3 8 腫瘍有効性試験からのデータを示す。

図 11 A、11 C、11 E、11 G、11 I および 11 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 11 B、11 D、11 F、11 H、11 J および 11 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 11 J】図 11 I、11 J、11 K および 11 L は、各々 0.1、0.3、1 または 5 mg/kg のいずれかにて、抗 PD1-IL15 M1 または M2 のいずれかにより処置したマウスを用いた *in vivo* の MC38 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 11 A、11 C、11 E、11 G、11 I および 11 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 11 B、11 D、11 F、11 H、11 J および 11 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

10

【図 11 K】図 11 I、11 J、11 K および 11 L は、各々 0.1、0.3、1 または 5 mg/kg のいずれかにて、抗 PD1-IL15 M1 または M2 のいずれかにより処置したマウスを用いた *in vivo* の MC38 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 11 A、11 C、11 E、11 G、11 I および 11 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 11 B、11 D、11 F、11 H、11 J および 11 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

【図 11 L】図 11 I、11 J、11 K および 11 L は、各々 0.1、0.3、1 または 5 mg/kg のいずれかにて、抗 PD1-IL15 M1 または M2 のいずれかにより処置したマウスを用いた *in vivo* の MC38 腫瘍有効性試験からのデータを示す。図 11 A、11 C、11 E、11 G、11 I および 11 K は、各群についての原発腫瘍塊の体積を経時的にプロットしており、X 軸の下矢印は投与スケジュールを示している。図 11 B、11 D、11 F、11 H、11 J および 11 L は、各群について、ベースライン（投与開始時、 $d = 0$ ）からの体重の平均変化をプロットしている。

20

【図 12 A】図 12 A、12 B、12 C、および 12 D は、IL-15 薬物投与に起因する脾臓および TIL リンパ球の変化を分析するための実験からの結果を示す。図 12 A は、抗ヒト Fc を介した、上述の分子により処置した動物由来の細胞における抗 PD-1、Ab8.8-IL15 NQ、または x m PD1-IL15 NQ の検出を示す。上段：示したように、TIL CD8+（左）または CD4+（右）細胞からのヒストグラム。下段：示したように、脾臓 CD8+（左）または CD4+（右）細胞からのヒストグラム。図 12 B は、示した化合物の 3 回の投与の 1 日後にサンプリングした動物由来の、示したように、脾臓 T 細胞、CD4+ T 細胞、および CD8+ T 細胞のパーセンテージを示す。図 12 C は、示した化合物の 3 回の投与の 1 日後にサンプリングした動物由来の、示したように、TIL T 細胞、CD4+ T 細胞、および CD8+ T 細胞のパーセンテージを示す。図 12 D は、図 12 B および 12 C から算出した脾臓および腫瘍由来の CD8+ T 細胞対 CD4+ T 細胞の比をプロットしている。

30

【図 12 B】図 12 A、12 B、12 C、および 12 D は、IL-15 薬物投与に起因する脾臓および TIL リンパ球の変化を分析するための実験からの結果を示す。図 12 A は、抗ヒト Fc を介した、上述の分子により処置した動物由来の細胞における抗 PD-1、Ab8.8-IL15 NQ、または x m PD1-IL15 NQ の検出を示す。上段：示したように、TIL CD8+（左）または CD4+（右）細胞からのヒストグラム。下段：示したように、脾臓 CD8+（左）または CD4+（右）細胞からのヒストグラム。図 12 B は、示した化合物の 3 回の投与の 1 日後にサンプリングした動物由来の、示したように、脾臓 T 細胞、CD4+ T 細胞、および CD8+ T 細胞のパーセンテージを示す。図 12 C は、示した化合物の 3 回の投与の 1 日後にサンプリングした動物由来の、示したように、TIL T 細胞、CD4+ T 細胞、および CD8+ T 細胞のパーセンテージを示す。図 12 D は、図 12 B および 12 C から算出した脾臓および腫瘍由来の CD8+ T 細胞対 CD4+ T 細胞の比をプロットしている。

40

【図 12 C】図 12 A、12 B、12 C、および 12 D は、IL-15 薬物投与に起因す

50

る脾臓およびTILリンパ球の変化を分析するための実験からの結果を示す。図12Aは、抗ヒトFcを介した、上述の分子により処置した動物由来の細胞における抗PD-1、Ab8.8-IL15 NQ、またはxmPD1-IL15 NQの検出を示す。上段：示したように、TIL CD8+（左）またはCD4+（右）細胞からのヒストグラム。下段：示したように、脾臓CD8+（左）またはCD4+（右）細胞からのヒストグラム。図12Bは、示した化合物の3回の投与の1日後にサンプリングした動物由来の、示したように、脾臓T細胞、CD4+ T細胞、およびCD8+ T細胞のパーセンテージを示す。図12Cは、示した化合物の3回の投与の1日後にサンプリングした動物由来の、示したように、TIL T細胞、CD4+ T細胞、およびCD8+ T細胞のパーセンテージを示す。図12Dは、図12Bおよび12Cから算出した脾臓および腫瘍由来のCD8 T細胞対CD4 T細胞の比をプロットしている。

【図12D】図12A、12B、12C、および12Dは、IL-15薬物投与に起因する脾臓およびTILリンパ球の変化を分析するための実験からの結果を示す。図12Aは、抗ヒトFcを介した、上述の分子により処置した動物由来の細胞における抗PD-1、Ab8.8-IL15 NQ、またはxmPD1-IL15 NQの検出を示す。上段：示したように、TIL CD8+（左）またはCD4+（右）細胞からのヒストグラム。下段：示したように、脾臓CD8+（左）またはCD4+（右）細胞からのヒストグラム。図12Bは、示した化合物の3回の投与の1日後にサンプリングした動物由来の、示したように、脾臓T細胞、CD4+ T細胞、およびCD8+ T細胞のパーセンテージを示す。図12Cは、示した化合物の3回の投与の1日後にサンプリングした動物由来の、示したように、TIL T細胞、CD4+ T細胞、およびCD8+ T細胞のパーセンテージを示す。図12Dは、図12Bおよび12Cから算出した脾臓および腫瘍由来のCD8 T細胞対CD4 T細胞の比をプロットしている。

【図13A】図13Aおよび13Bは、6日目における末梢血または腫瘍浸潤リンパ球中のNK、CD8+ TおよびTreg細胞の絶対数を示し、それぞれxmPD1-IL15 M1およびxmPD1-IL15 m2によって最大効果を有することを示した。

【図13B】図13Aおよび13Bは、6日目における末梢血または腫瘍浸潤リンパ球中のNK、CD8+ TおよびTreg細胞の絶対数を示し、それぞれxmPD1-IL15 M1およびxmPD1-IL15 m2によって最大効果を有することを示した。

【図13C】図13Cおよび13Dは、B16F10腫瘍有効性モデルに対する、CD8 TおよびNK1.1+細胞を枯渇させることのそれぞれの効果を示す。試験の間のマウスの処置レジメンおよび平均体重も示す。

【図13D】図13Cおよび13Dは、B16F10腫瘍有効性モデルに対する、CD8 TおよびNK1.1+細胞を枯渇させることのそれぞれの効果を示す。試験の間のマウスの処置レジメンおよび平均体重も示す。

【図13E】図13Eは、B16F10腫瘍有効性モデルに対する、T細胞放出を阻害する、FTY420処置の効果を示す。試験の間のマウスの処置レジメンおよび平均体重も示す。

【図14A】図14Aおよび図14Bは、IL-15含有化合物を与えられたマウスからのin vivoでのサイトカイン産生に対する効果を示す。図14Aは、示したIL-15化合物の単回投与の6、24、48、72、96、および120時間後の平均IFNγレベル（n=3の動物）を示す。図14Bは、示したIL-15化合物の単回投与の6、24、48、72、96、および120時間後の平均IL-6レベル（n=3の動物）を示す。

【図14B】図14Aおよび図14Bは、IL-15含有化合物を与えられたマウスからのin vivoでのサイトカイン産生に対する効果を示す。図14Aは、示したIL-15化合物の単回投与の6、24、48、72、96、および120時間後の平均IFNγレベル（n=3の動物）を示す。図14Bは、示したIL-15化合物の単回投与の6、24、48、72、96、および120時間後の平均IL-6レベル（n=3の動物）を示す。

10

20

30

40

50

【図15A】図15A、15B、15C、15D、15Eおよび15Fは、ヒト末梢血単核細胞に対する標的化抗ヒトPD-1 (xhPD1) - IL15 M1もしくはM2または非標的化アイソタイプ対照抗体-IL15キメラ分子を添加する効果を示し、それらは、それぞれ、ヒトNK細胞、CD8⁺エフェクターメモリーT細胞およびCD8⁺中枢メモリーT細胞に対して異なるpSTAT5活性化を引き起こす。

【図15B】図15A、15B、15C、15D、15Eおよび15Fは、ヒト末梢血単核細胞に対する標的化抗ヒトPD-1 (xhPD1) - IL15 M1もしくはM2または非標的化アイソタイプ対照抗体-IL15キメラ分子を添加する効果を示し、それらは、それぞれ、ヒトNK細胞、CD8⁺エフェクターメモリーT細胞およびCD8⁺中枢メモリーT細胞に対して異なるpSTAT5活性化を引き起こす。

【図15C】図15A、15B、15C、15D、15Eおよび15Fは、ヒト末梢血単核細胞に対する標的化抗ヒトPD-1 (xhPD1) - IL15 M1もしくはM2または非標的化アイソタイプ対照抗体-IL15キメラ分子を添加する効果を示し、それらは、それぞれ、ヒトNK細胞、CD8⁺エフェクターメモリーT細胞およびCD8⁺中枢メモリーT細胞に対して異なるpSTAT5活性化を引き起こす。

【図15D】図15A、15B、15C、15D、15Eおよび15Fは、ヒト末梢血単核細胞に対する標的化抗ヒトPD-1 (xhPD1) - IL15 M1もしくはM2または非標的化アイソタイプ対照抗体-IL15キメラ分子を添加する効果を示し、それらは、それぞれ、ヒトNK細胞、CD8⁺エフェクターメモリーT細胞およびCD8⁺中枢メモリーT細胞に対して異なるpSTAT5活性化を引き起こす。

【図15E】図15A、15B、15C、15D、15Eおよび15Fは、ヒト末梢血単核細胞に対する標的化抗ヒトPD-1 (xhPD1) - IL15 M1もしくはM2または非標的化アイソタイプ対照抗体-IL15キメラ分子を添加する効果を示し、それらは、それぞれ、ヒトNK細胞、CD8⁺エフェクターメモリーT細胞およびCD8⁺中枢メモリーT細胞に対して異なるpSTAT5活性化を引き起こす。

【図15F】図15A、15B、15C、15D、15Eおよび15Fは、ヒト末梢血単核細胞に対する標的化抗ヒトPD-1 (xhPD1) - IL15 M1もしくはM2または非標的化アイソタイプ対照抗体-IL15キメラ分子を添加する効果を示し、それらは、それぞれ、ヒトNK細胞、CD8⁺エフェクターメモリーT細胞およびCD8⁺中枢メモリーT細胞に対して異なるpSTAT5活性化を引き起こす。

【図16A】図16A、16Bおよび16Cは、抗EDA-IL-10融合タンパク質と組み合わせたPD-1標的化IL-15分子 (xPD1-IL15 M1) のin vivoでの有効性試験を示す。図16Aは、0.3mg/kgのxPD1-IL15 M1および5mg/kgの抗EDA-IL-10融合タンパク質 (xEDA-IL10) の抗腫瘍有効性を示す。図16Bは、1mg/kgのxPD1-IL15 M1および5mg/kgの抗EDA-IL-10融合タンパク質 (xEDA-IL10) の抗腫瘍有効性を示す。図16Cは、試験全体を通じた各処置群における動物の (0日目のベースラインからの) 平均体重変化をプロットしている。

【図16B】図16A、16Bおよび16Cは、抗EDA-IL-10融合タンパク質と組み合わせたPD-1標的化IL-15分子 (xPD1-IL15 M1) のin vivoでの有効性試験を示す。図16Aは、0.3mg/kgのxPD1-IL15 M1および5mg/kgの抗EDA-IL-10融合タンパク質 (xEDA-IL10) の抗腫瘍有効性を示す。図16Bは、1mg/kgのxPD1-IL15 M1および5mg/kgの抗EDA-IL-10融合タンパク質 (xEDA-IL10) の抗腫瘍有効性を示す。図16Cは、試験全体を通じた各処置群における動物の (0日目のベースラインからの) 平均体重変化をプロットしている。

【図16C】図16A、16Bおよび16Cは、抗EDA-IL-10融合タンパク質と組み合わせたPD-1標的化IL-15分子 (xPD1-IL15 M1) のin vivoでの有効性試験を示す。図16Aは、0.3mg/kgのxPD1-IL15 M1および5mg/kgの抗EDA-IL-10融合タンパク質 (xEDA-IL10) の

10

20

30

40

50

抗腫瘍有効性を示す。図16Bは、1mg/kgのxPD1-IL15 M1および5mg/kgの抗EDA-IL-10融合タンパク質(xEDA-IL 10)の抗腫瘍有効性を示す。図16Cは、試験全体を通じた各処置群における動物の(0日目のベースラインからの)平均体重変化をプロットしている。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本明細書に開示されている本発明は、ヒトインターロイキン15(IL-15)バリエーションおよびそれらを含む融合タンパク質に関する。本発明のIL-15バリエーションは、野生型ヒトIL-15ポリペプチドまたは野生型IL-15受容体アルファ-IL-15融合ポリペプチドと比較して、IL-15受容体アルファ(CD215)への結合が減少しているかまたはそれと結合せず、IL-15と、IL-2受容体ベータ(CD122)および共通ガンマ鎖(CD132)から構成される、そのシグナル伝達受容体との相互作用が低減していることが実証される。本発明の第2の側面では、抗体融合キメラタンパク質として提示される場合、これらの親和性が低減したIL-15バリエーションは、所望の細胞型(抗体標的を発現するそれらの細胞)に選択的に標的化される。IL-15受容体複合体を発現するが、抗体標的を発現しない細胞型は、両方の成分を発現するそれらの細胞と比較して、ほとんど活性化されないか、または活性化されない。さらに、本発明のIL-15融合タンパク質は、ナチュラルキラー(NK)細胞よりもヒト末梢CD8 T細胞において下流のバイオマーカーpSTAT5を優先的に活性化し、ヒトCD8腫瘍浸潤Tリンパ球(TIL)の強力かつ優先的な活性化を有することも実証される。したがって、本発明のIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質は、抗腫瘍活性などの生物活性を効果的かつ安全に促進するために細胞サブセットの活性化を選択的にモジュレートする。本発明の第3の側面では、これらの親和性が低減したIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質は、分泌型または膜係留型のいずれかとして、CAR T細胞においてポリヌクレオチドとして発現される場合、活性および増殖を含むCAR T機能を増強するために使用される。

一般的技術

本発明の実施は、別段の指示がない限り、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術を利用し、これらは当業者の技術の範囲内である。このような技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(Sambrookら、1989)、Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編、1984); Methods in Molecular Biology、Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis編、1998)、Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney編、1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. MatherおよびP. E. Roberts、1998)、Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J. B. Griffiths、およびD. G. Newell編、1993~1998)、J. WileyおよびSons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. MillerおよびM. P. Calos編、1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編、1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction、(Mullisら編、1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coliganら編、1991); Short Protocols in

Molecular Biology (WileyおよびSons、1999) ; Immunobiology (C. A. JanewayおよびP. Travers、1997) ; Antibodies (P. Finch、1997) ; Antibodies: a practical approach (D. Catty. 編、IRL Press、1988~1989) ; Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean編、Oxford University Press、2000) ; Using antibodies: a laboratory manual (E. HarlowおよびD. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999) ; The Antibodies (M. ZanettiおよびJ. D. Capra編、Harwood Academic Publishers、1995) などの文献に十分に説明されている。

10

定義

以下の用語は、別段の指示がない限り、以下の意味を有すると理解されるべきである：

「単離された分子」という用語は、その起源または誘導の供給源によって分子（ここで、分子は、例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体である）を指す場合、（１）そのネイティブ状態でそれに伴う天然付随成分が付随しない、（２）同じ供給源、例えば、種、それが発現される細胞、ライブラリーなどからの他の分子を実質的に含まない、（３）異なる種由来の細胞によって発現される、または（４）天然に存在しない。したがって、化学的に合成された、またはそれが天然に起源する系とは異なる細胞系において発現される分子は、その天然付随成分から「単離される」。分子はまた、当該分野で周知の精製技術を使用する単離によって、天然付随成分を実質的に含まなくされ得る。分子の純度または均一性は、当該分野で周知のいくつかの手段によってアッセイされ得る。例えば、ポリペプチド試料の純度は、当該分野で周知の技術を使用してポリペプチドを可視化するために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルの染色を使用してアッセイされ得る。特定の目的のために、より高い分解能が、HPLCまたは精製のための当該分野で周知の他の手段を使用することによって提供され得る。

20

【0039】

本明細書で使用されている場合、「IL-15」という用語は、IL-15の活性の少なくとも一部を保持するIL-15およびそのバリエーションの任意の形態を指す。別に示されない限り、例えばヒトIL-15に対する特定の参照により、IL-15は、ネイティブ配列IL-15の全ての哺乳動物種、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含む。1つの例示的な野生型ヒトIL-15は、Uniprot受託番号P40933（配列番号5）として見出される。

30

【0040】

「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸の鎖を指すために、本明細書で相互交換可能に使用される。この鎖は、直鎖でも分岐鎖でもよく、修飾されたアミノ酸を含んでもよく、および／または非アミノ酸によって中断されてもよい。これらの用語はまた、天然にまたは介入によって修飾されたアミノ酸鎖；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば、標識化成分とのコンジュゲーションも包含する。例えば、アミノ酸の1つまたは複数のアナログ（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ならびに当該分野で公知の他の修飾を含有するポリペプチドもまた、この定義に含まれる。ポリペプチドは、単一の鎖として、または会合した鎖として存在し得ることが理解される。

40

【0041】

「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域中に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して、標的、例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどに特異的に結合することができる免疫グロブリン分子である。本明細書で使用されている場合、この用語は、インタクトなポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけではなく、他

50

に特定しない限り、特異的結合についてインタクトな抗体と競合するその任意の抗原結合部分、抗原結合部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構成もまた包含する。抗原結合部分には、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F v、ドメイン抗体 (d A b、例えば、サメおよびラクダ科抗体)、相補性決定領域 (C D R) を含む断片、単鎖可変断片抗体 (s c F v)、マキシボディ (m a x i b o d y)、ミニボディ (m i n i b o d y)、イントラボディ (i n t r a b o d y)、ディアボディ (d i a b o d y)、トリアボディ (t r i a b o d y)、テトラボディ (t e t r a b o d y)、v-N A R および b i s - s c F v、ならびにポリペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも一部分を含有するポリペプチドが含まれる。抗体には、任意のクラス、例えば、I g G、I g A、または I g M (またはそのサブクラス) の抗体が含まれ、抗体は、任意の特定のクラスのものである必要はない。その重鎖の定常領域の抗体アミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラスに割当てられ得る。5つの主要なクラスの免疫グロブリン：I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M が存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス (アイソタイプ)、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁ および I g A₂ へとさらに分割され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元構成は周知である。

10

【0042】

20

抗体の「可変領域」とは、単独または組合せのいずれかでの、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。当該分野で公知のように、重鎖および軽鎖の可変領域は各々、超可変領域としても公知の3つの相補性決定領域 (C D R) によって接続された4つのフレームワーク領域 (F R) からなり、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。特に、C D R 領域の外側 (すなわち、フレームワーク領域中) のアミノ酸残基において置換を有する、対象可変領域のバリエーションが所望される場合、適切なアミノ酸置換、好ましくは、保存的アミノ酸置換は、対象可変領域を、その対象可変領域と同じカノニカルクラスの C D R 1 および C D R 2 配列を含有する他の抗体の可変領域と比較することによって同定され得る (C h o t h i a および L e s k、J M o l B i o l 196 (4) : 901 ~ 917 ページ、1987)。

30

【0043】

ある特定の態様では、C D R の明確な描写および抗体の結合部位を含む残基の同定は、抗体の構造を解析することおよび／または抗体-リガンド複合体の構造を解析することによって達成される。ある特定の態様では、それは、当業者に公知の種々の技術のいずれか、例えば、X線結晶解析によって達成され得る。ある特定の態様では、分析の種々の方法が、C D R 領域を同定または近似するために利用され得る。ある特定の態様では、分析の種々の方法が、C D R 領域を同定または近似するために利用され得る。このような方法の例には、K a b a t 定義、C h o t h i a 定義、A b M 定義、接触定義、およびコンフォメーション定義が含まれるがこれらに限定されない。

【0044】

40

K a b a t 定義は、抗体中の残基を番号付けするための標準であり、典型的には、C D R 領域を同定するために使用される。例えば、J o h n s o n および W u、2000、N u c l e i c A c i d s R e s .、28 : 214 ~ 8 ページを参照のこと。C h o t h i a 定義は、K a b a t 定義と類似しているが、C h o t h i a 定義は、特定の構造的ループ領域の位置を考慮に入れる。例えば、C h o t h i a ら、1986、J . M o l . B i o l .、196 : 901 ~ 17 ページ ; C h o t h i a ら、1989、N a t u r e、342 : 877 ~ 83 ページを参照のこと。A b M 定義は、抗体構造をモデル化する O x f o r d M o l e c u l a r G r o u p によって作成されたコンピュータープログラムの一體的スイートを使用する。例えば、M a r t i n ら、1989、P r o c N a t l A c a d S c i (U S A)、86 : 9268 ~ 9272 ページ ; 「A b M^{T M}」,

50

A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies」、Oxford、UK; Oxford Molecular, Ltd. を参照のこと。AbM定義は、PROTEINS、Structure, Function and Genetics Suppl.、3:194~198ページ中でSamudralaら、1999、「Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach」によって記載されているものなどの、知識データベースおよびab initio法の組合せを使用して、一次配列から抗体の三次構造をモデル化する。接触定義は、利用可能な複雑な結晶構造の分析に基づく。例えば、MacCallumら、1996、J. Mol. Biol.、5:732~45ページを参照のこと。CDRの「コンフォメーション定義」と本明細書で称される別のアプローチでは、CDRの位置は、抗原結合にエンタルピー的に寄与する残基として同定され得る。例えば、Makabeら、2008、Journal of Biological Chemistry、283:1156~1166ページを参照のこと。なお他のCDR境界定義は、上記アプローチのうちの1つに厳格に従わない場合があるにもかかわらず、Kabat CDRの少なくとも一部分と重複するが、それらは、特定の残基または残基の群が抗原結合に顕著に影響しないという予測または実験的知見の観点から短縮または延長することもできる。本明細書で使用されている場合、CDRは、アプローチの組合せを含む、当該分野で公知の任意のアプローチによって定義されたCDRを指し得る。本明細書で使用されている方法は、これらのアプローチのいずれかに従って定義されたCDRを利用し得る。1つよりも多いCDRを含有する任意の所与の態様について、CDRは、Kabat、Chothia、拡張型、AbM、接触、および／またはコンフォメーション定義のいずれかに従って定義され得る。

【0045】

当該分野で公知のように、抗体の「定常領域」とは、単独または組合せのいずれかでの、抗体軽鎖の定常領域または抗体重鎖の定常領域を指す。

本明細書で使用されている場合、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から取得される抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、微量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対するものである。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。修飾語「モノクローナル」は、抗体の特徴を、抗体の実質的に均一な集団から取得されるものとして示し、任意の特定の方法による抗体の産生を要求すると解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein、1975、Nature 256:495ページによって最初に記載されているハイブリドーマ法によって作製され得るか、または米国特許第4,816,567号に記載されているような組換えDNA法によって作製され得る。モノクローナル抗体はまた、例えば、McCaffertyら、1990、Nature 348:552~554ページに記載されている技術を使用して生成されたファージライブラリーから単離され得る。本明細書で使用されている場合、「ヒト化」抗体とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最低限の配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはその断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合性サブ配列）である非ヒト（例えば、ネズミ）抗体の形態を指す。好ましくは、ヒト化抗体は、レシピエントのCDR由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種、例えば、マウス、ラットまたはウサギのCDR（ドナー抗体）由来の残基によって置き換えられた、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体中にも、インポートされたCDRまたはフレームワーク配列中にも見出されないが、抗体の性能をさらに精緻化および最適化するために含まれる残基を含み得る。

【0046】

「ヒト抗体」は、本明細書で開示されているように、ヒトによって産生された抗体および／またはヒト抗体を作製するための技術のいずれかを使用して作製された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に排除する。

【0047】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が1つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指すことを意図する。

【0048】

当該分野で公知のように、「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、本明細書で相互交換可能に使用されている場合、任意の長さのヌクレオチドの鎖を指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくは塩基、および／またはそれらのアナログ、あるいはDNAまたはRNAポリメラーゼによって鎖中に取り込まれ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化されたヌクレオチドおよびそれらのアナログを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、鎖のアセンブリの前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、標識化成分とのコンジュゲーションによって、重合後にさらに修飾され得る。他の型の修飾には、例えば、「キャップ」、アナログによる、1つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電連結（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート（phosphoamide）、カルバメートなど）および荷電連結（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）によるものなど、ペンダント部分、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リシンなど）などを含有するもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）によるもの、キレーター（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属（oxidative metal）など）を含有するもの、アルキル化薬を含有するもの、修飾された連結によるもの（例えば、アルファアノマー核酸など）、ならびに未修飾の形態のポリヌクレオチドが含まれる。さらに、糖中に通常存在するヒドロキシル基のいずれかは、例えば、ホスホネート基、ホスフェート基によって置き換えられ得、標準的な保護基によって保護され得るか、もしくはさらなるヌクレオチドへのさらなる連結を準備するために活性化され得るか、または固体支持体にコンジュゲートされ得る。5'および3'末端のOHは、リン酸化され得るか、または1~20個の炭素原子のアミンもしくは有機キャップ基部分で置換され得る。他のヒドロキシルはまた、標準的な保護基へと誘導体化され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-フルオロまたは2'-アジド-リボース、炭素環式糖アナログ、アルファーまたはベーターアノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロースまたはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式アナログおよび脱塩基ヌクレオシドアナログ、例えば、メチルリボシドを含む、当該分野で一般に公知の類似の形態のリボースまたはデオキシリボース糖もまた含有し得る。1つまたは複数のホスホジエステル連結は、代替的連結基によって置き換えられ得る。これらの代替的連結基には、ホスフェートが、P(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂（「ホルムアセタール（formacetal）」）によって置き換えられた態様が含まれるがこれらに限定されず、式中、各RまたはR'は独立して、H、またはエーテル（-O-）連結、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルもしくはアラルジル（araldyl）を任意選択で含有する置換もしくは未置換のアルキル（1~20C）である。ポリヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。前述の説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書で言及されている全てのポリヌクレオチドに当てはまる。

【0049】

10

20

30

40

50

エピトープに「優先的に結合する」または「特異的に結合する」（本明細書で相互交換可能に使用されている）抗体は、当該分野で十分理解される用語であり、このような特異的または優先的結合を決定するための方法もまた、当該分野で周知である。分子は、それが代替的な細胞または物質と反応または会合する場合よりも、特定の細胞または物質と、より頻繁に、より迅速に、より長い持続時間で、および／またはより大きい親和性で反応または会合する場合、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと言われる。抗体は、それが他の物質に結合する場合よりも、より大きい親和性、結合力で、より迅速に、および／またはより長い持続時間で結合する場合、標的に「特異的に結合する」または「優先的に結合する」。例えば、標的（例えば、PD-1）エピトープに特異的または優先的に結合する抗体は、それが他の標的エピトープまたは非標的エピトープに結合する場合よりも、より大きい親和性、結合力で、より迅速に、および／またはより長い持続時間で、このエピトープに結合する抗体である。この定義を読むことによって、例えば、第1の標的に特異的または優先的に結合する抗体（または部分もしくはエピトープ）が、第2の標的に特異的または優先的に結合してもしなくてもよいこともまた理解される。このように、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的結合を必ずしも必要としない（それを含み得るが）。一般に、必ずではないが、結合に対する言及は、優先的結合を意味する。

【0050】

本明細書で使用されている場合、「実質的に純粋」とは、少なくとも50%純粋（すなわち、混入物を含まない）、より好ましくは、少なくとも90%純粋、より好ましくは、少なくとも95%純粋、なおより好ましくは、少なくとも98%純粋、最も好ましくは、少なくとも99%純粋である材料を指す。

【0051】

「宿主細胞」は、ポリヌクレオチド挿入物の取り込みのためのベクターのレシピエントであり得るまたはレシピエントであった個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞には、単一の宿主細胞の子孫が含まれ、この子孫は、天然の、偶発的な、または計画的な突然変異に起因して、元の親細胞に対して（形態学的にまたはゲノムDNA補完的に）必ずしも完全に同一でない場合がある。宿主細胞には、本発明のポリヌクレオチドを *in vivo* でトランスフェクトされた細胞が含まれる。

【0052】

当該分野で公知のように、「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。「Fc領域」は、ネイティブ配列Fc領域またはバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変動し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、Cys226位におけるアミノ酸残基から、またはPro230位におけるアミノ酸残基から、そのカルボキシル末端まで伸びると定義される。Fc領域中の残基の番号付けは、Kabataと同様EUIンデックスのものである。Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.、1991。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン、CH2およびCH3を含む。当該分野で公知のように、Fc領域は、ダイマーまたはモノマー形態で存在し得る。

【0053】

当該分野で使用されている場合、「Fc受容体」および「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記載している。好ましいFcRはネイティブ配列ヒトFcRである。さらに、好ましいFcRはIgG抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよび選択的にスプライシングされた形態を含む、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIサブクラスを受容体を含む。FcγRII受容体は、その細胞質ドメインにおいて主に異なる同様のアミノ酸配列を有する、FcγRIIA（「活性化受容体」）およびFcγRIIB（「阻害受容体」）を含む。FcRは、RavetchおよびKinet、1991、Ann. Rev. Immunol.、9

10

20

30

40

50

：457～92ページ；Capelら、1994、Immunomethods、4：25～34ページ；ならびにde Haasら、1995、J. Lab. Clin. Med.、126：330～41ページに概説されている。「FcR」はまた、母体IgGの胎児への転移に關与する新生児受容体、FcRnを含む（Guyerら、1976、J. Immunol.、117：587ページ；およびKimら、1994、J. Immunol.、24：249ページ）。

【0054】

「競合する」という用語は、抗体に關して本明細書で使用されている場合、第1の抗体のその同族エピトープとの結合の結果が、第2の抗体の非存在下での第1の抗体の結合と比較して、第2の抗体の存在下で検出可能に減少されるように、第1の抗体、またはその抗原結合部分が、第2の抗体、またはその抗原結合部分の結合と十分に類似した様式でエピトープに結合することを意味する。第2の抗体のそのエピトープへの結合もまた、第1の抗体の存在下で検出可能に減少される別の可能性もあり得るが、必ずしも当てはまらない。すなわち、第1の抗体は、第2の抗体のそのエピトープへの結合を阻害できるが、第2の抗体は、第1の抗体のそのそれぞれのエピトープへの結合を阻害しない。しかしながら、各々の抗体が、同じ程度までであれ、より高い程度までであれ、またはより低い程度までであれ、他方の抗体のその同族エピトープまたはリガンドとの結合を検出可能に阻害する場合、これらの抗体は、それらのそれぞれのエピトープの結合について互いに「交差競合する」と言われる。競合性抗体および交差競合性抗体は共に、本発明によって包含される。このような競合または交差競合が生じる機構（例えば、立体障害、コンフォメーション変化、または共通のエピトープ、もしくははその部分への結合）にかかわらず、当業者は、本明細書で提供されている教示に基づいて、このような競合性抗体および／または交差競合性抗体が包含され、本明細書で開示されている方法にとって有用であり得ることを理解する。

【0055】

「機能的Fc領域」は、ネイティブ配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害；ファゴサイトーシス；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方調節などが含まれる。このようなエフェクター機能は、一般に、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わされることを必要とし、このような抗体エフェクター機能を評価するための当該分野で公知の種々のアッセイを使用して評価され得る。

【0056】

「ネイティブ配列Fc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾によってネイティブ配列Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含むが、ネイティブ配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能をなおも保持する。好ましくは、バリエーションFc領域は、ネイティブ配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1個のアミノ酸置換、例えば、約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは、ネイティブ配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域において約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書におけるバリエーションFc領域は、好ましくは、ネイティブ配列Fc領域および／または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の配列同一性、最も好ましくは、それらと少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは、それらと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。

【0057】

本明細書で使用されている場合、「処置」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果には、以下のうちの1つまたは複数が含まれるがこれらに限定されない：新生物性もしくはがん性細胞の増殖を低減させること（または新生物性もしくはがん性細胞を破壊すること）、新生物

性細胞の転移を阻害すること、腫瘍のサイズを収縮もしくは減少させること、がんの寛解、がんから生じる症状を減少させること、がん罹患している人の生活の質を増加させること、がんを処置するために必要とされる他の薬物療法の用量を減少させること、がんの進行を遅延させること、がんを治癒すること、および／またはがんを有する患者の生存を延長させること。

【0058】

「改善する」は、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質を投与しないことと比較した1つまたは複数の症状の緩和または好転を意味する。「改善する」はまた、症状の持続時間における短縮または低減も含む。

【0059】

本明細書で使用されている場合、薬物、化合物、または医薬組成物の「有効投薬量」または「有効量」は、任意の1つまたは複数の有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量である。より具体的な側面では、有効量は、処置されている対象の疾患の症状を予防、軽減もしくは改善する、および／または処置されている対象の生存を延長する。予防的用途について、有益なまたは所望の結果には、疾患の発達の間に存在する、疾患、その合併症および中間の病理学的表現型の生化学的、組織学的および／または挙動的症状を含む、疾患のリスクを排除もしくは低減させること、疾患の重症度を軽減すること、または疾患の発症を遅延させることが含まれる。治療的用途について、有益なまたは所望の結果には、例えば、限定されないが、胃癌(gastric cancer)、小腸がん、肉腫、頭頸部がん、胸腺がん、上皮がん、唾液腺がん、肝がん、胆管がん、神経内分泌腫瘍、胃癌(stomach cancer)、甲状腺がん、肺がん、中皮腫、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、膵がん、神経膠腫、腎がん(例えば、腎細胞癌)、膀胱がん、子宮頸がん、子宮がん、外陰がん、陰茎がん、精巣がん、肛門がん、絨毛腫、大腸がん、口腔がん、皮膚がん、メルケル細胞癌、膠芽腫、脳腫瘍、骨がん、眼がん、および黒色腫、多発性骨髄腫、悪性形質細胞腫、ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、カーラー病および骨髄腫症、形質細胞白血病、形質細胞腫、B細胞前リンパ球性白血病、ヘアリー細胞白血病、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、急性リンパ球性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫(Burkitt's lymphoma)、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、大細胞リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、骨髄性白血病、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症(Waldenström's macroglobulinemia)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、小細胞リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫(Burkitt lymphoma)、縦隔(胸腺)原発大細胞型B細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症(Waldenström macroglobulinemia)、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、T細胞／組織球豊富型大細胞型B細胞リンパ腫、中枢神経系原発リンパ腫、原発性皮膚びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(脚型)、高齢者のEBV陽性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、炎症を伴うびまん性大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、ALK陽性大細胞型B細胞リンパ腫、形質芽球性リンパ腫、HHV8関連多中心性キャスルマン病で発生する大細胞型B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫とバーキットリンパ腫との間の中間的な特徴を有する分類されないB細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫と古典的ホジキンリンパ腫との間の中間的な特徴を有する分類されないB細胞リンパ腫、および他の造血細胞関連がんを含む、例えば、固形がんおよび液体がんなどの疾患の1つまたは複数の症状を低減させること、疾患を処置するために必要とされる他の薬物療法の用量を減少させること、別の薬物療法の効果を増強すること、ならびに／または患者におけるがんの進行を遅延させることなどの臨床結果が含まれる。有効投薬量は、1回または複数の投与で投与され得る。本発明の目的のために、薬物、化合物、ま

10

20

30

40

50

たは医薬組成物の有効投薬量は、直接的または間接的のいずれかで予防的処置または治療的処置を達成するのに十分な量である。臨床的文脈において理解されるように、薬物、化合物、または医薬組成物の有効投薬量は、別の薬物、化合物、または医薬組成物と併せて達成されてもされなくてもよい。したがって、「有効投薬量」は、1つまたは複数の治療剤を投与するという観点から検討され得、単一の薬剤は、1つまたは複数の他の薬剤と併せて、望ましい結果が達成され得るかまたは達成される場合、有効量で与えられたとみなされ得る。

【0060】

「個体」または「対象」は、哺乳動物、より好ましくはヒトである。また、哺乳動物には、限定されないが、家畜（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリなど）、競技用動物、ペット、霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、マウスおよびラットが含まれる。

10

【0061】

本明細書で使用されている場合、「ベクター」は、宿主細胞において1つまたは複数の目的の遺伝子または配列を送達し、好ましくはそれらを発現させることができる構築物を意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、ネイキッドDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性縮合剤と会合したDNAまたはRNA発現ベクター、リボソーム中に封入されたDNAまたはRNA発現ベクター、ならびに特定の真核生物細胞、例えば産生細胞が含まれるがこれらに限定されない。

【0062】

本明細書で使用されている場合、「発現制御配列」は、核酸の転写を指示する核酸配列を意味する。発現制御配列は、プロモーター、例えば、構成的もしくは誘導性プロモーター、またはエンハンサーであり得る。発現制御配列は、転写される核酸配列に作動可能に連結される。

20

【0063】

本明細書で使用されている場合、「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」は、活性成分と組み合わせた場合に、その成分が生物学的活性を保持することを可能にし、対象の免疫系と非反応性である、任意の材料を含む。例には、標準的な薬学的担体のいずれか、例えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルジョン、例えば、油／水エマルジョン、および種々の型の湿潤剤が含まれるがこれらに限定されない。エアロゾルまたは非経口投与のための好ましい希釈剤は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）または生理（0.9%）食塩水である。このような担体を含む組成物は、周知の従来法によって製剤化される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、A. Gennaro編、Mack Publishing Co.、Easton, PA、1990；およびRemington, The Science and Practice of Pharmacy 第20版 Mack Publishing、2000を参照のこと）。

30

【0064】

「エフェクター機能」という用語は、抗体のFc領域に起因する生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例には、限定されないが、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、Fc受容体結合、補体依存性細胞傷害（CDC）、ファゴサイトーシス、C1q結合、および細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）の下方制御が含まれる。例えば、米国特許第6,737,056号を参照のこと。このようなエフェクター機能は一般に、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わせられることを必要とし、このような抗体エフェクター機能を評価するための当該分野で公知の種々のアッセイを使用して評価され得る。エフェクター機能の例示的な測定法は、Fcγ3および／またはC1q結合によるものである。

40

【0065】

本明細書で使用されている場合、「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」とは、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的な細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラル

50

ルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し、次いで標的細胞の溶解を生じさせる、細胞媒介性の反応を指す。目的の分子のADCC活性は、米国特許第5,500,362号または米国特許第5,821,337号において記載されているものなどの、*in vitro*でのADCCアッセイを使用して評価され得る。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）およびNK細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性は、*in vivo*で、例えば、Clynesら、1998、PNAS（USA）、95:652～656ページにおいて開示されているものなどの動物モデルにおいて評価され得る。

【0066】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」とは、補体の存在下での標的の溶解を指す。補体活性化経路は、同族抗原と複合体化した分子（例えば、抗体）への、補体系の最初の成分（C1q）の結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods、202:163ページ（1996）に記載されているようなCDCアッセイが実施され得る。

【0067】

「 k_{on} 」または「 k_a 」という用語は、本明細書で使用されている場合、抗原への抗体の会合についての速度定数を指す。具体的には、速度定数（ k_{on} または k_a および k_{off} または k_d ）および平衡解離定数は、抗体全体（すなわち、二価）およびモノマータンパク質を使用して測定される。

【0068】

「 k_{off} 」または「 k_d 」という用語は、本明細書で使用されている場合、抗体／抗原複合体からの抗体の解離についての速度定数を指す。

「 K_D 」という用語は、本明細書で使用されている場合、抗体－抗原相互作用の平衡解離定数を指す。

【0069】

本明細書での「約」値またはパラメーターに対する言及は、その値またはパラメーター自体に関する態様を含む（および記述する）。例えば、「約X」に言及する記述は、「X」の記述を含む。数的範囲は、その範囲を規定する数字を含む。一般に言って、「約」という用語は、変数の示された値、および示された値の実験誤差内（例えば、平均についての95%信頼区間内）または示された値の10パーセント以内のいずれか大きい方の、変数の全ての値を指す。「約」という用語が、期間（年、月、週、日など）の文脈内で使用される場合、「約」という用語は、その期間に、次の下位の期間の量を1つ分加えたもしくは引いた期間を意味し（例えば、約1年は、11～13カ月を意味し；約6カ月は、6カ月プラスもしくはマイナス1週間を意味し；約1週間は、6～8日間を意味する；など）、または示された値の10パーセント以内のいずれか大きい方を意味する。

【0070】

「免疫エフェクター細胞エンハンサー」または「IECエンハンサー」という用語は、哺乳動物の免疫エフェクター細胞の1種または複数の型の数、品質、または機能を増加または増強することができる物質を指す。免疫エフェクター細胞の例には、細胞溶解性CD8 T細胞、CD4 T細胞、NK細胞、およびB細胞が含まれる。

【0071】

「免疫モジュレーター」という用語は、宿主哺乳動物の自然、液性または細胞性免疫系のいずれかの成分の免疫応答（本明細書に記載されているような）または働きを変更（例えば、阻害、減少、増加、増強、または刺激）することができる物質を指す。したがって、「免疫モジュレーター」という用語は、本明細書に定義されている「免疫エフェクター細胞エンハンサー」および本明細書に定義されている「免疫抑制性細胞阻害剤」、ならびに哺乳動物の免疫系の他の成分に影響を与える物質を包含する。

【0072】

「免疫応答」という用語は、自然免疫応答（例えば、Toll受容体シグナル伝達カス

10

20

30

40

50

ケードの活性化)、細胞媒介性免疫応答(例えば、抗原特異的T細胞などのT細胞、および免疫系の非特異的細胞によって媒介される応答)、および液性免疫応答(例えば、抗体の生成ならびに血漿、リンパ液および/または組織液への分泌などの、B細胞によって媒介される応答)などの、宿主哺乳動物の免疫系による特定の物質(抗原または免疫原など)に対するいずれかの検出可能な応答を指す。

【0073】

「免疫原性」という用語は、単独であれ担体に連結された場合であれ、アジュバントの存在または非存在下での、特定の抗原に対する、免疫応答を引き起こす、誘発する、刺激する、もしくは誘導する、または既存の免疫応答を好転する、増強する、増加する、もしくは延長する物質の能力を指す。

10

【0074】

「免疫抑制性細胞阻害剤」または「ISC阻害剤」という用語は、哺乳動物の免疫抑制性細胞の数または機能を低減または抑制することができる物質を指す。免疫抑制性細胞の例には、調節性T細胞(「Treg」)、骨髄系由来サプレッサー細胞、および腫瘍関連マクロファージが含まれる。

【0075】

「皮内投与」または「皮内投与される」という用語は、ヒトを含む哺乳動物に物質を投与する文脈では、哺乳動物の皮膚の真皮層中への物質の送達を指す。哺乳動物の皮膚は、表皮層、真皮層、および皮下層から構成される。表皮は皮膚の外層である。皮膚の中間層である真皮は、神経終末、汗腺および油(皮脂)腺、毛包、ならびに血管を含有する。皮下層は、より大きい血管および神経を収容する脂肪および結合組織から構成される。皮内投与とは対照的に、「皮下投与」とは、皮下層中への物質の投与を指し、「局所投与」とは、皮膚の表面上への物質の投与を指す。

20

【0076】

「新生物性障害」という用語は、細胞が、異常に高い制御されない速度で増殖し、この速度が、周囲の正常組織の速度を超え、その速度と協調されない、状態を指す。これは通常、「腫瘍」として公知の固形の病変または塊を生じる。この用語は、良性および悪性の新生物性障害を包含する。「悪性新生物性障害」という用語は、本開示で「がん」という用語と相互交換可能に使用され、身体中の他の位置に腫瘍細胞が広がる能力(「転移」として公知)を特徴とする新生物性障害を指す。「良性新生物性障害」という用語は、腫瘍細胞が転移する能力を欠く新生物性障害を指す。

30

【0077】

「予防すること」または「予防する」という用語は、(a)障害が発生しないようにすること、または(b)障害の発症もしくは障害の症状の発症を遅延させることを指す。

「腫瘍関連抗原」または「TAA」という用語は、腫瘍細胞によって特異的に発現される、または同じ組織型の非腫瘍細胞によって発現される頻度もしくは密度よりも、腫瘍細胞によってより高い頻度もしくは密度で発現される、抗原を指す。腫瘍関連抗原は、宿主によって通常は発現されない抗原であり得る；これらは、宿主によって通常発現される分子の、突然変異した、トランケートされた、ミスフォールディングした、もしくは他の形で異常な顕在化であり得る；これらは、通常発現されるが異常に高いレベルで発現される分子と同一であり得る；またはこれらは、異常である状況もしくは環境において発現され得る。腫瘍関連抗原は、例えば、タンパク質もしくはタンパク質断片、複雑な炭水化物、ガングリオシド、ハプテン、核酸、またはこれらもしくは他の生体分子の任意の組合せであり得る。

40

【0078】

「ワクチン」という用語は、哺乳動物における特定の抗原に対する免疫応答を誘発するための、哺乳動物への投与のための免疫原性組成物を指す。ワクチンは典型的に、疾患を引き起こす微生物または腫瘍細胞などの免疫応答の標的に類似するか、または由来する薬剤(「抗原」または「免疫原」として知られている)を含有する。がんなどの腫瘍の処置を意図するワクチンは典型的に、標的腫瘍上に見出されるTAAに由来し、標的腫瘍上の

50

T A Aに対する免疫原性を誘発することができる抗原を含有する。

【0079】

態様が「含む」という言葉を用いて本明細書に記載されている場合には、「～からなる」および／または「～から本質的になる」の用語で記載されている他の点では類似の態様もまた提供されることが理解される。

【0080】

本発明の側面または態様が、マーカッシュ群または選択肢の他のグループ分けの観点から記載されている場合、本発明は、全体として列挙された群全体だけでなく、その群の各メンバーを個々に、および主群の全ての可能な下位群、群メンバーのうちの1つまたは複数が存在しない主群もまた包含する。本発明はまた、特許請求された発明中の群メンバーのいずれかのうちの1つまたは複数の明示的な排除も想定する。

【0081】

特に定義しない限り、本明細書で使用されている全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有する。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配する。本明細書および特許請求の範囲を通じて、単語「含む (comprise)」またはバリエーション、例えば、「含む (comprises)」もしくは「含んでいる (comprising)」は、述べられた整数または整数の群を含むが、任意の他の整数または整数の群を排除しないことを意味すると理解される。文脈が他を要求しない限り、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。用語「例えば (e.g.)」または「例えば (for example)」の後の任意の例は、徹底的でも限定的でもない意味である。

【0082】

例示的な方法および材料が本明細書に記載されているが、本明細書に記載されている方法および材料と類似または等価な方法および材料もまた、本発明の実施または試験において使用され得る。材料、方法および例は、例示に過ぎず、限定を意図しない。

I L-15 バリエーション

実施例の段落下の表1～2に例示されているように、野生型ヒト I L-15 ポリペプチドまたは野生型 I L-15 受容体アルファ- I L-15 融合ポリペプチドと比較して、I L-15 受容体アルファ (C D 2 1 5) への結合が減少しているかもしくはそれと結合せず、ならびに／または I L-15 と、I L-2 受容体ベータ (C D 1 2 2) および共通ガンマ鎖 (C D 1 3 2) から構成される、そのシグナル伝達受容体との相互作用が低減している I L-15 バリエーション (例えば、ヒト I L-15 バリエーション) が本明細書に提供される。

【0083】

一つの側面では、本発明は、配列番号1のa) V 4 9 および I 5 1 位またはb) V 4 9、I 5 0、および S 5 1 位においてアミノ酸置換を含み、配列番号1の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 5 3、G 5 5、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、L 9 1、M 1 0 9、および／または I 1 1 1 位において1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、単離されたヒトインターロイキン15 (I L-15) バリエーションであって、I L-15 バリエーションが、野生型ヒト I L-15 ポリペプチドまたは野生型 I L-15 受容体アルファ- I L-15 融合ポリペプチドと比較して、ヒト I L-15 受容体アルファ (I L-15 R α) およびヒト I L-2 受容体ベータ／ガンマ (I L-2 R $\beta \gamma$) への結合が減少しているかまたはそれらと結合せず、V 4 9 位におけるアミノ酸置換がグリコシル化されている、単離されたヒトインターロイキン15 (I L-15) バリエーションを提供する。

【0084】

I L-15 バリエーションのグリコシル化は典型的にN-結合型またはO-結合型のいずれかである。N-結合型とは、炭水化物部分のアスパラギン残基の側鎖への付着を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-トレオニン、およびアスパラギン-X-システイン (ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸である) は、アス

パラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的付着のための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が生じる。O-結合型グリコシル化とは、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの付着を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもまた、使用され得る。

【0085】

したがって、一部の態様では、IL-15バリエーションはV49Nにおけるアミノ酸置換を含み、V49Nはグリコシル化されている。一部の態様では、配列番号1のE53および/またはE89におけるアミノ酸置換もまた、グリコシル化されている。

10

【0086】

一部の態様では、IL-15バリエーションは、a) V49、I50、S51、N4、D30、およびE64；b) V49、I50、S51、N4、D30、E64、およびI68；c) V49、I50、S51、N4、D30、E64、M109；d) V49、I50、S51、N4、D30、E64、I68、およびM109；e) V49、I50、S51、D30、E64、およびI68；f) V49、I50、S51、D30、E64、M109；g) V49、I50、S51、D30、E64、I68、およびM109；h) N1、V49、I50、およびS51；i) N4、V49、I50、およびS51；j) S7、V49、I50、およびS51；k) K10、V49、I50、およびS51；l) K11、V49、I50、およびS51；m) S29、V49、I50、およびS51；n) V31、V49、I50、およびS51；o) H32、V49、I50、およびS51；p) V49、I50、S51、およびE64；q) V49、I50、S51、およびI68；r) V49、I50、S51、およびL69；s) V49、I50、S51、およびI111；t) N4、V49、I50、S51、およびE64；u) N1、D30、V49、I50、およびS51；v) N4、D30、V49、I50、およびS51；w) S7、D30、V49、I50、およびS51；x) K10、D30、V49、I50、およびS51；y) K11、D30、V49、I50、およびS51；z) S29、D30、V49、I50、およびS51；aa) D30、V49、I50、S51、およびE64；bb) D30、V49、I50、S51、およびI68；cc) D30、V49、I50、S51、およびL69；ならびにdd) D30、V49、I50、S51、およびI111からなる群から選択される位置において配列番号1のアミノ酸置換を含む。

20

30

【0087】

一部の態様では、IL-15バリエーションは、a) V49N、V49K、V49E、V49H、V49QもしくはV49R；b) I50AもしくはI50G；c) S51T；d) N1K、N1G、N1Q、N1R、N1E、N1A、もしくはN1D；e) N4K、N4G、N4A、N4S、N4D、N4E、N4I、N4L、N4R、N4T、N4W、もしくはN4Q；f) S7E、S7G、S7D、S7K、S7N、S7R、S7H、もしくはS7T；g) K10A、K10S、K10E、K10L、K10M、K10D、もしくはK10G；h) K11D、K11S、もしくはK11W；i) D30N；j) E64Q、E64K、E64A、E64S、E64N、E64H、E64T、もしくはE64R；k) E53N；l) G55SもしくはG55T；m) E89N；n) L91SもしくはL91T；o) Y26K、Y26R、もしくはY26H；p) S29N；q) V31S、V31D、もしくはV31K；r) H32G；s) I68S、I68A、I68R、I68T、I68K、I68N、I68M、I68F、I68Y、I68E、もしくはI68H；t) L69A、L69S、L69D、L69T、L69M、L69G、L69Q、L69I、L69E、もしくはL69V；u) M109A、M109S、M109D、もしくはM109K；および/またはv) I111A、I111K、I111S、もしくはI111Dにおいて1つまたは複数の特定の置換を含むアミノ酸置換を含む。一部の態様では、IL-15バリエーションは、a) N4K、D30N、V49N、I50A、S51T、およ

40

50

び E 6 4 Q ; b) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、および S 5 1 T ; c) D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q ; d) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q ; e) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、および S 5 1 T ; f) V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q ; ならびに g) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む。

【0088】

別の側面では、配列番号 1 の E 4 6 および V 4 9 位におけるアミノ酸置換、ならびに配列番号 1 の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、D 2 2、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 5 3、G 5 5、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、E 9 3、M 1 0 9 および／または I 1 1 1 位における少なくとも 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む、単離されたヒトインターロイキン 1 5 (I L - 1 5) バリエントであって、I L - 1 5 バリエントが、ヒト I L - 1 5 受容体アルファ (I L - 1 5 R α) と結合せず、野生型ヒト I L - 1 5 ポリペプチドまたは野生型 I L - 1 5 受容体アルファ I L - 1 5 融合ポリペプチドと比較して、ヒト I L - 2 受容体ベータ／ガンマ (I L - 2 R $\beta \gamma$) への結合が減少している、単離されたヒトインターロイキン 1 5 (I L - 1 5) バリエントが提供される。

【0089】

一部の態様では、I L - 1 5 バリエントは、a) N 1、E 4 6、および V 4 9 ; b) N 4、E 4 6、および V 4 9 ; c) S 7、E 4 6、および V 4 9 ; d) K 1 0、E 4 6、および V 4 9 ; e) K 1 1、E 4 6、および V 4 9 ; f) S 2 9、E 4 6、および V 4 9 ; g) V 3 1、E 4 6、および V 4 9 ; h) H 3 2、E 4 6、および V 4 9 ; i) E 4 6、V 4 9、および E 6 4 ; j) E 4 6、V 4 9、および I 6 8 ; k) E 4 6、V 4 9、および L 6 9 ; l) E 4 6、V 4 9、および I 1 1 1 ; m) N 4、E 4 6、V 4 9、および E 6 4 ; n) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、および E 6 4 ; o) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、E 6 4、および I 6 8 ; p) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、E 6 4、および M 1 0 9 ; q) E 4 6、V 4 9、N 4、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9 ; r) N 1、D 3 0、E 4 6、および V 4 9 ; s) N 4、D 3 0、E 4 6、および V 4 9 ; t) S 7、D 3 0、E 4 6、および V 4 9 ; u) K 1 0、D 3 0、E 4 6、および V 4 9 ; v) K 1 1、D 3 0、E 4 6、および V 4 9 ; w) S 2 9、D 3 0、E 4 6、および V 4 9 ; x) D 3 0、E 4 6、V 4 9、および E 6 4 ; y) D 3 0、E 4 6、V 4 9 R、および I 6 8 ; z) D 3 0、E 4 6、V 4 9 R、および L 6 9 ; a a) D 3 0、E 4 6、V 4 9 R、および I 1 1 1 ; b b) N 1、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9 ; c c) N 4、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9 ; d d) S 7、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9 ; e e) K 1 0、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9 ; f f) K 1 1、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および M 1 0 9 ; g g) D 3 0、E 4 6、V 4 9、E 6 4、および M 1 0 9 ; h h) D 3 0、E 4 6、V 4 9、I 6 8、および M 1 0 9 ; i i) D 3 0、E 4 6、V 4 9、L 6 9 および M 1 0 9 ; j j) D 3 0、E 4 6、V 4 9、M 1 0 9、および I 1 1 1 ; k k) D 3 0、E 4 6、V 4 9、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9 ; l l) E 4 6、V 4 9、D 3 0、E 6 4、および I 6 8 ; m m) E 4 6、V 4 9、E 6 4、および M 1 0 9 ; n n) E 4 6、V 4 9、D 3 0、E 6 4、I 6 8、および M 1 0 9 ; o o) D 2 2、Y 2 6、V 4 9、E 4 6、E 5 3、E 8 9、および E 9 3 ; ならびに p p) N 1、D 3 0、E 4 6、V 4 9、および E 6 4 からなる群から選択される位置において配列番号 1 におけるアミノ酸置換を含む。

【0090】

一部の態様では、I L - 1 5 バリエントは、a) N 1 Q、N 1 K、N 1 R、N 1 E、N 1 A、N 1 D、もしくは N 1 G ; b) N 4 K、N 4 G、N 4 A、N 4 S、N 4 D、N 4 E、N 4 R、N 4 T、N 4 I、N 4 L、N 4 W、もしくは N 4 Q ; c) S 7 E、S 7 G、S 7 D、S 7 K、S 7 N、S 7 R、S 7 H、もしくは S 7 T ; d) K 1 0 D、K 1 0 A、K 1 0 S、K 1 0 E、K 1 0 L、K 1 0 M、K 1 0 D、もしくは K 1 0 G ; e) K 1 1 D、K 1 1 S、もしくは K 1 1 W ; f) D 2 2 N ; g) Y 2 6 K、Y 2 6 R、もしくは Y 2 6

H ; h) S 2 9 N ; i) D 3 0 N ; j) V 3 1 S、V 3 1 D、もしくはV 3 1 K ; k) H 3 2 G ; l) E 4 6 GもしくはE 4 6 Q ; m) V 4 9 N、V 4 9 K、もしくはV 4 9 R、V 4 9 E、V 4 9 H、もしくはV 4 9 Q ; n) E 5 3 Q ; o) G 5 5 SもしくはG 5 5 T ; p) E 6 4 Q、E 6 4 K、E 6 4 A、E 6 4 S、E 6 4 N、E 6 4 H、E 6 4 T、もしくはE 6 4 R ; q) I 6 8 S、I 6 8 A、I 6 8 R、I 6 8 T、I 6 8 K、I 6 8 N、I 6 8 M、I 6 8 F、I 6 8 Y、I 6 8 E、もしくはI 6 8 H ; r) L 6 9 S、L 6 9 A、L 6 9 D、L 6 9 T、L 6 9 M、L 6 9 G、L 6 9 Q、L 6 9 I、L 6 9 E、もしくはL 6 9 V ; s) E 8 9 Q ; t) E 9 3 Q ; u) M 1 0 9 A、M 1 0 9 S、M 1 0 9 S、もしくはM 1 0 9 K ; および／またはv) I 1 1 1 A、I 1 1 1 K、I 1 1 1 S、もしくはI 1 1 1 Dにおいて1つまたは複数の特定の置換を含むアミノ酸置換を含む。一部の態様では、I L-15バリエーションは、a) N 1 K、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; b) N 4 K、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; c) N 4 Q、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; d) S 7 T、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; e) V 3 1 S、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; f) V 3 1 K、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; g) E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q ; h) E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 K ; i) N 4 Q、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q ; j) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; k) N 1 K、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; l) N 1 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; m) N 4 G、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; n) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; o) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; p) S 7 E、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; q) S 7 G、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; r) S 7 T、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; s) K 1 0 D、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; t) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 A ; u) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q ; v) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 K ; w) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびI 6 8 S ; x) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびI 6 8 K ; y) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 K ; z) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 K ; a a) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q ; b b) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Q ; c c) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびI 6 8 S ; d d) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、E 6 4 Q、およびI 6 8 S ; e e) N 1 A、D 3 0 N、E 4 6 G、およびV 4 9 R ; ならびにf f) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、およびE 6 4 Qからなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む。

【0091】

一部の態様では、I L-15バリエーションは、配列番号84または85のアミノ酸配列を含む。

別の側面では、配列番号1のN 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、D 2 2、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 4 6、E 5 3、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、E 9 3、M 1 0 9、および／またはI 1 1 1位において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む単離されたヒトI L-15バリエーションであって、I L-15バリエーションが、野生型ヒトI L-15ポリペプチドまたは野生型I L-15受容体アルファ-I L-15融合ポリペプチドと比較して、ヒトI L-15受容体アルファ(I L-15 R α)および／またはヒトI L-2受容体ベータ(I L-2 R β)および／またはI L-2受容体ガンマ(I L-2 R γ)への結合が減少しているかまたはそれらと結合しない、単離されたヒトI L-15バリエーションが提供される。例えば、特定の置換には、限定されないが、N 1 K、N 4 K、N 4 Q、S 7 T、K 1 0 S、K 1 1 S、D 2 2 N、Y 2 6 F、D 3 0 N、V 3 1 S、H 3 2 G、M 1 0 9 A、および／またはI 1 1 1 Aが含まれ得る。

【0092】

一部の態様では、単離されたヒトI L-15バリエーションは、D 2 2 N、Y 2 6 F、E 4 6 Q、E 5 3 Q、E 8 9 Q、およびE 9 3 Q位(例えば、配列番号76を参照のこと)においてアミノ酸置換を含み、I L-15バリエーションが、野生型ヒトI L-15ポリペプチドと比較して、ヒトI L-15受容体アルファ(I L-15 R α)および／またはヒトI

IL-2 受容体ベータ (IL-2R β) および／または IL-2 受容体ガンマ (IL-2R γ) への結合が減少しているかまたはそれらと結合しない。

【0093】

別の側面では、配列番号 93 に示されるアミノ酸配列を含む単離されたヒト IL-15 バリエントが提供される。一部の態様では、IL-15 バリエントは膜貫通ドメインをさらに含む。

IL-15 融合タンパク質

IL-15 受容体アルファ (CD215) への結合が減少しているかまたはそれと結合せず、IL-15 と、IL-2 受容体ベータ (CD122) および共通ガンマ鎖 (CD132) から構成される、そのシグナル伝達受容体との相互作用が低減している、IL-15 融合タンパク質 (例えば、抗体-IL-15 融合タンパク質) が本明細書において提供される。このような IL-15 融合タンパク質は、末梢曝露 (例えば、主要な作用部位である NK 細胞) を最低限にし、したがって毒性を最低限にしながら、所望の細胞型にサイトカインを送達することができる。さらに、本発明の IL-15 融合タンパク質は、ナチュラルキラー (NK) 細胞よりもヒト末梢 CD8⁺ T 細胞において下流のバイオマーカー pSTAT5 を優先的に活性化し、ヒト CD8 腫瘍浸潤 T リンパ球 (TIL) の強力かつ優先的な活性化を有する。したがって、一部の態様では、IL-15 バリエントは、抗原特異的腫瘍常在 CD8⁺ 細胞に対するマーカーとして作用する PD-1 抗体に結合することができ、それによって抗腫瘍効力を最大化し、末梢免疫細胞サブセットへの曝露を最小化する。

【0094】

一つの側面では、1) Fc ドメインを含む抗体；および b) IL-15 バリエントが抗体の Fc ドメインと共有結合している、本明細書に記載されている IL-15 バリエントのいずれか 1 つを含む単離された融合タンパク質が提供される。

【0095】

一部の態様では、1) Fc ドメインを含む抗体；ならびに b) 配列番号 1 の a) V49 および I51 位または b) V49、I50、および S51 位においてアミノ酸置換を含むヒトインターロイキン 15 (IL-15) バリエントを含む単離された融合タンパク質であって、配列番号 1 の V49 位におけるアミノ酸置換がグリコシル化されており、配列番号 1 の N1、N4、S7、K10、K11、Y26、S29、D30、V31、H32、E53、G55、E64、I68、L69、E89、L91、M109、および／または I111 位において 1 つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含み、IL-15 バリエントが抗体の Fc ドメインと共有結合し、Fc ドメインが、野生型 Fc と比較して、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を有さない、単離された融合タンパク質が提供される。一部の態様では、IL-15 バリエントは V49N においてアミノ酸置換を含み、V49N がグリコシル化されている。一部の態様では、配列番号 1 の E53 および／または E89 におけるアミノ酸置換もまた、グリコシル化されている。

【0096】

一部の態様では、IL-15 融合タンパク質は、Fc ドメインを含む抗体を含み、IL-15 バリエントは、a) V49、I50、S51、N4、D30、および E64；b) V49、I50、S51、N4、D30、E64、および I68；c) V49、I50、S51、N4、D30、E64、M109；d) V49、I50、S51、N4、D30、E64、I68、および M109；e) V49、I50、S51、D30、E64、および I68；f) V49、I50、S51、D30、E64、M109；g) V49、I50、S51、D30、E64、I68、および M109；h) N1、V49、I50、および S51；i) N4、V49、I50、および S51；j) S7、V49、I50、および S51；k) K10、V49、I50、および S51；l) K11、V49、I50、および S51；m) S29、V49、I50、および S51；n) V31、V49、I50、および S51；o) H32、V49、I50、および S51；p) V49、I5

0、S 5 1、および E 6 4；q) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 6 8；r) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および L 6 9；s) V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 1 1 1；t) N 4、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4；u) N 1、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；v) N 4、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；w) S 7、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；x) K 1 0、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；y) K 1 1、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；z) S 2 9、D 3 0、V 4 9、I 5 0、および S 5 1；a a) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および E 6 4；b b) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 6 8；c c) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および L 6 9；ならびに d d) D 3 0、V 4 9、I 5 0、S 5 1、および I 1 1 1 からなる群から選択される位置において配列番号 1 のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、I L ー 1 5 バリエーションは、a) V 4 9 N、V 4 9 K、V 4 9 E、V 4 9 H、V 4 9 Q もしくは V 4 9 R；b) I 5 0 A もしくは I 5 0 G；c) S 5 1 T；d) N 1 K、N 1 G、N 1 Q、N 1 R、N 1 E、N 1 A、もしくは N 1 D；e) N 4 K、N 4 G、N 4 A、N 4 S、N 4 D、N 4 E、N 4 I、N 4 L、N 4 R、N 4 W、N 4 T、もしくは N 4 Q；f) S 7 E、S 7 G、S 7 D、S 7 K、S 7 N、S 7 R、S 7 H、もしくは S 7 T；g) K 1 0 A、K 1 0 S、K 1 0 E、K 1 0 L、K 1 0 M、K 1 0 D、もしくは K 1 0 G；h) K 1 1 D、K 1 1 S、もしくは K 1 1 W；i) D 3 0 N；j) E 6 4 Q、E 6 4 K、E 6 4 A、E 6 4 S、E 6 4 N、E 6 4 H、E 6 4 T、もしくは E 6 4 R；k) E 5 3 N；l) G 5 5 S もしくは G 5 5 T；m) E 8 9 N；n) L 9 1 S もしくは L 9 1 T；o) Y 2 6 K、Y 2 6 R、もしくは Y 2 6 H；p) S 2 9 N；q) V 3 1 S、V 3 1 D、もしくは V 3 1 K；r) H 3 2 G；s) I 6 8 S、I 6 8 A、I 6 8 R、I 6 8 T、I 6 8 K、I 6 8 N、I 6 8 M、I 6 8 F、I 6 8 Y、I 6 8 E、もしくは I 6 8 H；t) L 6 9 A、L 6 9 S、L 6 9 D、L 6 9 T、L 6 9 M、L 6 9 G、L 6 9 Q、L 6 9 I、L 6 9 E、もしくは L 6 9 V；u) M 1 0 9 A、M 1 0 9 S、M 1 0 9 D、もしくは M 1 0 9 K；および／または v) I 1 1 1 A、I 1 1 1 K、I 1 1 1 S、もしくは I 1 1 1 D において 1 つまたは複数の特定の置換を含むアミノ酸置換を含む。

【0097】

一部の態様では、1) F c ドメインを含む抗体；ならびに b) 抗体の F c ドメインと共有結合している I L ー 1 5 バリエーションを含む単離された融合タンパク質であって、I L ー 1 5 バリエーションが、a) N 4 K、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；b) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、および S 5 1 T；c) D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；d) N 4 Q、D 3 0 N、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；e) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、および S 5 1 T；f) V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q；ならびに g) N 4 Q、V 4 9 N、I 5 0 A、S 5 1 T、および E 6 4 Q からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、単離された融合タンパク質が提供される。

【0098】

別の側面では、1) F c ドメインを含む抗体；ならびに b) 配列番号 1 の E 4 6 および V 4 9 位におけるアミノ酸置換、ならびに配列番号 1 の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、D 2 2、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 5 3、G 5 5、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、E 9 3、M 1 0 9 および／または I 1 1 1 位における少なくとも 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトインターロイキン 1 5 (I L ー 1 5) バリエーションを含む、単離された融合タンパク質であって、I L ー 1 5 バリエーションが抗体の F c ドメインと共有結合し、F c ドメインが、野生型 F c と比較して、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性を有さない、単離された融合タンパク質が提供される。

【0099】

一部の態様では、I L ー 1 5 融合タンパク質は、F c ドメインを含む抗体を含み、I L ー 1 5 バリエーションは、a) N 1、E 4 6、および V 4 9；b) N 4、E 4 6、および V 4 9；c) S 7、E 4 6、および V 4 9；d) K 1 0、E 4 6、および V 4 9；e) K 1 1

10

20

30

40

50

、E46、およびV49；f) S29、E46、およびV49；g) V31、E46、およびV49；h) H32、E46、およびV49；i) E46、V49、およびE64；j) E46、V49、およびI68；k) E46、V49、およびL69；l) E46、V49、およびI111；m) N4、E46、V49、およびE64；n) E46、V49、N4、D30、およびE64；o) E46、V49、N4、D30、E64、およびI68；p) E46、V49、N4、D30、E64、およびM109；q) E46、V49、N4、D30、E64、I68、およびM109；r) N1、D30、E46、およびV49；s) N4、D30、E46、およびV49；t) S7、D30、E46、およびV49；u) K10、D30、E46、およびV49；v) K11、D30、E46、およびV49；w) S29、D30、E46、およびV49；x) D30、E46、V49、およびE64；y) D30、E46、V49R、およびI68；z) D30、E46、V49R、およびL69；aa) D30、E46、V49R、およびI111；bb) N1、D30、E46、V49、およびM109；cc) N4、D30、E46、V49、およびM109；dd) S7、D30、E46、V49、およびM109；ee) K10、D30、E46、V49、およびM109；ff) K11、D30、E46、V49、およびM109；gg) D30、E46、V49、E64、およびM109；hh) D30、E46、V49、I68、およびM109；ii) D30、E46、V49、L69およびM109；jj) D30、E46、V49、M109、およびI111；kk) D30、E46、V49、E64、I68、およびM109；ll) E46、V49、D30、E64、およびI68；mm) E46、V49、E64、およびM109；nn) E46、V49、D30、E64、I68、およびM109；oo) D22、Y26、V49、E46、E53、E89、およびE93；ならびにpp) N1、D30、E46、V49、およびE64からなる群から選択される位置において配列番号1のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、IL-15バリエーションは、a) N1Q、N1K、N1R、N1E、N1A、N1D、もしくはN1G；b) N4K、N4G、N4A、N4S、N4D、N4E、N4L、N4I、N4R、N4T、N4W、もしくはN4Q；c) S7E、S7G、S7D、S7K、S7N、S7R、S7H、もしくはS7T；d) K10D、K10A、K10S、K10E、K10L、K10M、K10D、もしくはK10G；e) K11D、K11S、もしくはK11W；f) D22N；g) Y26K、Y26R、もしくはY26H；h) S29N；i) D30N；j) V31S、V31D、もしくはV31K；k) H32G；l) E46GもしくはE46Q；m) V49N、V49K、もしくはV49R、V49E、V49H、もしくはV49Q；n) E53Q；o) G55SもしくはG55T；p) E64Q、E64K、E64A、E64S、E64N、E64H、E64T、もしくはE64R；q) I68S、I68A、I68R、I68T、I68K、I68N、I68M、I68F、I68Y、I68E、もしくはI68H；r) L69S、L69A、L69D、L69T、L69M、L69G、L69Q、L69I、L69E、もしくはL69V；s) E89Q；t) E93Q；u) M109A、M109S、M109D、もしくはM109K；および／またはv) I111A、I111K、I111S、もしくはI111Dにおいて1つまたは複数の特定の置換を含むアミノ酸置換を含む。

【0100】

一部の態様では、1) Fcドメインを含む抗体；ならびにb) 抗体のFcドメインと共有結合しているIL-15バリエーションを含む単離された融合タンパク質であって、IL-15バリエーションが、a) N1K、E46G、およびV49R；b) N4K、E46G、およびV49R；c) N4Q、E46G、およびV49R；d) S7T、E46G、およびV49R；e) V31S、E46G、およびV49R；f) V31K、E46G、およびV49R；g) E46G、V49R、およびE64Q；h) E46G、V49R、およびE64K；i) N4Q、E46G、V49R、およびE64Q；j) N1G、D30N、E46G、およびV49R；k) N1K、D30N、E46G、およびV49R；l) N1Q、D30N、E46G、およびV49R；m) N4G、D30N、E46G、およびV49R；n) N4K、D30N、E46G、およびV49R；o) N4Q、D30N、

10

20

30

40

50

E 4 6 G、および V 4 9 R；p) S 7 E、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；q) S 7 G、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；r) S 7 T、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；s) K 1 0 D、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；t) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 A；u) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；v) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；w) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S；x) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 K；y) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；z) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 K；a a) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；b b) N 4 Q、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q；c c) N 4 K、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および I 6 8 S；d d) D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、E 6 4 Q、および I 6 8 S；e e) N 1 A、D 3 0 N、E 4 6 G、および V 4 9 R；ならびに f f) N 1 G、D 3 0 N、E 4 6 G、V 4 9 R、および E 6 4 Q からなる群から選択される位置においてアミノ酸置換を含む、単離された融合タンパク質が提供される。

10

【0101】

一部の態様では、単離された融合タンパク質は、配列番号 8 6、8 7、8 9、または 9 0 のアミノ酸配列を含む。

別の側面では、1) F c ドメインを含む抗体；ならびに b) 配列番号 1 の N 1、N 4、S 7、K 1 0、K 1 1、D 2 2、Y 2 6、S 2 9、D 3 0、V 3 1、H 3 2、E 4 6、E 5 3、E 6 4、I 6 8、L 6 9、E 8 9、E 9 3、M 1 0 9、および／または I 1 1 1 位において 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒト I L-1 5 バリエーションを含む、単離された融合タンパク質であって、I L-1 5 バリエーションが、抗体の F c ドメインと共有結合し、F c ドメインが、野生型 F c と比較して、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性が減少しているかまたは抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性を有さない、単離された融合タンパク質が提供される。一部の態様では、ヒト I L-1 5 バリエーションは、D 2 2 N、Y 2 6 F、E 4 6 Q、E 5 3 Q、E 8 9 Q、および E 9 3 Q 位 (例えば、配列番号 7 6 を参照のこと) においてアミノ酸置換を含み、抗体は抗 P D-1 抗体である。

20

【0102】

別の側面では、1) F c ドメインを含む I L-1 5 抗体；ならびに b) 配列番号 1 のヒトインターロイキン 1 5 (I L-1 5) タンパク質を含む、単離された融合タンパク質であって、I L 1 5 が抗体の F c ドメインと共有結合している、単離された融合タンパク質が提供される。

30

【0103】

一部の態様では、1 つまたは複数のポリペプチド (例えば、異種または相同配列) が、抗体と、本明細書に記載されている I L-1 5 融合タンパク質の I L-1 5 バリエーションとの間に挿入され得る。一部の態様では、ポリペプチドは、抗体のアミノ末端、カルボキシル末端、またはアミノ末端およびカルボキシル末端の両方において挿入またはコンジュゲートされ得る。一部の態様では、ポリペプチドは、図 1 A、1 B、1 C および 1 D に示されるように、抗体および I L-1 5 バリエーションをコンジュゲートするポリペプチドリンカーを含む。例えば、ポリペプチドリンカーは、配列番号 6、2 3、2 4、2 5、または 7 7 に示されるグリシン-セリン (G S)-リンカーである。

40

【0104】

一部の態様では、ポリペプチドは 1 つまたは複数のリンカーおよびタグを含む。ポリペプチドタグの例には、限定されないが、F L A G タグ、6 H i s タグ (すなわち、配列番号 2 7)、8 H i s タグ (すなわち、配列番号 2 6)、または A V I タグ (例えば、配列番号 7) が含まれる。

【0105】

ポリペプチドリンカーおよびポリペプチドタグを有する例示的なヒト I L-1 5 (h I L-1 5) バリエーションが以下に提供される。

h I L-1 5 V 4 9 R-G S-リンカー-8 x H i s-A v i タグ (配列番号 9)
N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V

50

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

h I L - 1 5 V 4 9 N / I 5 0 A / S 5 1 T - G S - リンカー - 8 x H i s - A v i タグ (配列番号 1 0)

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

h I L - 1 5 V 4 9 N / I 5 0 A / S 5 1 T / N 7 9 Q - G S - リンカー - 8 x H i s - A v i タグ (配列番号 1 1)

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

* 下線を引いた配列は、リンカー、8 X H i s、および A V I タグを表し、太字は h I L - 1 5 タンパク質配列上のアミノ酸突然変異を表す。

【0106】

本発明の I L - 1 5 融合タンパク質において有用な抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片 (例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、F c など)、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヘテロコンジュゲート抗体、一本鎖 (S c F v)、それらの突然変異体、抗体部分 (例えば、ドメイン抗体) を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、ならびに抗体のグリコシル化バリエーション、抗体のアミノ酸配列バリエーション、および共有結合により修飾された抗体を含む、必要とされる特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構造を包含し得る。抗体は、ネズミ、ラット、ヒト、または任意の他の起源 (キメラまたはヒト化抗体を含む) であってもよい。

【0107】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、I g G₁、I g G₂、I g G₂ Δ_a、I g G₄、I g G₄ Δ_b、I g G₄ Δ_c、I g G₄ S 2 2 8 P、I g G₄ Δ_b S 2 2 8 P、および I g G₄ Δ_c S 2 2 8 P からなる群から選択されるアイソタイプを有する。

【0108】

一部の態様では、記載されている I L - 1 5 融合タンパク質の抗体は F c ドメインを含む。一部の態様では、F c ドメインは、ヒト I g G 1、I g G 2、または I g G 4 であってもよい。

【0109】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒンジ領域における 2 2 3、2 2 5、および 2 2 8 位 (例えば、(C 2 2 3 E または C 2 2 3 R)、(E 2 2 5 R)、および (P 2 2 8 E または P 2 2 8 R))、ならびにヒト I g G 2 (配列番号 3) の C H 3 領域における 4 0 9 または 3 6 8 位 (例えば、K 4 0 9 R または L 3 6 8 E) (E U 番号付けスキーム) においてアミノ酸修飾を含む。一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は二重特異性抗体である。

【0110】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒンジ領域における 2 2 1 および 2 2 8 位 (例えば、(D 2 2 1 R または D 2 2 1 E) および (P 2 2 8 R または P 2 2 8 E))、ならびにヒト I g G 1 (配列番号 2) の C H 3 領域における 4 0 9 または 3 6 8 位 (例えば、K 4 0 9 R または L 3 6 8 E (E U 番号付けスキーム)) においてアミノ酸修飾を含む。一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は二重特異性抗体である。

【0111】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒト I g G 1 (配列番号 2) の C H 3 領域における 3 4 9、3 5 4、3 6 6、3 6 8、および / または 4 0 7 位 (E U 番号

10

20

30

40

50

付けスキーム)においてアミノ酸修飾を含む。例えば、アミノ酸修飾は、Y 3 4 9 C、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および／またはY 4 0 7 Vを含む。一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は二重特異性抗体である。

【0112】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒンジ領域における228位(例えば、(S 2 2 8 D、S 2 2 8 E、S 2 2 8 R、またはS 2 2 8 K))、およびヒトIgG4(配列番号4)のCH3領域における409または368位(例えば、R 4 0 9 K、R 4 0 9、またはL 3 6 8 E(EU番号付けスキーム))においてアミノ酸修飾を含む。一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は二重特異性抗体である。

【0113】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒトIgG2(配列番号3)の265位(例えば、D 2 6 5 A)、330位(例えば、A 3 3 0 S)、および331位(例えば、P 3 3 1 S)のうちの1つもしくは複数;またはヒトIgG1(配列番号2)の234、235、237、および／もしくは322位のうちの1つもしくは複数においてアミノ酸修飾を含む。一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒトIgG2の265位(例えば、D 2 6 5 A)、330位(例えば、A 3 3 0 S)、および331位(例えば、P 3 3 1 S)の各々においてアミノ酸修飾を含む。

【0114】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒトIgG1(配列番号2)の234位(例えば、L 2 3 4 A)、235位(例えば、L 2 3 5 A)、および237位(例えば、G 2 3 7 A)のうちの1つまたは複数においてアミノ酸修飾を含む。一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒトIgG1(配列番号2)の234位(例えば、L 2 3 4 A)、235位(例えば、L 2 3 5 A)、および237位(例えば、G 2 3 7 A)の各々においてアミノ酸修飾を含む。例えば、本明細書に記載されている抗体は配列番号88のアミノ酸配列を含む。

【0115】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒトIgG4(配列番号4)のアミノ酸修飾E 2 3 3 F 2 3 4 L 2 3 5からP 2 3 3 V 2 3 4 A 2 3 5(IgG_{4Δc})を含む。さらに別の態様では、アミノ酸修飾は、ヒトIgG₄(配列番号4)の欠失G 2 3 6(IgG_{4Δb})を有するE 2 3 3 F 2 3 4 L 2 3 5からP 2 3 3 V 2 3 4 A 2 3 5である。

【0116】

本発明のために使用される例示的な抗体には、限定されないが、以下に記載される配列が含まれる。

【0117】

10

20

30

【表 1】
表1.1

配列 番号/	配列
64/ CH1- ヒンジ CH2- CH3 of hlgG2Δa -D265A (下線:ヒ ンジ)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER <u>KCCVECP</u> PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65/ xhPD1(V K1-39)- 軽鎖 (太字: V-カップ; 下線:C- カップ)	<u>DIQMTQSPSSLSASV</u> GDRVITITCKSSQSLWDSGNQKNFLTWYQQKPGKA <u>PKLLIYWTSYRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS</u> SLQPEDFATYYCQNDYFY <u>PLTFGGGT</u> KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK <u>VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE <u>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
66/ xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- Bsp-R- アーム	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWM GNIYPGSSITNY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLTGTGFAYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCRKTHTCPRCPA PEAAGAPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74/ xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- 'ノブ'	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWM GNIYPGSSITNY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLTGTGFAYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGAPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0118】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、ヒトFcガンマ受容体に対して増加または減少した結合親和性を有し、免疫学的に不活性または部分的に不活性であり、例えば、補体媒介性溶解を誘発せず、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を刺激せず、もしくはミクログリアを活性しない；または以下：補体媒介性溶解を誘発すること、

10

20

30

40

50

A D C Cを刺激すること、もしくはミクログリアを活性化することのいずれか1つまたは複数において低減した活性（非修飾抗体と比較して）を有する修飾された定常領域を含む。定常領域の異なる修飾が、エフェクター機能の最適なレベルおよび／または組合せを達成するために使用され得る。例えば、M o r g a nら、*Immunology* 86:319~324ページ、1995；L u n dら、*J. Immunology* 157:4963~9ページ 157:4963~4969ページ、1996；I d u s o g i eら、*J. Immunology* 164:4178~4184ページ、2000；T a oら、*J. Immunology* 143:2595~2601ページ、1989；およびJ e f f e r i sら、*Immunological Reviews* 163:59~76ページ、1998を参照のこと。一部の態様では、定常領域は、*Eur. J. Immunol.*、1999、29:2613~2624ページ；P C T出願公開番号W O 99/058572に記載されているように修飾される。

10

【0119】

一部の態様では、抗体定常領域は、F cガンマ受容体ならびに補体および免疫系との相互作用を回避するように修飾され得る。このような抗体を調製するための技術は、W O 99/58572に記載されている。例えば、定常領域は、抗体がヒトにおける臨床試験および処置において使用される場合、免疫応答を回避するために、ヒト定常領域により類似するように操作され得る。例えば、米国特許第5,997,867号および同第5,866,692号を参照のこと。

【0120】

20

さらに他の態様では、定常領域はN-結合型グリコシル化のためにアグリコシル化されている。一部の態様では、定常領域は、定常領域におけるN-グリコシル化認識配列の一部である、オリゴ糖付着残基および／または隣接残基を突然変異させることによって、N-結合型グリコシル化のためにアグリコシル化されている。例えば、N-グリコシル化部位N297は、例えば、A、Q、K、またはHに突然変異され得る。T a oら、*J. Immunology* 143:2595~2601ページ、1989；およびJ e f f e r i sら、*Immunological Reviews* 163:59~76ページ、1998を参照のこと。一部の態様では、定常領域はN-結合型グリコシル化のためにアグリコシル化されている。定常領域は、N-結合型グリコシル化のために酵素的に（例えば、酵素P N G a s eによる炭水化物を除去すること）、またはグリコシル化欠損宿主細胞における発現によってアグリコシル化され得る。

30

【0121】

他の抗体修飾には、P C T出願公開番号W O 99/58572に記載されているように修飾された抗体が含まれる。これらの抗体は、標的分子に対する結合ドメインに加えて、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域の全てまたは一部と実質的に相同なアミノ酸配列を有するエフェクタードメインを含む。これらの抗体は、顕著な補体依存性溶解、または標的の細胞媒介性破壊を誘発することなく、標的分子に結合することができる。一部の態様では、エフェクタードメインは、F c R nおよび／またはF c γ R I I bに特異的に結合することができる。これらは典型的に、2つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖C H 2ドメインに由来するキメラドメインに基づく。このように修飾された抗体は、従来の抗体療法に対する炎症および他の有害反応を回避するために、長期抗体療法における使用に特に適している。

40

【0122】

一部の態様では、抗体は、非修飾抗体と比較して、F c R nに対する結合親和性が増加し、および／または血清半減期が増加した修飾された定常領域を含む。

本発明のI L-15融合タンパク質に使用される抗体には、限定されないが、抗C T L A-4抗体、抗C D 3抗体、抗C D 4抗体、抗C D 8抗体、抗4-1 B B抗体、抗P D-1抗体、抗P D-L 1抗体、抗T I M 3抗体、抗L A G 3抗体、抗T I G I T抗体、抗O X 40抗体、抗I L-7 Rアルファ（C D 127）抗体、抗I L-8抗体、抗I L-15抗体、抗H V E M抗体、抗B T L A抗体、抗C D 40抗体、抗C D 40 L抗体、抗C D 4

50

7 抗体、抗 C S F 1 R 抗体、抗 C S F 1 抗体、抗 M A R C O 抗体、抗 C X C R 4 抗体、抗 V E G F R 1 抗体、抗 V E G F R 2 抗体、抗 T N F R 1 抗体、抗 T N F R 2 抗体、抗 C D 3 二重特異性抗体、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 2 0、抗 H e r 2 抗体、抗 E G F R 抗体、抗 I C O S 抗体、抗 C D 2 2 抗体、抗 C D 5 2 抗体、抗 C C R 4 抗体、抗 C C R 8 抗体、抗 C D 2 0 0 R 抗体、抗 V I S G 4 抗体、抗 C C R 2 抗体、抗 L I L R b 2 抗体、抗 C X C R 4 抗体、抗 C D 2 0 6 抗体、抗 C D 1 6 3 抗体、抗 K L R G 1 抗体、抗 F L T 3 抗体、抗 B 7 - H 4 抗体、抗 B 7 - H 3 抗体、K L R G 1 抗体、抗 B T N 1 A 1 抗体、および抗 G I T R 抗体が含まれる。

【0123】

一部の態様では、I L - 1 5 融合タンパク質における抗体は P D - 1 抗体である。例えば、P D - 1 抗体は、(i) 配列番号 1 4、1 5、8 0、8 1、もしくは 9 1 のアミノ酸配列を含む V H 相補性決定領域 1 (C D R 1)、配列番号 1 6、1 7、8 2、もしくは 8 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および配列番号 1 8 もしくは 6 2 に示されるアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) 領域、ならびに / または配列番号 1 9 もしくは 3 1 に示されるアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 2 0 もしくは 3 2 に示されるアミノ酸配列を含む V L C D R 2、ならびに配列番号 2 1 もしくは 3 3 に示されるアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む。一部の態様では、P D - 1 抗体は、配列番号 1 2、3 4、7 8、もしくは 3 6 のアミノ酸配列を有する V H の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む V H 領域ならびに / または配列番号 1 3、3 5、7 9、もしくは 3 7 のアミノ酸配列を有する V L の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む V L 領域を含む。

【0124】

例示的な I L - 1 5 融合タンパク質には、限定されないが、以下に記載される配列が含まれる。I L - 1 5 バリエーションは太字であり、リンカーは下線を引いている。

【0125】

10

20

【表 2 - 1】

表1.2

配列番号/ 名称	配列
29/ xmPD1- hIL-15 NQ 突然変異体 (Eアーム)	EVQLVESGGGLVKPGGSLIELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSNFGTQTY TCNVDPHKPSNTKVDKTKVERKCEVECECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHINATLFTESDVHPSCCKVTAMKC FLLQLQVISLQSGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECKELEQ KNIKEFLQSFVHIVQMFINI (NQの突然変異はイタリックである)
38/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46G	EVQLVESGGGLVKPGGSLIELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSNFGTQTY TCNVDPHKPSNTKVDKTKVERKCEVECECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMK

10

20

【 0 1 2 6 】

【表 2 - 2】

	CFLGLQRI ~~S~~ LES ~~G~~ DASI ~~H~~ DTVEN ~~L~~ IILANNS ~~L~~ SSNGNV ~~T~~ ESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
39/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46G- E64Q- D30N	EVQLVESGGGLV ~~K~~ PGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDAKNTFLQMTSLRSED ~~T~~ AMYYCAKE SWGAYYDLWGQGT ~~T~~ TVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVT ~~V~~ SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ~~V~~ TPSSNFGTQTY TCNV ~~D~~ HKPSNTKVDK ~~T~~ VERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV ~~V~~ AVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLT ~~V~~ VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK ~~T~~ ISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKG ~~F~~ YPSDIAVEWESNGQPENNYK ~~T~~ TPPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSV ~~M~~ HEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANW ~~V~~ NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHP ~~S~~ CKVTAMK CFLGLQRI ~~S~~ LES ~~G~~ DASI ~~H~~ DTVQNLILANNS ~~L~~ SSNGNV ~~T~~ ESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
40/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46G- E64Q- I68S- D30N	EVQLVESGGGLV ~~K~~ PGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDAKNTFLQMTSLRSED ~~T~~ AMYYCAKE SWGAYYDLWGQGT ~~T~~ TVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVT ~~V~~ SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ~~V~~ TPSSNFGTQTY TCNV ~~D~~ HKPSNTKVDK ~~T~~ VERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV ~~V~~ AVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLT ~~V~~ VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK ~~T~~ ISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKG ~~F~~ YPSDIAVEWESNGQPENNYK ~~T~~ TPPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSV ~~M~~ HEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANW ~~V~~ NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQRI ~~S~~ LE SGDASI ~~H~~ DTV QNLISLANNS LSSNGNV ~~T~~ ES GCKE CEELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFINT
41/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46G- N4K- E64Q- D30N	EVQLVESGGGLV ~~K~~ PGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDAKNTFLQMTSLRSED ~~T~~ AMYYCAKE SWGAYYDLWGQGT ~~T~~ TVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVT ~~V~~ SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ~~V~~ TPSSNFGTQTY TCNV ~~D~~ HKPSNTKVDK ~~T~~ VERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV ~~V~~ AVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLT ~~V~~ VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK ~~T~~ ISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKG ~~F~~ YPSDIAVEWESNGQPENNYK ~~T~~ TPPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSV ~~M~~ HEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANW ~~V~~ KVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQRI ~~S~~ LE SGDASI ~~H~~ DTV QNLILANNS LSSNGNV ~~T~~ ES GCKEC EELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFINT
42/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46G- E64Q- I68S- D30N- M109A	EVQLVESGGGLV ~~K~~ PGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDAKNTFLQMTSLRSED ~~T~~ AMYYCAKE SWGAYYDLWGQGT ~~T~~ TVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVT ~~V~~ SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ~~V~~ TPSSNFGTQTY TCNV ~~D~~ HKPSNTKVDK ~~T~~ VERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV ~~V~~ AVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLT ~~V~~ VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK ~~T~~ ISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKG ~~F~~ YPSDIAVEWESNGQPENNYK ~~T~~ TPPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSV ~~M~~ HEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANW ~~V~~ NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQRI ~~S~~ LE SGDASI ~~H~~ DTV QNLISLANNS LSSNGNV ~~T~~ ES GCKE

10

20

30

40

【表 2 - 3】

	CEELEE KNIKEFLQSF VHIVQAFINT
43/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46G- E64Q- N4K- D30N- M109A	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWW AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWV KVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQRISLE SGDASIHDTV QNLIILANNS LSSNGNVTES GCKEC EELEE KNIKEFLQSF VHIVQAFINT
44/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46G- E64Q- D30N- M109A	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWW AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQRISLE SGDASIHDTV QNLIILANNS LSSNGNVTES GCKEC EELEE KNIKEFLQSF VHIVQAFINT
45/ xmPD1- hIL15_V 49R- Y26K	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWW AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWV NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLKTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQRISLES GDASIHDTV ENLIILANNS LSSNGNVTESGCKECEEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
46/ xmPD1- hIL15_V 49R- Y26K- E64Q- D30N	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWW AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWV NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLKTESNVHPSCKVTAMK CFLLELQRISLES GDASIHDTV QNLIILANNS LSSNGNVTESGCKECEEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINT

10

20

30

40

【表 2 - 4】

47/ xmPD1- hIL15_V 49K- Y26K	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLKTESDVHPSCVKVTAMK</u> <u>CFLLELQKISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE</u> <u>KNIKEFLQSFVHIVQMFINT</u>	10
48/ xmPD1- hIL15_V 49K- E46G	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMK</u> <u>CFLLELQKISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE</u> <u>KNIKEFLQSFVHIVQMFINT</u>	20
49/ xmPD1- hIL15Ra su- hIL15(E 64Q/D30 N)	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GTSATATPGAITCPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGT</u> <u>S SLTECVLNKA TNVAHWTTPS LKCIKDPALV HQRAPPSGG SGGGGS</u> <u>GGGS GGGGSGGNWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKV</u> <u>TAMKCF LLELQVISLE SGDASIHDTV QNLIILANNS LSSNGNVTES GCK</u> <u>ECEELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFINT</u>	30
50/ xmPD1- hIL15Ra su- hIL15(E 64Q/I68 S/D30N)	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GTSATATPGAITCPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGT</u> <u>S SLTECVLNKA TNVAHWTTPS LKCIKDPALV HQRAPPSGG SGGGGS</u>	40

【表 2 - 5】

	GGGS GGGGSGGNWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKV TAMKCF LLELQVISLE SGDASIHDTV QNLISLANNS LSSNGNVTES GCK ECELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFIN
51/ xmPD1- hIL15Ra su- hIL15(E 64Q/N4 K/D30N)	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GTSATATPGAITCPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGT</u> <u>S SLTECVLNKA TNVAHWTTTPS LKCIKDPALV HQRPAAPSGG SGGGGS</u> <u>GGGS GGGGSGGNWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKV</u> <u>TAMKCF LLELQVISLE SGDASIHDTV QNLISLANNS LSSNGNVTES GCK</u> <u>ECELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFIN</u>
52/ xmPD1- hIL15Ra su- hIL15(E 64Q/D30 N/M109 A)	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GTSATATPGAITCPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGT</u> <u>S SLTECVLNKA TNVAHWTTTPS LKCIKDPALV HQRPAAPSGG SGGGGS</u> <u>GGGS GGGGSGGNWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKV</u> <u>TAMKCF LLELQVISLE SGDASIHDTV QNLISLANNS LSSNGNVTES GCK</u> <u>ECELEE KNIKEFLQSF VHIVQAFIN</u>
53/ xmPD1- hIL15Ra su- hIL15(E 64Q/I68 S/D30N/ M109A)	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GTSATATPGAITCPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGT</u> <u>S SLTECVLNKA TNVAHWTTTPS LKCIKDPALV HQRPAAPSGG SGGGGS</u> <u>GGGS GGGGSGGNWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKV</u> <u>TAMKCF LLELQVISLE SGDASIHDTV QNLISLANNS LSSNGNVTES GCK</u> <u>ECELEE KNIKEFLQSF VHIVQAFIN</u>
54/ xmPD1- hIL15Ra su-	EVQLVESGGGLVKPGGSLLESCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTY

10

20

30

40

【 0 1 3 0 】

【表 2 - 6】

hIL15(E 64Q/N4 K/D30N/ M109A)	TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGAITCPPPMMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGT S SLTECVLNKA TNVAHWTPPS LKCIRDPALV HQRPAAPSGG SGGGGS GGGS GGGGSGGNWV KVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKV TAMKCF LLELQVISLE SGDASIHD TV QNLILANNS LSSNGNVTES GCK ECEEELE KNIKEFLQSF VHIVQAFINT
55/ xmPD1- hIL15_V 49R- E46Q	EVQLVESGGGLVKGPGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLQLQRISLES GDASIHD TVENLILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
56/ xmPD1- hIL15_V 49R- E53Q	EVQLVESGGGLVKGPGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQRISLQSGDASIHD TVENLILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
57/ xmPD1- hIL15_V 49R- E93Q	EVQLVESGGGLVKGPGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQRISLES GDASIHD TVENLILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEQ KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
58/ xmPD1- hIL15	EVQLVESGGGLVKGPGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD

10

20

30

40

【表 2 - 7】

NQ-2a (E46Q/E 93Q)	YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTVKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLQLQVISLQSGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEQ KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
59/ xmPD1- hIL15 NQ-2b (E46Q/E 53Q)	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSAAAGFTSSSYWMSSWRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTVKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLQLQVISLQSGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
60/ xmPD1- hIL15 NQ-2c (E53Q/E 93Q)	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSAAAGFTSSSYWMSSWRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTVKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLQLQVISLQSGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEQ KNIKEFLQSFVHIVQMFINT
61/ xmPD1- hIL15 NQ-3d (E46Q/E 53Q/E93 Q)	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSAAAGFTSSSYWMSSWRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSNFGTQTY TCNVDPKPSNTKVDKTVKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG GTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLQLQVISLQSGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELE QKNIKEFLQSFVHIVQMFINT
63/ xmPD-1- hIL-15 V49R	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSAAAGFTSSSYWMSSWRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSNFGTQTY

10

20

30

40

【表 2 - 8】

融合	TCNVDPKPSNTKVDKTVKCEVECEPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG <u>RTSATATPGANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK</u> <u>CFLLELQRIQISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEE</u> <u>KNIKEFLQSFVHIVQMFINT</u>
67/ xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- Bsp-E- アーム- 3GS- hIL15Ra su-hIL15	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWRQAPGGGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAWYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS <u>GGGGSGGGGICPPPMSEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTS</u> <u>SLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSSGGSGGGSGG</u> <u>GSGGGSGGGNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK</u> <u>CFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEE</u> <u>KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</u>
68/ xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- Bsp-E- アーム- 3GS- hIL15 NQ	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWRQAPGGGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAWYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS <u>GGGGSGGGGNWNVISDLKKIEDLIQSMHINATLFTESDVHPSCKVTAMK</u> <u>CFLQLQVISLQSGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECCQEELE</u> <u>QKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</u>
69/ xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- Bsp-E- アーム- 3GS- hIL15 V49R- E46G- E64Q	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWRQAPGGGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAWYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS <u>GGGGSGGGGNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK</u> <u>CFLGLQRIQISLESGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEE</u> <u>KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</u>
70/ xhPD1(V H1-69b)-	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWRQAPGGGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAWYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF

【表 2 - 9】

hlgG1- AAA- Bsp-E- アーム- 3GS- hIL15 V49R- E46G- E64Q- D30N	PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSREEMTKNQVSLTCEVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHP SCKVTAMK CFLGLQLRISLESGDASIHDVTQNLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
71/ xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- Bsp-E- アーム- 3GS- hIL15 V49R- E46G- N4Q- D30N	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGGGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSREEMTKNQVSLTCEVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGNWV QVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQLRISLE SGDASIHDVT ENLILANNS LSSNGNVTES GCKEC EELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFINTS
72 xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- Bsp-E- アーム- 3GS- hIL15 V49R- E46G- N1K- D30N	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGGGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSREEMTKNQVSLTCEVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGKWV NVISDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQLRISLE SGDASIHDVT ENLILANNS LSSNGNVTES GCKEC EELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFINTS
73 xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- Bsp-E- アーム- 3GS- hIL15 V49R- E46G- S7T- D30N	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGGGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCEKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSREEMTKNQVSLTCEVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGNWV NVITDLKKIE DLIQSMHIDA TLYTESNVHP SCKVTA MKCF LLGLQLRISLE SGDASIHDVT ENLILANNS LSSNGNVTES GCKEC EELEE KNIKEFLQSF VHIVQMFINTS

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

75/ xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- 'ホール'- 3GS- hIL15 V49R- E46G- E64Q- D30N	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTSYWINWWRQAPGQGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGG <u>SGGGGSGGGGNWVN</u> <u>VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHP</u> <u>SCKVTAM</u> <u>KCFLLGLQRISLESGDASIHDTVQNLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL</u> <u>EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</u>
86 xmPD1- hlgG1- AAA- 'ホール'- 3GS- hIL15 V49R- E46G- N1A- D30N (m1)	EVQLVESGGGLVCKPGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWWRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSG <u>GGGSGGGGSGGGGAWVN</u> <u>VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHP</u> <u>SCKV</u> <u>TAMKCFLLGLQRISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKEC</u> <u>EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</u>
87 xmPD1- hlgG1- AAA- 'ホール'- 3GS- hIL15 V49R- E46G- N1G- E64Q- D30N (m2)	EVQLVESGGGLVCKPGGSLELSCAASGFTFSSYWMSWWRQAPEKGLEWV AAISPSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAKE SWGAYYDLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSG <u>GGGSGGGGSGGGGAWVN</u> <u>VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHP</u> <u>SCK</u> <u>VTAMKCFLLGLQRISLESGDASIHDTVQNLILANNSLSSNGNVTESGCKE</u> <u>CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</u>
89 xhPD1(V H1-69b)- hlgG1- AAA- 'ホール'- 3GS- hIL15 V49R- E46G- N1A- D30N	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTSYWINWWRQAPGQGLEWM GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT TGTFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG <u>GSGGGGSGGGGAWVN</u> <u>VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHP</u> <u>SCKVTA</u> <u>MKCFLLGLQRISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE</u> <u>LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</u>

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

(m1)	
90	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWRQAPGGGLEWM
xhPD1(V	GNIYPGSSITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLT
H1-69b)-	TGTFAYWGQGTlVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
hlgG1-	PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
AAA-	VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL
‘ホール’-	MISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
3GS-	VVSVLTlVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
hIL15	PCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSPDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
V49R-	GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGG
E46G-	<u>GS</u> <u>GGGGSGGGGGG</u> WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTA
N1G-	<u>MKCFLLGLQRISLES</u> GDASIHDTVQNLILANNLSLSSNGNVTESGCKECEE
E64Q-	LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
D30N	
(m2)	

10

【0136】

本明細書に記載されている I L - 1 5 融合タンパク質は、当該分野で公知の方法によって、例えば、合成的にまたは組換え的に作り出され得る。典型的に、本発明の融合タンパク質は、本明細書に記載されている組換え法を使用して、それらをコードするポリヌクレオチドを調製し、発現することによって作製されるが、それらはまた、例えば、化学合成を含む、当該分野で公知の他の手段によって調製され得る。

20

【0137】

本明細書に記載されている抗体はまた、当該分野で公知の任意の方法によって作製され得る。ハイブリドーマ細胞株の産生のために、宿主動物の免疫化の経路およびスケジュールは一般的に、本明細書にさらに記載されているように、抗体刺激および産生のための確立された従来の技術と一致する。ヒトおよびマウス抗体の産生のための一般的な技術は当該分野で公知であり、および／または本明細書に記載されている。

【0138】

ヒトを含む任意の哺乳動物対象またはそれ由来の抗体産生細胞は、ヒトおよびハイブリドーマ細胞株を含む、哺乳動物の産生のための基礎として役立つように操作され得ることが企図される。典型的に、宿主動物は、本明細書に記載されているものを含む免疫原の量を腹腔内、筋肉内、経口、皮下、足底内、および／または皮内に接種される。

30

【0139】

ハイブリドーマは、Kohler, B. および Milstein, C.、Nature 256: 495~497 ページ、1975 の一般的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を使用して、または Buck, D. W. ら、In Vitro、18: 377~381 ページ、1982 によって改変されているように、リンパ球および不死化骨髓腫細胞から調製され得る。限定されないが、X63-Ag8.653 および Salk Institute、Cell Distribution Center、San Diego、Calif.、USA からのもを含む、利用可能な骨髓腫系が、ハイブリダイゼーションに使用され得る。一般的に、この技術は、ポリエチレングリコールなどの融合剤を使用して、または当業者に周知の電気的手段によって、骨髓腫細胞およびリンパ球様細胞を融合することを含む。融合後、細胞を融合培地から分離し、ハイブリダイズしていない親細胞を取り除くために、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン (HAT) 培地などの選択増殖培地中で増殖させる。血清を補充したまたは補充していない本明細書に記載されている培地のいずれも、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを培養するために使用され得る。細胞融合技術の別の代替として、EBV 不死化 B 細胞が対象発明のモノクローナル抗体を産生するために使用され得る。ハイブリドーマを増殖させ、所望の場合、サブクローニングし、上清は、従来のイムノアッセイ手順（例えば、ラジオイムノアッセイ

40

50

、酵素イムノアッセイ、または蛍光イムノアッセイ) によって抗免疫原活性についてアッセイされる。

【0140】

抗体の供給源として使用され得るハイブリドーマは、モノクローナル抗体を産生する親ハイブリドーマの全ての誘導体、子孫細胞を包含する。

本発明のために使用される抗体を産生するハイブリドーマは、公知の手順を使用して、*in vitro*または*in vivo*で増殖させ得る。モノクローナル抗体は、所望の場合、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル電気泳動、透析、クロマトグラフィー、および限外濾過などの従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養培地または体液から単離され得る。存在する場合、望ましくない活性は、例えば、調製物を、固相に付着した免疫原から作製された吸着剤上に流し、所望の抗体を免疫原から溶出または放出させることによって除去され得る。抗体標的(例えば、PD-1)、ヒト標的タンパク質(例えば、PD-1)を発現する細胞、または二機能性もしくは誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介したコンジュゲーション)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リシン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂もしくはR¹N=C=NR(式中、RおよびR¹は異なるアルキル基である)を使用して免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、もしくはダイズトリプシン阻害剤にコンジュゲートされた標的アミノ酸配列を含有する断片による、宿主動物の免疫化は、抗体(例えば、モノクローナル抗体)の集団を生じ得る。

【0141】

所望の場合、目的の抗体(モノクローナルまたはポリクローナル)が配列決定され得、次いでポリヌクレオチド配列が発現または増殖のためにベクターにクローニングされ得る。目的の抗体をコードする配列は宿主細胞におけるベクター内で維持され得、次いで宿主細胞は将来の使用のために増殖および凍結され得る。細胞培養における組換えモノクローナル抗体の産生は、当該分野で公知の手段による、B細胞からの抗体遺伝子のクローニングを介して実施され得る。例えば、Tillerら、J. Immunol. Methods 329、112ページ、2008；米国特許第7,314,622号を参照のこと。

【0142】

一部の態様では、抗体はハイブリドーマ技術を使用して作製され得る。ヒトを含む任意の哺乳動物対象またはそれら由来の抗体産生細胞は、ヒトを含む哺乳動物ハイブリドーマ細胞株の産生のための基礎として役立つように操作され得ることが企図される。宿主動物の免疫化の経路およびスケジュールは一般的に、本明細書にさらに記載されているように、抗体刺激および産生のための確立された従来の技術と一致する。典型的に、宿主動物は、本明細書に記載されているものを含む、免疫原の量を腹腔内、筋肉内、経口、皮下、足底内、および/または皮内に接種される。

【0143】

一部の態様では、本明細書に記載されている抗体は、それらの定常領域中の保存された位置においてグリコシル化されている(JefferysおよびLund、1997、Chem. Immunol. 65:111~128ページ；WrightおよびMorrisson、1997、TibTECH 15:26~32ページ)。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能(Boydら、1996、Mol. Immunol. 32:1311~1318ページ；WittweおよびHoward、1990、Biochem. 29:4175~4180ページ)ならびに糖タンパク質のコンフォメーションおよび提示される三次元表面に影響し得る糖タンパク質の部分間の分子内相互作用に影響する(JefferysおよびLund、上記；WyssおよびWagner、1996、Current Opin. Biotech. 7:409~416ページ)。オリゴ糖はまた、特異的認識構造に基づいて、特定の分子に所与の糖タンパク質を標的化するようにも機能し得る。抗体のグリコシル化はまた、抗体依存性細胞傷害(ADCC)に影響することも報告されている。特に、二分岐性のGlcNAcの形成を触媒するグリコシルトラ

ンスフェラーゼである、 β (1, 4) - N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I (G n T I I I) のテトラサイクリン調節される発現を有する C H O 細胞によって産生される抗体は、改善された A D C C 活性を有することが報告された (U m a n a ら、1999、Nature Biotech. 17:176~180 ページ)。

【0144】

抗体のグリコシル化は典型的に N-結合型または O-結合型のいずれかである。N-結合型とは、炭水化物部分のアスパラギン残基の側鎖への付着を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-トレオニン、およびアスパラギン-X-システイン (ここで、X はプロリンを除く任意のアミノ酸である) は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素的付着のための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が生じる。O-結合型グリコシル化とは、糖 N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの 1 つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの付着を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは 5-ヒドロキシリシンもまた、使用され得る。

【0145】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、好都合には、アミノ酸配列を、それが上記のトリペプチド配列 (N-結合型グリコシル化部位) のうちの 1 つまたは複数を含むように変更することによって達成される。変更はまた、元の抗体の配列 (O-結合型グリコシル化部位について) への 1 つまたは複数のセリン残基またはトレオニン残基の付加または置換によってもなされ得る。

【0146】

また、抗体のグリコシル化パターンは、基底にあるヌクレオチド配列を変更せずに変更され得る。グリコシル化は、抗体を発現させるために使用される宿主細胞に大きく依存する。潜在的な治療剤として組換え糖タンパク質、例えば抗体を発現させるために使用される細胞種は、ネイティブ細胞であることが稀であるため、抗体のグリコシル化パターンの変動が予測され得る (例えば、H s e ら、1997、J. Biol. Chem. 272:9062~9070 ページを参照のこと)。

【0147】

宿主細胞の選択肢に加えて、抗体の組換え産生の間にグリコシル化に影響を与える要素には、増殖様式、培地配合、培養密度、酸素化、pH、精製スキームなどが含まれる。特定の宿主生物で達成されるグリコシル化パターンを変更するために、オリゴ糖の産生に関与する特定の酵素の導入または過剰発現を含めた、様々な方法が提案されている (米国特許第 5,047,335 号、同第 5,510,261 号および同第 5,278,299 号)。グリコシル化、または特定の種類のグリコシル化は、糖タンパク質から、例えば、エンドグリコシダーゼ H (E n d o H)、N-グリコシダーゼ F、エンドグリコシダーゼ F1、エンドグリコシダーゼ F2、エンドグリコシダーゼ F3 を使用して、酵素的に除去され得る。さらに、特定の種類の多糖のプロセッシングが欠損しているように、組換え宿主細胞を遺伝子操作することができる。これらおよび類似の技術が当該分野で周知である。

【0148】

他の修飾方法には、限定されないが、酵素的手段、酸化的置換およびキレート化を含む、当該分野で公知のカップリング技術の使用が含まれる。修飾は、例えば、イムノアッセイ用の標識の付着に使用され得る。修飾されたポリペプチドは、当該分野で確立された手順を使用して作製され、当該分野で公知の標準的なアッセイを使用してスクリーニングされ得、それらの一部は以下および実施例に記載されている。

【0149】

本発明の I L-15 融合タンパク質または I l-15 バリエーションは、蛍光分子、放射性分子または当該分野で公知の任意の他の標識などの標識剤に連結され得る。一般的に (直接または間接のいずれかで) シグナルを提供する標識は当該分野で公知である。

ポリヌクレオチド、ベクター、および宿主細胞

10

20

30

40

50

本発明はまた、本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションおよび I L - 1 5 融合タンパク質のいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。一つの側面では、本発明は、本明細書に記載されているポリヌクレオチドのいずれかを作製する方法を提供する。ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の手順によって作製および発現され得る。

【0150】

別の側面では、本発明は、本発明のポリヌクレオチドのいずれかを含有する組成物（医薬組成物など）を提供する。一部の態様では、組成物は、本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションおよび I L - 1 5 融合タンパク質のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

【0151】

別の側面では、本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションおよび I L - 1 5 融合タンパク質を産生する単離された細胞株が提供される。一部の態様では、細胞株は操作された免疫細胞であり、操作された免疫細胞はキメラ抗原受容体（C A R）を含む。一部の態様では、I L - 1 5 バリエーションおよび I L - 1 5 融合タンパク質は、分泌型または膜係留型のいずれかとして、C A R T 細胞においてポリヌクレオチドとして発現される場合、活性および増殖を含む C A R T 機能を増強するために使用される。一部の態様では、I L - 1 5 バリエーションまたはそれを含む I L - 1 5 融合タンパク質は、D 2 2 N、Y 2 6 F、E 4 6 Q、E 5 3 Q、E 8 9 Q、および E 9 3 Q の位置においてアミノ酸置換を含む（例えば、配列番号 7 6 を参照のこと）。

【0152】

本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションおよび I L - 1 5 融合タンパク質を産生する免疫細胞は、C A R を免疫細胞に導入し、細胞を増殖させることによって作製され得る。例えば、免疫細胞は、細胞を準備し、細胞の表面において本明細書に記載されている少なくとも 1 つの C A R および少なくとも 1 つの I L - 1 5 バリエーションまたは I L - 1 5 融合タンパク質を発現することによって操作され得る。免疫細胞を操作するための方法は、例えば、P C T 特許出願公開番号 W O / 2 0 1 4 / 0 3 9 5 2 3、W O / 2 0 1 4 / 1 8 4 7 4 1、W O / 2 0 1 4 / 1 9 1 1 2 8、W O / 2 0 1 4 / 1 8 4 7 4 4、および W O / 2 0 1 4 / 1 8 4 1 4 3 に記載されており、それらの各々は、その全体が本明細書に参照として組み込まれる。一部の態様では、細胞は、C A R をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド、本明細書に記載されている I L - 1 5 バリエーションまたは I L - 1 5 融合タンパク質をコードする 1 つのポリヌクレオチドにより形質転換され得、続いて、細胞中でポリヌクレオチドを発現し得る。

【0153】

任意のこのような配列に相補的なポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。ポリヌクレオチドは、一本鎖（コードまたはアンチセンス）または二本鎖であってもよく、D N A（ゲノム、c D N A または合成）または R N A 分子であってもよい。R N A 分子には、イントロンを含有し、一対一の様式で D N A 分子に対応する H n R N A 分子、およびイントロンを含有しない m R N A 分子が含まれる。さらなるコード配列または非コード配列が、本発明のポリヌクレオチド内に存在してもよいが存在する必要はなく、ポリヌクレオチドは、他の分子および／または支持体材料に連結されてもよいが連結される必要はない。

【0154】

ポリヌクレオチドは、ネイティブ配列（すなわち、抗体またはその断片をコードする内因性配列）を含み得るか、またはそのような配列のバリエーションを含み得る。コードされたポリペプチドの免疫反応性がネイティブ免疫反応性分子と比較して減少されないように、ポリヌクレオチドバリエーションは、1 つまたは複数の置換、付加、欠失および／または挿入を含有する。コードされたポリペプチドの免疫反応性に対する影響は、一般に、本明細書に記載されているように評価され得る。バリエーションは、好ましくは、ネイティブ抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列に対して少なくとも約 7 0 % の同一性、より好ましくは、少なくとも約 8 0 % の同一性、なおより好ましくは、少なくとも約 9 0 %

の同一性、最も好ましくは、少なくとも約 95% の同一性を示す。

【0155】

2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、以下に記載されているように最大の対応を求めてアラインした場合に2つの配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が同じである場合、「同一」とされる。2つの配列間の比較は、典型的には、配列類似性の局所的領域を同定および比較するために、比較ウィンドウにわたって配列を比較することによって実施される。「比較ウィンドウ」は、本明細書で使用されている場合、少なくとも約20連続する位置、通常は30～約75または40～約50連続する位置のセグメントを指し、そこで、配列が、2つの配列を最適にアラインした後に、同じ数の連続する位置の参照配列に対して比較され得る。

10

【0156】

比較のための配列の最適なアラインメントは、デフォルトパラメーターを使用して、バイオインフォマティクスソフトウェア (DNASTAR (登録商標), Inc., Madison, WI) の Lasergene (登録商標) スイート中の MegAlign (登録商標) プログラムを使用して実施され得る。このプログラムは、以下の参考文献に記載されているいくつかのアラインメントスキームを具体化する: Dayhoff, M. O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships, Dayhoff, M. O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, 補遺3, 345～358ページ; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenetics 626～645ページ Methods in Enzymology 183巻, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. および Sharp, P. M., 1989, CABIOS 5:151～153ページ; Myers, E. W. および Muller W., 1988, CABIOS 4:11～17ページ; Robinson, E. D., 1971, Comb. Theor. 11:105ページ; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406～425ページ; Sneath, P. H. A. および Sokal, R. R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. および Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726～730ページ。

20

30

【0157】

好ましくは、「配列同一性のパーセンテージ」は、2つの最適にアラインされた配列を、少なくとも20個の位置の比較ウィンドウにわたって比較することによって決定され、このとき、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントのために、参照配列 (付加も欠失も含まない) と比較して、20パーセント以下、通常は5～15パーセントまたは10～12パーセントの付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含み得る。パーセンテージは、同一な核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中に存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得、一致した位置の数を参照配列中の位置の総数 (すなわち、ウィンドウサイズ) で除算し、結果に100を乗算して配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

40

【0158】

バリエーションはまた、またはあるいは、ネイティブ遺伝子、またはその一部分もしくは相補体に対して実質的に相同であり得る。このようなポリヌクレオチドバリエーションは、ネイティブ抗体をコードする天然に存在するDNA配列 (または相補的な配列) に、中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる。

50

【0159】

適切な「中程度にストリンジェントな条件」は、 $5\times\text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 、 1.0mM EDTA ($\text{pH} 8.0$) の溶液中での事前洗浄； $50^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$ 、 $5\times\text{SSC}$ で一晩のハイブリダイゼーション；その後の、 $0.1\% \text{SDS}$ を含有する $2\times$ 、 $0.5\times$ および $0.2\times$ の SSC の各々で 65°C にて20分間の洗浄2回を含む。

【0160】

本明細書で使用されている場合、「高度にストリンジェントな条件」または「高いストリンジェンシーの条件」は、(1) 洗浄のために、低いイオン強度および高い温度、例えば、 50°C にて、 0.015M 塩化ナトリウム/ 0.0015M クエン酸ナトリウム/ 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを利用するもの；(2) ハイブリダイゼーションの間に、 42°C にて、 750mM 塩化ナトリウム、 75mM クエン酸ナトリウムを含む $\text{pH} 6.5$ の 0.1% ウシ血清アルブミン/ $0.1\% \text{Ficoll}$ / 0.1% ポリビニルピロリドン/ 50mM リン酸ナトリウム緩衝液と共に、変性剤、例えば、ホルムアミド、例えば、 $50\% (\text{v/v})$ ホルムアミドを利用するもの；または(3) $0.2\times\text{SSC}$ (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) 中 42°C および 50% ホルムアミド中 55°C での洗浄、その後の、 55°C での EDTA を含有する $0.1\times\text{SSC}$ からなる高いストリンジェンシーの洗浄と共に、 42°C にて、 50% ホルムアミド、 $5\times\text{SSC}$ (0.75M NaCl 、 0.075M クエン酸ナトリウム)、 50mM リン酸ナトリウム ($\text{pH} 6.8$)、 0.1% ピロリン酸ナトリウム、 $5\times$ デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子 DNA ($50 \mu\text{g/ml}$)、 $0.1\% \text{SDS}$ および 10% デキストラン硫酸を利用するものである。当業者は、プローブ長さなどの因子に合わせるために必要に応じて、温度、イオン強度などを調整する方法を認識している。

【0161】

遺伝コードの縮重の結果として、本明細書に記載されているポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することが、当業者によって理解される。これらのポリヌクレオチドの一部は、任意のネイティブ遺伝子のヌクレオチド配列に対して最小の相同性を有する。それにもかかわらず、コドン用法における差異に起因して変動するポリヌクレオチドが、本発明によって具体的に企図される。さらに、本明細書で提供されているポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、ヌクレオチドの1つまたは複数の突然変異、例えば、欠失、付加および/または置換の結果として変更された内因性遺伝子である。得られた mRNA およびタンパク質は、変更された構造または機能を有してもよいが、その必要はない。対立遺伝子は、標準的な技術 (例えば、ハイブリダイゼーション、増幅および/またはデータベース配列比較) を使用して同定され得る。

【0162】

本発明のポリヌクレオチドは、化学的合成、組換え方法または PCR を使用して得られ得る。化学的ポリヌクレオチド合成の方法は、当該分野で周知であり、本明細書で詳細に記載する必要はない。当業者は、所望の DNA 配列を産生するために、本明細書で提供されている配列および市販の DNA 合成機を使用することができる。

【0163】

組換え方法を使用してポリヌクレオチドを調製するために、本明細書でさらに議論されているように、所望の配列を含むポリヌクレオチドが、適切なベクター中に挿入され得、このベクターは次いで、複製および増幅のために適切な宿主細胞中に導入され得る。ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の手段によって、宿主細胞中に挿入され得る。細胞は、直接的取込み、エンドサイトーシス、トランスフェクション、 F 接合 (F-mating) またはエレクトロポレーションによって外因性ポリヌクレオチドを導入することによって形質転換される。導入されると、外因性ポリヌクレオチドは、非組み込みベクター (例えば、プラスミド) として細胞内に維持され得るか、または宿主細胞ゲノム中に組み込まれ得る。そうして増幅されたポリヌクレオチドは、当該分野で周知の方法によって宿主細胞から単離され得る。例えば、 Sambrook ら、 1989 を参照のこと。

【0164】

あるいは、PCRが、DNA配列の再生を可能にする。PCR技術は、当該分野で周知であり、米国特許第4,683,195号、同第4,800,159号、同第4,754,065号および同第4,683,202号、ならびにPCR: The Polymerase Chain Reaction、Mullisら編、Birkauwer Press、Boston、1994に記載されている。

【0165】

RNAは、適切なベクター中の単離されたDNAを使用し、それを適切な宿主細胞中に挿入することによって得られ得る。細胞が複製し、DNAがRNAに転写されると、このRNAは、次いで、例えば、Sambrookら、1989、supra、において上記に示されているように、当業者に周知の方法を使用して単離され得る。

10

【0166】

適切なクローニングベクターは、標準的な技術に従って構築され得るか、または当該分野で入手可能な多数のクローニングベクターから選択され得る。選択されるクローニングベクターは、使用が意図される宿主細胞に従って変動し得るが、有用なクローニングベクターは、一般に、自己複製する能力を有し、特定の制限エンドヌクレアーゼに対する単一の標的を有し得、および／またはベクターを含有するクローンを選択する際に使用され得るマーカーについての遺伝子を有し得る。適切な例には、プラスミドおよび細菌ウイルス、例えば、pUC18、pUC19、Bluescript（例えば、pBS SK+）およびその誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、ならびにシャトルベクター、例えば、pSA3およびpAT28が含まれる。これらおよび多くの他のクローニングベクターは、BioRad、StratageneおよびInvitrogenなどの業者から入手可能である。

20

【0167】

発現ベクターがさらに提供される。発現ベクターは、一般に、本発明に従うポリヌクレオチドを含有する複製可能なポリヌクレオチド構築物である。発現ベクターは、エピソームとして、または染色体DNAの統合された一部として、宿主細胞中で複製可能でなければならないことが含意される。適切な発現ベクターには、プラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスを含むウイルスベクター、コスミド、およびPCT出願公開番号WO87/04462に開示されている発現ベクターが含まれるがこれらに限定されない。ベクター成分には、一般に、以下のうちの1つまたは複数が含まれ得るがこれらに限定されない：シグナル配列；複製起点；1つまたは複数のマーカー遺伝子；適切な転写制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサーおよびターミネーター）。発現（すなわち、翻訳）のために、1つまたは複数の翻訳制御エレメント、例えば、リボソーム結合部位、翻訳開始部位および終止コドンもまた、通常必要とされる。

30

【0168】

目的のポリヌクレオチドを含有するベクターは、エレクトロポレーション、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランまたは他の物質を利用するトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；および感染（例えば、ベクターが、ワクシニアウイルスなどの感染性因子である場合）を含むいくつかの適切な手段のいずれかによって、宿主細胞中に導入され得る。導入するベクターまたはポリヌクレオチドの選択は、宿主細胞の特徴に依存する場合が多い。

40

【0169】

本発明はまた、本明細書に記載されているポリヌクレオチドのいずれかを含む宿主細胞も提供する。異種DNAを過剰発現させることができる任意の宿主細胞が、目的の抗体、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子を単離する目的で使用され得る。哺乳動物宿主細胞の非限定的な例には、COS、HeLaおよびCHO細胞が含まれるがこれらに限定されない。PCT出願公開番号WO87/04462もまた参照のこと。適切な非哺乳動物宿主細胞には、原核生物（例えば、大腸菌（E. coli）または枯草菌（B. subtilis））および酵母（例えば、出芽酵母（S. cerevisiae））、

50

分裂酵母 (S. pombe) またはクリベロマイセス・ラクティス (K. lactis) が含まれる。好ましくは、宿主細胞は、存在する場合、宿主細胞中の目的の対応する内因性抗体またはタンパク質の cDNA よりも、約 5 倍高い、より好ましくは、10 倍高い、さらにより好ましくは、20 倍高いレベルで、cDNA を発現する。IL-15 または IL-15 ドメインへの特異的結合についての宿主細胞のスクリーニングは、免疫アッセイまたは FACS によってもたらされる。目的の抗体またはタンパク質を過剰発現する細胞が同定され得る。

【0170】

発現ベクターが、IL-15 バリエーションまたは IL-15 融合タンパク質の発現を指示するために使用され得る。当業者は、in vivo で外因性タンパク質の発現を得るための発現ベクターの投与に精通している。例えば、米国特許第 6,436,908 号；同第 6,413,942 号；および同第 6,376,471 号を参照のこと。発現ベクターの投与には、注射、経口投与、粒子銃またはカテーテル投与、および局所投与を含む、局所または全身投与が含まれる。別の態様では、発現ベクターは、交感神経幹もしくは神経節に、または冠状動脈、心房、心室もしくは心膜に直接投与される。

【0171】

発現ベクターまたはサブゲノムポリヌクレオチドを含有する治療的組成物の標的化された送達もまた、使用され得る。受容体媒介性 DNA 送達技術は、例えば、Findenis ら、Trends Biotechnol.、1993、11:202 ページ；Chiu ら、Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer、J. A. Wolff 編、1994；Wu ら、J. Biol. Chem.、1988、263:621 ページ；Wu ら、J. Biol. Chem.、1994、269:542 ページ；Zenke ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1990、87:3655 ページ；Wu ら、J. Biol. Chem.、1991、266:338 ページに記載されている。ポリヌクレオチドを含有する治療的組成物は、遺伝子治療プロトコールにおいて、局所投与のために、約 100 ng ~ 約 200 mg の範囲の DNA で投与される。約 500 ng ~ 約 50 mg、約 1 µg ~ 約 2 mg、約 5 µg ~ 約 500 µg および約 20 µg ~ 約 100 µg の DNA の濃度範囲もまた、遺伝子治療プロトコールの間に使用され得る。治療的ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して送達され得る。遺伝子送達ビヒクルは、ウイルスまたは非ウイルス起源のものであり得る（一般に、Jolly、Cancer Gene Therapy、1994、1:51 ページ；Kimura、Human Gene Therapy、1994、5:845 ページ；Connelly、Human Gene Therapy、1995、1:185 ページ；および Kaplitt、Nature Genetics、1994、6:148 ページを参照のこと）。このようなコード配列の発現は、内因性哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを使用して誘導され得る。コード配列の発現は、構成的であり得るかまたは調節され得る。

【0172】

所望のポリヌクレオチドの送達および所望の細胞における発現のためのウイルスベースのベクターは、当該分野で周知である。例示的なウイルスベースのビヒクルには、限定されないが、組換えレトロウイルス（例えば、PCT 出願公開番号 WO90/07936；WO94/03622；WO93/25698；WO93/25234；WO93/11230；WO93/10218；WO91/02805；米国特許第 5,219,740 号および同第 4,777,127 号；英国特許第 2,200,651 号；および欧州特許第 0345242 号を参照のこと）、アルファウイルスベースのベクター（例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス (ATCC VR-67；ATCC VR-1247)、ロスリバーウイルス (ATCC VR-373；ATCC VR-1246) およびベネズエラウマ脳炎ウイルス (ATCC VR-923；ATCC VR-1250；ATCC VR-1249；ATCC VR-532)）およびアデノ随伴ウ

10

20

30

40

50

イルス (AAV) ベクター (例えば、PCT 出願公開番号 WO 94/12649、WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 および WO 95/00655) が含まれる。Curriel、Hum. Gene Ther.、1992、3:147 ページに記載されている死滅したアデノウイルスと連結している DNA の投与もまた、利用され得る。

【0173】

限定されないが、死滅したアデノウイルスと連結しているか、または連結していない単独のポリカチオンの縮合 DNA (例えば、Curriel、Hum. Gene Ther.、1992、3:147 ページを参照のこと); リガンド連結型 DNA (例えば、Wu、J. Biol. Chem.、1989、264:16985 ページを参照のこと); 真核細胞送達ビヒクル細胞 (例えば、米国特許第 5,814,482 号; PCT 出願公開番号 WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; および WO 97/42338 を参照のこと) ならびに核電荷中和 (nucleic charge neutralization) または細胞膜との融合を含む、非ウイルス送達ビヒクルおよび方法もまた、利用され得る。裸の DNA もまた、利用され得る。例示的な裸の DNA 導入法は、PCT 出願公開番号 WO 90/11092 および米国特許第 5,580,859 号に記載されている。遺伝子送達ビヒクルとして作用し得るリボソームは、米国特許第 5,422,120 号; PCT 出願公開番号 WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; および EP 0524968 に記載されている。さらなるアプローチは、Philip、Mol. Cell Biol.、1994、14:2411 ページ、および Woffendin、Proc. Natl. Acad. Sci.、1994、91:1581 ページに記載されている。

組成物

本発明はまた、本明細書に記載されている有効量の IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。このような組成物の例、および製剤化する方法もまた、本明細書に記載されている。一部の態様では、組成物は 1 つまたは複数の IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質を含む。一部の態様では、組成物は、PD-1 抗体を含む IL-15 融合タンパク質、ならびに V49、I50、S51、N4、D30、および E64 位 (例えば、V49N、I50A、S51T、N4K、D30N、および E64Q) においてアミノ酸置換を含むヒト IL-15 バリエントを含み、ヒト IL-15 バリエントは抗体の Fc ドメインと共有結合している。一部の態様では、組成物は、PD-1 抗体を含むヒト IL-15 融合タンパク質、ならびに E46、V49、E64、D30、および N4 位 (例えば、E46G、V49R、E64Q、D30N、および N4K) においてアミノ酸置換を含むヒト IL-15 バリエントを含み、IL-15 バリエントは抗体の Fc ドメインと共有結合している。一部の態様では、組成物は、PD-1 抗体を含むヒト IL-15 融合タンパク質、ならびに N1、D30、E46、および V49 位 (例えば、N1A、D30N、E46G、および V49R) においてアミノ酸置換を含むヒト IL-15 バリエントを含み、IL-15 バリエントは抗体の Fc ドメインと共有結合している。一部の態様では、組成物は、PD-1 抗体を含むヒト IL-15 融合タンパク質、ならびに N1、D30、E46、V49、および E64 位 (例えば、N1G、D30N、E46G、V49R、および E64Q) においてアミノ酸置換を含むヒト IL-15 バリエントを含み、IL-15 バリエントは抗体の Fc ドメインと共有結合している。

【0174】

組成物は、1 つより多い IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質 (例えば、異なる IL-15 バリエントおよび/または異なる抗体を含む IL-15 バリエントまたは IL-15 融合物の混合物) を含むことが理解される。例えば、組成物は、1) PD-1 抗体を含むヒト IL-15 融合タンパク質、ならびに E46G、V49R、E64Q、D30N、および N4K 位においてアミノ酸置換を含むヒト IL-15 バリエント; ならびに 2) PD-1 抗体を含む IL-15 融合タンパク質、ならびに V49N、I

50A、S51T、N4K、D30N、およびE64Q位においてアミノ酸置換を含むヒトIL-15バリエーションを含む。別の例では、組成物は、1) PD-1抗体を含むヒトIL-15融合タンパク質、ならびにN1A、D30N、E46G、およびV49R位においてアミノ酸置換を含むヒトIL-15バリエーション；ならびに2) PD-1抗体を含むIL-15融合タンパク質、ならびにN1G、D30N、E46G、V49R、およびE64Q位においてアミノ酸置換を含むヒトIL-15バリエーションを含む。

【0175】

本発明において使用される組成物は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤 (Remington: The Science and practice of Pharmacy 第20版、2000、Lippincott Williams and Wilkins、K. E. Hoover編) をさらに含み得る。許容される担体、賦形剤または安定剤は、その投薬量および濃度においてレシピエントにとって非毒性であり、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤 (例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム (octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride)；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール)；低分子量 (約10残基未満) ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリシン；グルコース、マンノースもしくはデキストランを含む、単糖、二糖および他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール；塩形成性対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体 (例えば、Zn-タンパク質錯体)；および／または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN (商標)、PLURONICS (商標) もしくはポリエチレングリコール (PEG) を含み得る。薬学的に許容される賦形剤はさらに本明細書に記載されている。

【0176】

IL-15バリエーション、IL-15融合タンパク質、およびそれらの組成物はまた、薬剤の有効性を増強および／または補完するように機能する他の薬剤と併せて使用され得るか、またはそれと別々に、同時に、もしくは連続的に投与され得る。

【0177】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドのいずれかを含む医薬組成物を含む組成物も提供する。一部の態様では、組成物は、本明細書に記載されているIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。他の態様では、組成物は、本明細書に記載されているIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

IL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質を使用して状態を予防または処置する方法

本発明のIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質は、限定されないが、治療的処置方法および診断的処置方法を含む種々の用途において有用である。

【0178】

一つの側面では、本発明は、がんを処置する方法を提供する。一部の態様では、対象におけるがんを処置する方法は、本明細書に記載されているIL-15バリエーションおよびIL-15融合タンパク質のいずれかを含む有効量の組成物 (例えば、医薬組成物) を、がんの処置を必要とする対象に投与するステップを含む。本明細書で使用されている場合、がんは固形がんであっても液体がんであってもよい。固形がんには、限定されないが、胃がん、小腸がん、肉腫、頭頸部がん (例えば、扁平上皮頭頸部がん)、胸腺がん、上皮が

ん、唾液腺がん、肝がん、胆管がん、神経内分泌腫瘍、胃がん、甲状腺がん、肺がん、中皮腫、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、膵がん、神経膠腫、腎がん（例えば、腎細胞癌）、膀胱がん、子宮頸がん、子宮がん、外陰がん、陰茎がん、精巣がん、肛門がん、絨毛癌、大腸がん、口腔がん、皮膚がん、メルケル細胞癌、膠芽腫、脳腫瘍、骨がん、眼がん、および黒色腫が含まれる。

【0179】

液体がんには、限定されないが、多発性骨髄腫、悪性形質細胞腫、ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、カーラー病および骨髄腫症、形質細胞白血病、形質細胞腫、B細胞前リンパ球性白血病、ヘアリー細胞白血病、B細胞非ホジキンリンパ腫（NH L）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、大細胞リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、骨髄性白血病、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、小細胞リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、縦隔（胸腺）原発大細胞型B細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、T細胞／組織球豊富型大細胞型B細胞リンパ腫、中枢神経系原発リンパ腫、原発性皮膚びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（脚型）、高齢者のEBV陽性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、炎症を伴うびまん性大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、ALK陽性大細胞型B細胞リンパ腫、形質芽球性リンパ腫、HHV8関連多中心性キャスルマン病で発生する大細胞型B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫とバーキットリンパ腫との間の中間的な特徴を有する分類されないB細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫と古典的ホジキンリンパ腫との間の中間的な特徴を有する分類されないB細胞リンパ腫、および他の造血細胞関連がんが含まれる。

【0180】

一部の態様では、がんは、再発性、難治性、または転移性である。

一部の態様では、対象における腫瘍成長または進行を阻害する方法であって、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質を含む有効量の組成物を、腫瘍成長または進行の阻害を必要とする対象に投与するステップを含む方法が提供される。一部の態様では、対象におけるがん細胞の転移を阻害する方法であって、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質のいずれかを含む有効量の組成物を、がん細胞の転移の阻害を必要とする対象に投与するステップを含む方法が提供される。他の態様では、対象における腫瘍の退縮を誘導する方法であって、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質のいずれかを含む有効量の組成物を、腫瘍の退縮の誘導を必要とする対象に投与するステップを含む方法が提供される。

【0181】

別の側面では、がんを検出し、診断し、および／またはモニタリングする方法が提供される。例えば、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質は、画像化剤および酵素-基質標識などの検出可能な部分により標識化され得る。本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質はまた、*in vivo*画像化（例えば、PETまたはSPECT）などの*in vivo*診断アッセイ、または染色試薬のために使用され得る。

【0182】

一部の態様では、本明細書に記載されている方法は、さらなる形態の治療により対象を処置するステップをさらに含む。一部の態様では、さらなる形態の治療は、限定されないが、化学療法、放射線、手術、ホルモン治療および／またはさらなる免疫療法を含むさらなる抗がん治療である。

【0183】

本明細書で記載されている全ての方法に関して、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質に対する言及はまた、1つまたは複数のさらなる薬剤を含む組成物も含む。これらの組成物は、当該分野で周知である、緩衝液を含む薬学的に許容される賦形剤などの適切な賦形剤をさらに含み得る。本発明は、単独で、または処置の他の方法と組み合わせて使用され得る。

【0184】

本明細書で記載されている I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質は、任意の適切な経路を介して対象に投与され得る。本明細書で記載されている例が、利用可能な技術の限定ではなく例示を意図することは、当業者に明らかなはずである。したがって、一部の態様では、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質は、公知の方法、例えば、静脈内投与に従って、例えば、ボラスとして、または一定期間にわたる継続注入によって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、経皮、皮下、関節内、舌下、関節滑液嚢内、吹送を介する、くも膜下腔内、経口、吸入または外用経路によって、対象に投与される。投与は、全身、例えば静脈内投与、または限局性であり得る。ジェットネブライザーおよび超音波ネブライザーを含む液体製剤のための市販のネブライザーが、投与に有用である。液体製剤は、直接噴霧され得、凍結乾燥粉末は、復元後に噴霧され得る。あるいは、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質は、フルオロカーボン製剤および定用量吸入器を使用してエアロゾル化され得るか、または凍結乾燥および製粉された粉末として吸入され得る。

【0185】

一部の態様では、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質は、部位特異的または標的化された局所送達技術を介して投与される。部位特異的または標的化された局所送達技術の例には、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質の種々のインプラント可能なデポ供給源、あるいは局所送達カテーテル、例えば、注入カテーテル、留置カテーテルもしくは針カテーテル、合成グラフト、外膜ラップ (adventitial wrap)、シャントおよびステントもしくは他のインプラント可能なデバイス、部位特異的担体、直接注射、または直接適用が含まれる。例えば、PCT 出願公開番号 WO 00/53211 および米国特許第 5,981,568 号を参照のこと。

【0186】

I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質の種々の製剤が投与に使用され得る。一部の態様では、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質は、ストレートで投与され得る。一部の態様では、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質および薬学的に許容される賦形剤は、種々の製剤中にあり得る。薬学的に許容される賦形剤は、当該分野で公知であり、薬理学的に有効な物質の投与を促進する、比較的不活性な物質である。例えば、賦形剤は、形態もしくは一貫性を与え得るか、または希釈剤として作用し得る。適切な賦形剤には、安定化剤、湿潤剤および乳化剤、モル浸透圧濃度を変動させるための塩、封入剤、緩衝液、ならびに皮膚浸透増強剤が含まれるがこれらに限定されない。非経口および経口 (nonparenteral) 薬物送達のための賦形剤ならびに製剤は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing, 2000 に示されている。

【0187】

一部の態様では、これらの薬剤は、注射 (例えば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内など) による投与のために製剤化される。したがって、これらの薬剤は、薬学的に許容されるビヒクル、例えば、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液などと組み合わされ得る。特定の投薬レジメン、すなわち、用量、タイミングおよび反復は、特定の個体およびその個体の病歴に依存する。

【0188】

本明細書に記載されている I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質は、

注射（例えば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内など）によるものを含む、任意の適切な方法を使用して投与され得る。I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質はまた、本明細書で記載されているように、外用でまたは吸入を介しても投与され得る。一般に、I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質の投与に関して、候補投薬量は、毎日、毎週、隔週、3 週間毎、4 週間毎、5 週間毎、6 週間毎、7 週間毎、8 週間毎、10 週間毎、12 週間毎、または 12 週間より長い期間毎に投与され得る。数日以上にわたる反復投与に関して、状態に応じて、症状の所望の抑制が生じるまで、または例えば、がんに関連する症状を低減させるために十分な治療レベルが達成されるまで、処置は維持される。この治療の進展は従来の技術およびアッセイによって容易にモニターされる。投薬レジメン（使用される特定の I L-15 バリエーションまたは I L-15 融合タンパク質を含む）は経時的に変動し得る。

10

【0189】

一部の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $3 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $30 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までまたはそれ以上までのいずれかの範囲の投薬量で毎日投与される。例えば、約 $0.01 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.03 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $15 \text{mg}/\text{kg}$ 、および約 $25 \text{mg}/\text{kg}$ の 1 日投薬量を使用され得る。

【0190】

一部の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $3 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $30 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までまたはそれ以上までのいずれかの範囲の投薬量で毎週投与される。例えば、約 $0.01 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.03 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $15 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $25 \text{mg}/\text{kg}$ 、および約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ の毎週の投薬量を使用され得る。

20

【0191】

一部の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $3 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $30 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までまたはそれ以上までのいずれかの範囲の投薬量で隔週投与される。例えば、約 $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $15 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $25 \text{mg}/\text{kg}$ 、および約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ の 2 週間に 1 回の投薬量を使用され得る。

30

【0192】

一部の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $3 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $30 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までまたはそれ以上までのいずれかの範囲の投薬量で 3 週間毎に投与される。例えば、約 $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $15 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $25 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $35 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $40 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $45 \text{mg}/\text{kg}$ 、および約 $50 \text{mg}/\text{kg}$ の 3 週間に 1 回の投薬量を使用され得る。

40

【0193】

一部の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ まで $3 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $30 \text{mg}/\text{kg}$ まで、 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までまたはそれ以上までのいずれかの範囲の投薬量で毎月または 4 週間毎に投与される。例えば、約 $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $15 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $25 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $35 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $40 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $45 \text{mg}/\text{kg}$ 、および約 $50 \text{mg}/\text{kg}$ の毎月の投薬量を使用され得る。

【0194】

50

他の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約0.01mgから約1200mgまたはそれ以上までの範囲の投薬量で毎日投与される。例えば、約0.01mg、約0.1mg、約1mg、約10mg、約50mg、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、または約1200mgの1日投薬量を使用され得る。

【0195】

他の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約0.01mgから約2000mgまたはそれ以上までの範囲の投薬量で毎週投与される。例えば、約0.01mg、約0.1mg、約1mg、約10mg、約50mg、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、約1400mg、約1500mg、約1600mg、約1700mg、約1800mg、約1900mg、または約2000mgの毎週の投薬量を使用され得る。

10

【0196】

他の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約0.01mgから約2000mgまたはそれ以上までの範囲の投薬量で隔週投与される。例えば、約0.01mg、約0.1mg、約1mg、約10mg、約50mg、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、約1400mg、約1500mg、約1600mg、約1700mg、約1800mg、約1900mg、または約2000mgの2週間に1回の投薬量を使用され得る。

20

【0197】

他の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約0.01mgから約2500mgまたはそれ以上までの範囲の投薬量で3週間毎に投与される。例えば、約0.01mg、約0.1mg、約1mg、約10mg、約50mg、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、約1400mg、約1500mg、約1600mg、約1700mg、約1800mg、約1900mg、約2000mg、約2100mg、約2200mg、約2300mg、約2400mg、または約2500mgの3週間に1回の投薬量を使用され得る。

30

【0198】

他の態様では、候補投薬量は、上述の因子に依存して、約0.01mgから約3000mgまたはそれ以上までの範囲の投薬量で4週間毎または毎月投与される。例えば、約0.01mg、約0.1mg、約1mg、約10mg、約50mg、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、約1400mg、約1500mg、約1600mg、約1700mg、約1800mg、約1900mg、約2000mg、約2100mg、約2200mg、約2300mg、約2400mg、約2500mg、約2600mg、約2700mg、約2800mg、約2900mg、または約3000mgの毎月の投薬量を使用され得る。

40

【0199】

一部の態様では、本発明の治療薬は、約1μg/kgから約600μg/kgもしくはそれ以上まで、約6μg/kgから約600μg/kgまで、約6μg/kgから約300μg/kgまで、約30μg/kgから約600μg/kgまで、または約30μg/kgから約300μg/kgまでの用量範囲で投与される。例えば、用量は、約1μg/kg、約2μg/kg、約3μg/kg、約4μg/kg、約5μg/kg、約6μg/kg、約7μg/kg、約8μg/kg、約9μg/kg、約10μg/kg、約15μg/kg、約20μg/kg、約25μg/kg、約30μg/kg、約35μg/kg、約40μg/kg、約45μg/kg、約50μg/kg、約55μg/kg、約60

50

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $65\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $70\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $75\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $80\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $85\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $90\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $95\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $100\mu\text{g}$ 、約 $110\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $120\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $130\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $140\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $150\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $160\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $170\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $180\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $190\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $210\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $220\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $230\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $240\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $260\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $270\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $280\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $290\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $400\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $450\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $550\mu\text{g}/\text{kg}$ または約 $600\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与され、使用され得る。

【0200】

本発明の目的のために、IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質の適切な投薬量は、利用される IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質（またはその組成物）、処置される症状の種類および重症度、薬剤が予防目的で投与されるかまたは治療目的で投与されるかどうか、以前の治療、患者の臨床歴および薬剤に対する応答、投与される薬剤についての患者のクリアランス速度、ならびに担当医の裁量に依存する。典型的に、臨床医は、所望の結果を達成する投薬量に達するまで、IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質を投与する。用量および/または頻度は、処置の過程にわたって変動し得る。経験的考慮事項、例えば半減期は一般に、投薬量の決定に寄与する。投与の頻度は、治療の過程にわたって決定および調整され得、必ずではないが一般に、症状の処置および/または抑制および/または改善および/または遅延に基づく。あるいは、IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質の継続的徐放性製剤が適切であり得る。徐放を達成するための種々の製剤およびデバイスは当該分野で公知である。

【0201】

一態様では、IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質の投薬量は、IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質の 1 回または複数回の投与を与えられている個体において経験的に決定され得る。例えば、個体には、IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質の増分投薬量が与えられる。有効性を評価するために、疾患の指標に従われ得る。

【0202】

本発明における方法に従って本明細書に記載されている IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質の投与は、例えば、レシピエントの生理的状态、投与の目的が治療的であるかまたは予防的であるかどうか、および熟練した医師に公知の他の因子に応じて、連続的であっても断続的であってもよい。IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的であり得るかまたは一連の間隔をあけた用量であり得る。

【0203】

一部の態様では、1 つより多い IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質が存在し得る。少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つの異なるまたはそれ以上の IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質が存在し得る。一般に、これらの IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質は、互いに悪影響を与えない補体活性を有し得る。

【0204】

一部の態様では、IL-15 バリエントまたは IL-15 融合タンパク質は、1 つまたは複数のさらなる治療剤の投与と組み合わせて投与され得る。これらには、限定されないが、バイオ治療剤、化学療法剤、ワクチン、CAR-T 細胞ベースの治療、放射線療法、別のサイトカイン療法（例えば、免疫応答を刺激する種々のシグナル伝達タンパク質を含む免疫刺激性サイトカイン、例えば、インターフェロン、インターロイキンおよび造血成長因子）、ワクチン、他の免疫抑制経路の阻害剤、血管新生の阻害剤、T 細胞活性化因子、代謝経路の阻害剤、mTOR（ラパマイシンの機構的標的）阻害剤（例えば、ラパマイシン、ラパマイシン誘導体、シロリムス、テムシロリムス、エベロリムスおよびデフォロ

10

20

30

40

50

リムス)、アデノシン経路の阻害剤、インライタ、A L K (未分化リンパ腫キナーゼ) 阻害剤 (例えば、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ、およびスニチニブ) を含むがこれらに限定されないチロシンキナーゼ阻害剤、B R A F 阻害剤 (例えば、ベムラフェニブおよびダブラフェニブ)、エピジェネティック改変因子、T r e g 細胞および/または骨髄由来サブレッサー細胞の阻害剤または枯渇剤、J A K (ヤヌスキナーゼ) 阻害剤 (例えば、ルキシソリチニブおよびトファシチニブ、バリシチニブ (v a r i c i t i n i b)、フィルゴチニブ、ガンドチニブ、レスタウルチニブ、モメロチニブ、パクリチニブ、およびウパダシチニブ)、S T A T (シグナル伝達兼転写活性化因子) 阻害剤 (例えば、S T A T 1、S T A T 3 および S T A T 5 阻害剤、例えば、フルダラビン)、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、免疫原性剤 (例えば、弱毒化がん性細胞、腫瘍抗原、抗原提示細胞、例えば、腫瘍由来抗原または核酸でパルスした樹状細胞、M E K 阻害剤 (例えば、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、およびセルメチニブ)、G L S 1 阻害剤、P A P 阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、I D O (インドールアミン-ピロール 2, 3-ジオキシゲナーゼ) 阻害剤、P R R (パターン認識受容体) アゴニスト、ならびに限定されないが G M - C S F などの免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子をトランスフェクトされた細胞) の投与が含まれる。

10

【0205】

一部の態様では、例示的な免疫賦活性サイトカインには、限定されないが、G M - C S F、G - C S F、I F N γ 、I F N α ; I L - 2 (例えば、デニロイキン・ディフティトックス (d e n i l e u k i n d i f i t o x))、I L - 6、I L - 7、I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 2 1、および T N F α が含まれる。一部の態様では、サイトカインはペグ化される (例えば、ペグ化された I L - 2、I L - 1 0、I F N γ 、および I F N α)。

20

【0206】

パターン認識受容体 (P R R) は、免疫系の細胞によって発現され、病原体および/または細胞損傷もしくは細胞死に関連する様々な分子を認識する受容体である。P R R は自然免疫応答および適応免疫応答の両方に関与している。P R R アゴニストは、対象における免疫応答を刺激するために使用され得る。P R R 分子には、t o l l 様受容体 (T L R)、R I G - I 様受容体 (R L R)、ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン (N O D) 様受容体 (N L R)、C 型レクチン受容体 (C L R)、およびインターフェロン遺伝子の刺激因子 (S T I N G) タンパク質を含む、複数のクラスが存在する。

30

【0207】

「T L R」および「t o l l 様受容体」という用語は、任意の t o l l 様受容体を指す。t o l l 様受容体は免疫応答を活性化するのに関与する受容体である。T L R は、例えば、微生物において発現される病原体関連分子パターン (P A M P)、および死細胞または死にかけの細胞から放出される内因性損傷関連分子パターン (D A M P) を認識する。

【0208】

T L R を活性化する (およびそれによって免疫応答を活性化する) 分子は、本明細書で「T L R アゴニスト」と称される。T L R アゴニストには、例えば、小分子 (例えば、約 1 0 0 0 ダルトン未満の分子量を有する有機分子)、および大分子 (例えば、オリゴヌクレオチドおよびタンパク質) が含まれ得る。T L R アゴニストの中には、単一の型の T L R (例えば、T L R 3 または T L R 9) に特異的なものもあれば、2 つ以上の型の T L R (例えば、T L R 7 および T L R 8 の両方) を活性化するものもある。

40

【0209】

本明細書で提供されている例示的な T L R アゴニストには、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、および T L R 9 のアゴニストが含まれる。

【0210】

例示的な小分子 T L R アゴニストには、例えば、米国特許第 4, 6 8 9, 3 3 8 号; 同第 4, 9 2 9, 6 2 4 号; 同第 5, 2 6 6, 5 7 5 号; 同第 5, 2 6 8, 3 7 6 号; 同第

50

5, 346, 905号; 同第5, 352, 784号; 同第5, 389, 640号; 同第5, 446, 153号; 同第5, 482, 936号; 同第5, 756, 747号; 同第6, 110, 929号; 同第6, 194, 425号; 同第6, 331, 539号; 同第6, 376, 669号; 同第6, 451, 810号; 同第6, 525, 064号; 同第6, 541, 485号; 同第6, 545, 016号; 同第6, 545, 017号; 同第6, 573, 273号; 同第6, 656, 938号; 同第6, 660, 735号; 同第6, 660, 747号; 同第6, 664, 260号; 同第6, 664, 264号; 同第6, 664, 265号; 同第6, 667, 312号; 同第6, 670, 372号; 同第6, 677, 347号; 同第6, 677, 348号; 同第6, 677, 349号; 同第6, 683, 088号; 同第6, 756, 382号; 同第6, 797, 718号; 同第6, 818, 650号; および同第7, 7091, 214号; 米国特許出願公開第2004/0091491号、同第2004/0176367号、および同第2006/0100229号; ならびに国際公開番号WO2005/18551、WO2005/18556、WO2005/20999、WO2005/032484、WO2005/048933、WO2005/048945、WO2005/051317、WO2005/051324、WO2005/066169、WO2005/066170、WO2005/066172、WO2005/076783、WO2005/079195、WO2005/094531、WO2005/123079、WO2005/123080、WO2006/009826、WO2006/009832、WO2006/026760、WO2006/028451、WO2006/028545、WO2006/028962、WO2006/029115、WO2006/038923、WO2006/065280、WO2006/074003、WO2006/083440、WO2006/086449、WO2006/091394、WO2006/086633、WO2006/086634、WO2006/091567、WO2006/091568、WO2006/091647、WO2006/093514、およびWO2006/098852に開示されているものが含まれる。

10

20

【0211】

小分子TLRアゴニストのさらなる例には、特定のプリン誘導体（例えば、米国特許第6, 376, 501号および同第6, 028, 076号に記載されているもの）、特定のイミダゾキノリンアミド誘導体（例えば、米国特許第6, 069, 149号に記載されているもの）、特定のイミダゾピリジン誘導体（例えば、米国特許第6, 518, 265号に記載されているもの）、特定のベンゾイミダゾール誘導体（例えば、米国特許第6, 387, 938号に記載されているもの）、5員窒素含有複素環と縮合した特定の4-アミノピリミジン誘導体（例えば、米国特許第6, 376, 501号; 同第6, 028, 076号および同第6, 329, 381号; ならびにWO02/08905に記載されているアデニン誘導体）、および特定の3-ペーターD-リボフラノシルチアゾロ[4, 5-d]ピリミジン誘導体（例えば、米国特許出願公開第2003/0199461号に記載されているもの）、および例えば、米国特許出願公開第2005/0136065に記載されているものなどの特定の小分子免疫増強化合物が含まれる。

30

【0212】

例示的な大分子TLRアゴニストには、オリゴヌクレオチド配列が含まれる。いくつかのTLRアゴニストオリゴヌクレオチド配列はシトシン-グアニンジヌクレオチド(CpG)を含有し、例えば、米国特許第6, 194, 388号; 同第6, 207, 646号; 同第6, 239, 116号; 同第6, 339, 068号; および同第6, 406, 705号に記載されている。いくつかのCpG含有オリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第6, 426, 334号および同第6, 476, 000号に記載されているものなどの合成免疫調節構造モチーフを含み得る。他のTLRアゴニストヌクレオチド配列は、CpG配列を欠き、例えば、国際特許公開番号WO00/75304に記載されている。さらに他のTLRアゴニストヌクレオチド配列には、例えば、Heilら、Science、第303巻、1526~1529ページ、2004年3月5日に記載されているものなどのグ

40

50

アノシンリッチおよびウリジンリッチ一本鎖RNA (ssRNA) が含まれる。

【0213】

他のTLRアゴニストには、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート (AGP) などの生体分子が含まれ、例えば、米国特許第6, 113, 918号；同第6, 303, 347号；同第6, 525, 028号；および同第6, 649, 172号に記載されている。

【0214】

TLRアゴニストはまた、複数の異なる型のTLR受容体を活性化し得る、不活性化された病原体またはその画分を含む。例示的な病原体由来TLRアゴニストには、BCG、マイコバクテリウム・オブエンス (*mycobacterium obuense*) 抽出物、タリモジーン・ラハーパレブベック (T-Vec) (HSV-1由来)、およびPexa-Vec (ワクシニアウイルス由来) が含まれる。

【0215】

一部の態様では、TLRアゴニストはTLRに特異的に結合するアゴニスト抗体であり得る。

一部の態様では、バイオ治療剤は、限定されないが、抗CTLA-4抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗4-1BB抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗TIGIT抗体、抗OX40抗体、抗IL-7Rアルファ (CD127) 抗体、抗IL-8抗体、抗IL-15抗体、抗HVEM抗体、抗BTLA抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗CD47抗体、抗CSF1R抗体、抗CSF1抗体、抗IL-7R抗体、抗MARCO抗体、抗CXCR4抗体、抗VEGF抗体、抗VEGFR1抗体、抗VEGFR2抗体、抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD3二重特異性抗体、抗CD19抗体、抗CD20、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗ICOS抗体、抗CD22抗体、抗CD52抗体、抗CCR4抗体、抗CCR8抗体、抗CD200R抗体、抗VISG4抗体、抗CCR2抗体、抗IL1Rb2抗体、抗CXCR4抗体、抗CD206抗体、抗CD163抗体、抗KLRG1抗体、抗FLT3抗体、抗B7-H4抗体、抗B7-H3抗体、KLRG1抗体、BTN1A1抗体、BCMA抗体、または抗GITR抗体を含む、抗体である。

【0216】

一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質は免疫サイトカインと組み合わせて使用される。一部の態様では、免疫サイトカインは、サイトカインとコンジュゲートまたは融合している抗体またはその断片 (例えば、融合タンパク質) を含む。一部の態様では、抗体またはその断片は、フィブロネクチンのエクストラドメイン-A (EDA) アイソフォーム (例えば、抗EDA抗体) に結合している。例えば、抗EDA抗体またはその断片は、配列番号94に示される重鎖可変 (VH) 領域のCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに／または配列番号96に示される軽鎖可変 (VL) 領域のCDR1、CDR2およびCDR3を含む。一部の態様では、抗EDA抗体またはその断片は、配列番号94のアミノ酸配列を有するVH領域、および／または配列番号96のアミノ酸配列を有するVL領域を含む。一部の態様では、サイトカインはIL-10である。例えば、IL-10は配列番号98のアミノ酸配列を含み得る。一部の態様では、免疫サイトカインは少なくとも1つのリンカーを含む。例えば、リンカーは配列番号95および／または97を含み得る。一部の態様では、免疫サイトカインは配列番号99のアミノ酸配列を含む抗EDA-IL-10融合タンパク質である (表1. 3、下線を引いたCDR)。

【0217】

10

20

30

40

【表 3】

表1.3

配列番号	配列
94 抗EDA Ab VH	EVQLLES ~~GGGLVQPGGSLRL~~ SCAASGFTFS ~~LF~~ TMSWVRQAPGKGLWW SAI ~~SGSGGS~~ TY ~~Y~~ ADSVKGRFTISRDN ~~SKNTLYLQMN~~ SLRAEDTAVYYC AK ~~STHLYL~~ FDYWGGQGLTVTVSS
95 リンカー	<i>ggsgg</i>
96 抗EDA Ab VL	EIVLTQSPGTL ~~SLSPGERATL~~ SCRASQSVS ~~MP~~ FLAWYQQKPGQAPRLLI Y ~~GASSRAT~~ GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ ~~MRGRPP~~ TFGQGTKVEIK
97 リンカー	<i>sssgsssgsssgsssg</i>
98 IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL LKE ~~SLLEDFKGYLGCQAL~~ SEMIQFYLEE ~~VMPQAENQDPDIKAHVNSL~~ GE NLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKG ~~IYKAMSEFDI~~ FINYIEAYMTMKIRN
99 抗EDA- IL-10 融合 タンパク質	EVQLLES ~~GGGLVQPGGSLRL~~ SCAASGFTFS ~~LF~~ TMSWVRQAPGKGLEW VSAI ~~SGSGGS~~ TY ~~Y~~ ADSVKGRFTISRDN ~~SKNTLYLQMN~~ SLRAEDTAVYY CAK ~~STHLYL~~ FDYWGGQGLTVTVSS ~~ggsgg~~ EIVLTQSPGTL ~~SLSPGERATL~~ S CRASQSVS ~~MP~~ FLAWYQQKPGQAPRLLIY ~~GASSRAT~~ GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ ~~MRGRPP~~ TFGQGTKVEIK ~~sssgsssgsssgsssg~~ ~~sg~~ SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDN LLLKE ~~SLLEDFKGYLGCQAL~~ SEMIQFYLEE ~~VMPQAENQDPDIKAHVNSL~~ GENLKT ~~RLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKG~~ IYKAMSE FDIFIN ~~YIEAYMTMKIRN~~

10

20

【0218】

したがって、一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質は、例えば、抗PD-L1アンタゴニスト抗体；例えば、ニボルマブ（OPDIVO（登録商標））、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA（登録商標））、mAb7（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開番号US20160159905に記載されている）、およびピディリズマブなどの抗PD-1アンタゴニスト抗体；例えば、イピリムマブ（YERVOY（登録商標））などの抗CTLA-4アンタゴニスト抗体；BMS-986016およびIMP701などの抗LAG-3アンタゴニスト抗体；抗TIM-3アンタゴニスト抗体；例えば、MGA271などの抗B7-H3アンタゴニスト抗体；抗VISTAアンタゴニスト抗体；抗TIGITアンタゴニスト抗体；抗CD28アンタゴニスト抗体；抗CD80抗体；抗CD86抗体；抗B7-H4アンタゴニスト抗体；抗ICOSアゴニスト抗体；抗CD28アゴニスト抗体；自然免疫応答モジュレーター（例えば、TLR、KIR、NKG2A）、ならびにIDO阻害剤と併用して使用される。一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質は、例えば、PF-05082566またはウレルマブ（BMS-663513）などの4-1BB（CD137）アゴニストと併用して使用される。一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質は、例えば、抗OX-40アゴニスト抗体などのOX40アゴニストと併用して使用される。一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質は、例えば、TRX518などのGITRアゴニストと併用して使用される。一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質はIDO阻害剤と併用して使用される。一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質は、例えば、限定されないが、（ペグ化または非ペグ化）IL-2、IL-10、IL-12、IL-7、IL-15、IL-21、IL-33、CSF-1、MCSF-1などのサイトカイン治療と併用して使用される。

30

40

【0219】

一部の態様では、本発明のIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質との

50

併用使用のための抗体の他の例は、5T4；A33；アルファー葉酸受容体1（例えば、ミルベツキシマブソラブタンシン）；Alk-1；CA-125（例えば、アバゴボマブ）；カルボアンヒドラーゼIX；CCR2；CCR4（例えば、モガムリズマブ）；CCR5（例えば、レロンリマブ）；CCR8；CD3〔例えば、ブリナツモマブ（CD3／CD19二重特異性）〕、PF-06671008（CD3／P-カドヘリン二重特異性）、PF-06863135（CD3／BCMA二重特異性）、CD25；CD28；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）；CD38（例えば、ダラツムマブ、イサツキシマブ）、CD44v6；CD63；CD79（例えば、ポラツズマブベドチン）；CD80；CD123；CD276／B7-H3（例えば、オンブルタマブ）；CDH17；CEA；ClhCG；デスモグレイン4；DLL3（例えば、ロバルピツズマブテシリン）；DLL4；E-カドヘリン；EDA；EDB；EFNA4；EGFR（例えば、セツキシマブ、デパツキシズマブマホドチン、ネシツムマブ、パニツムマブ）；EGFRvIII；エンドシアリン；EpCAM（例えば、オボルツズマブモナトクス）；FAP；胎児型アセチルコリン受容体；FLT3（例えば、WO2018／220584を参照のこと）；GD2（例えば、ジヌツキシマブ、3F8）；GD3；GloboH；GM1；GM2；HER2／neu〔例えば、マルゲツキシマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、アド-トラスツズマブエムタンシン（ado-trastuzumab emtansine）、トラスツズマブデュオカルマジン、PF-06804103（US8828401を参照のこと）〕；HER3；HER4；ICOS；IL-10；ITG-AvB6；LAG-3（例えば、レラチリマブ（relatlimab））；ルイス-Y（Lewis-Y）；LG；Ly-6；M-CSF〔例えば、PD-0360324（US7326414を参照のこと）〕；MCSF；メソテリン；MUC1；MUC2；MUC3；MUC4；MUC5AC；MUC5B；MUC7；MUC16；Notch1；Notch3；ネクチン-4（例えば、エンホルツマブベドチン）；P-カドヘリン〔例えば、PF-06671008（WO2016／001810を参照のこと）〕；PCDHB2；PDGFRA（例えば、オララツマブ）；形質細胞抗原；PolySA；PSCA；PSMA；PTK7〔例えば、PF-06647020（US9409995を参照のこと）〕；Ror1；SAS；SCRx6；SLAMF7（例えば、エロツズマブ）；SHH；SIRPa（例えば、ED9、Effi-DEM）；STEAP；TGF-ベータ；TIGIT；TMPRSS3；TNF-アルファ前駆体；TROP-2（例えば、サシツズマブゴビテカン）；TSPAN8；およびWue-1に対するものであり得る。

【0220】

化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド（cyclophosphamide）；アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；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；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミン（trimethylolmelamine）を含むエチレンイミンおよびメチラメラミン（methylamelamine）；アセトゲニン（とりわけ、ブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトセシン（合成類似体トポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体KW-2189およびCBI-TMIを含む）；エリテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチイン（sarcodictyin）；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、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

；エンジン抗生物質などの抗生物質（例えば、カリケアマイシン、とりわけカリケアマイシンガンマ1 I およびカリケアマイシン ϕ h i I 1、例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl.、33:183~186 ページ（1994）を参照のこと；ジネミシンAを含むジネミシン；クロドロネートなどのビスホスホネート；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジン抗生物質クロモモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン（camino mycin）、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、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン（モルホリノードキシソルビシン、シアノモルホリノードキシソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシンおよびデオキシドキシソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、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、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；抗代謝薬、例えば、メトトレキサートおよび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、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン；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；抗副腎薬（anti-adrenal）、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；フロリン酸などの葉酸補液；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトラキサート；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；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；マイタンシノイド、例えば、マイタンシンおよびアンサミトシン；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；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；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；トリコテセン（とりわけ、T-2トキシン、ベラキュリンA、ロリジンAおよびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；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、パクリタキセルおよびドキシセタキセル；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナ類似体、例えば、カルボプラチン；ビンブラスチン；プラチナ；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタビン；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。また、腫瘍上でホルモン作用を調節するかまたは阻害するように作用する、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、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、LY117018、オナプリストンおよびトレミフェン（フェアストン）を含む、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレータ（SERM）などの抗ホルモン剤；副腎においてエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、メゲストロールアセテート、エクセメスタン、ホルメスタン、ファドロゾール、ボロゾール、レトロゾールおよびアナストロゾール；ならびに抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニル

10

20

30

40

50

タミド、ピカルタミド、ロイプロリド、フルリジル、アパルタミド、エンザルタミド、シメチジンおよびゴセレリン；K R A S阻害剤；M C T 4阻害剤；M A T 2 a阻害剤；チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、スニチニブ、アキシチニブ；a l k / c - M e t / R O S阻害剤、例えば、クリゾチニブ、ロルラチニブ；m T O R阻害剤、例えば、テムシロリムス、ゲダトリシブ；s r c / a b l阻害剤、例えば、ボスチニブ；サイクリン依存性キナーゼ（C D K）阻害剤、例えば、パルボシクリブ、P F - 0 6 8 7 3 6 0 0；e r b阻害剤、例えば、ダコミチニブ；P A R P阻害剤、例えば、タラゾバリブ；S M O阻害剤、例えば、グラスデギブ、P F - 5 2 7 4 8 5 7；E G F R T 7 9 0 M阻害剤、例えば、P F - 0 6 7 4 7 7 7 5；E Z H 2阻害剤、例えば、P F - 0 6 8 2 1 4 9 7；P R M T 5阻害剤、例えば、P F - 0 6 9 3 9 9 9 9；T G F R β r 1阻害剤、例えば、P F - 0 6 9 5 2 2 2 9；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まれる。

10

【0221】

一部の態様では、I L - 1 5バリエーションまたはI L - 1 5融合タンパク質は、例えば、限定されないが、P D - 1、P D - L 1、C T L A - 4、L A G - 3、B 7 - H 3、B 7 - H 4、B 7 - D C（P D - L 2）、B 7 - H 5、B 7 - H 6、B 7 - H 8、B 7 - H 2、B 7 - 1、B 7 - 2、I C O S、I C O S - L、T I G I T、C D 2、C D 4 7、C D 8 0、C D 8 6、C D 4 8、C D 5 8、C D 2 2 6、C D 1 5 5、C D 1 1 2、L A I R 1、2 B 4、B T L A、C D 1 6 0、T I M 1、T I M - 3、T I M 4、V I S T A（P D - H 1）、O X 4 0、O X 4 0 L、G I T R L、C D 7 0、C D 2 7、4 - 1 B B、4 - B B L、D R 3、T L 1 A、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 3 0、C D 3 0 L、L I G H T、H V E M、S L A M（S L A M F 1、C D 1 5 0）、S L A M F 2（C D 4 8）、S L A M F 3（C D 2 2 9）、S L A M F 4（2 B 4、C D 2 4 4）、S L A M F 5（C D 8 4）、S L A M F 6（N T B - A）、S L A M C F 7（C S 1）、S L A M F 8（B L A M E）、S L A M F 9（C D 2 F）、C D 2 8、C E A C A M 1（C D 6 6 a）、C E A C A M 3、C E A C A M 4、C E A C A M 5、C E A C A M 6、C E A C A M 7、C E A C A M 8、C E A C A M 1 - 3 A S、C E A C A M 3 C 2、C E A C A M 1 - 1 5、P S G 1 - 1 1、C E A C A M 1 - 4 C 1、C E A C A M 1 - 4 S、C E A C A M 1 - 4 L、I D O、T D O、C C R 2、C D 3 9 - C D 7 3 - アデノシン経路（A 2 A R）、B T K、T I K、C X C R 2、C C R 4、C C R 8、C C R 5、V E G F経路、C S F - 1または自然免疫応答モジュレーターを標的とする薬剤などの、免疫チェックポイントモジュレーターを標的とする1つまたは複数の他の治療剤と併せて使用される。

20

30

【0222】

一部の態様では、I L - 1 5バリエーションまたはI L - 1 5融合タンパク質は、バイオ治療剤および化学療法剤と併せて使用される。例えば、がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、有効量の記載されているI L - 1 5バリエーションまたはI L - 1 5融合タンパク質、ここでは、抗P D - L 1アンタゴニスト抗体、および化学療法剤（例えば、ゲムシタビン、メトトレキサートまたはプラチナ類似体）を対象に投与するステップを含む方法が提供される。一部の態様では、がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、有効量の記載されているI L - 1 5バリエーションまたはI L - 1 5融合タンパク質、ここでは、抗P D - 1アンタゴニスト抗体（例えば、ニボルマブ（O P D I V O（登録商標））、m A b 7（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開番号U S 2 0 1 6 0 1 5 9 9 0 5に記載されている）またはペンブロリズマブ（K E Y T R U D A（登録商標））、および化学療法剤（例えば、ゲムシタビン、メトトレキサートまたはプラチナ類似体）を対象に投与するステップを含む方法が提供される。一部の態様では、がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、有効量の記載されているI L - 1 5バリエーションまたはI L - 1 5融合タンパク質、ここでは、抗C T L A - 4アンタゴニスト抗体（例えば、イピリムマブ（Y E R V O Y（登録商標））、および化学療法剤（例えば、ゲムシタビン、メトトレキサートまたはプラチナ類似体）を対象に投与するステップを含む方法が提供される。

40

50

【0223】

一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質治療は、数分から数週間の範囲の間隔で他の薬剤処置に先行しても後続してもよい。他の薬剤および／またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドが別々に投与される態様では、一般に、各々の送達の間有意な期間が過ぎないことを確実にし、その結果、薬剤および本発明の組成物が対象に対して有利に組み合わせられた効果をなおも発揮することができる。このような場合、両方の様式を、互いに約12～24時間以内、より好ましくは、互いに約6～12時間以内に投与し得ることが企図される。一部の状況では、投与期間を有意に延長することが望ましい場合があるが、数日（2、3、4、5、6または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）がそれぞれの投与の間に経過する。

10

【0224】

一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質組成物は、クリゾチニブ、パルボシクリブ、ゲムシタビン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、FOLFOLX、フォリン酸、オキサリプラチン、アキシチニブ、スニチニブリンゴ酸、トファシチニブ、ベバシズマブ、リツキシマブ、およびトラスツズマブから選択される第2の薬剤を含む。

【0225】

一部の態様では、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質組成物は、手術、放射線治療、化学療法、標的化療法、免疫療法、ホルモン療法、血管新生阻害および苦痛緩和治療からなる群から選択される従来の治療をさらに含む処置レジメンと組み合わせられる。

20

製剤

本発明に従って使用されるIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質の治療製剤は、所望の純度を有するタンパク質を、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤（Remington、The Science and Practice of Pharmacy 第20版 Mack Publishing、2000）と混合することによって貯蔵のために調製される。許容される担体、賦形剤または安定剤は、利用される投薬量および濃度においてレシピエントに対して非毒性であり、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸および他の有機酸；塩化ナトリウムなどの塩；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリシン；グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む、単糖、二糖および他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および／または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）を含み得る。

30

40

【0226】

IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質を含有するリボソームは、当該分野で公知の方法、例えば、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688ページ（1985）；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030ページ（1980）；ならびに米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号に記載されている方法によって調製される。増進された循環時間を有するリボソームは、米国特許第5,013,556号に開

50

示されている。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成され得る。リポソームは、定められた孔径のフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームを生成する。

【0227】

有効成分はまた、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）において、またはマクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション技術により、または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に捕捉され得る。そのような技術は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第20版 Mack Publishing（2000）に開示されている。

【0228】

徐放性製剤が調製され得る。徐放性製剤の適切な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは、形作られた物品、例えば、薄膜またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸および7エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射用マイクロスフェア）、スクロース酢酸イソブチル、ならびにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

【0229】

in vivo投与のために使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に成し遂げられる。治療用IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質組成物は、一般に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針によって突き刺し可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアル中に配置される。

【0230】

本発明に従う組成物は、経口、非経口もしくは直腸投与、または吸入もしくはガス注入による投与のための単位剤形、例えば錠剤、丸剤、カプセル、粉末、顆粒、溶液もしくは懸濁液、または坐剤であり得る。

【0231】

固体組成物、例えば、錠剤を調製するために、主要な有効成分が、医薬用担体、例えば、従来の打錠用成分、例えば、トウモロコシデンプン、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウムまたはガム、および他の医薬用希釈剤、例えば、水と混合されて、本発明の化合物またはその非毒性の薬学的に許容される塩の均質な混合物を含有する固体前配合組成物（preformulation composition）を形成する。これらの前配合組成物が均質であると言及する場合、その組成物が等しく有効な単位剤形、例えば、錠剤、丸剤およびカプセル中にすぐに細分され得るように、有効成分が組成物全体にわたって均等に分散していることが意味されている。次いで、この固体前配合組成物は、約0.1～約500mgの本発明の有効成分を含有する上記の型の単位剤形中に細分される。新規組成物の錠剤または丸剤は、延長された作用の利点を与える剤形を提供するために、コートされるか、または他の方法で調合され得る。例えば、錠剤または丸剤は、内部投薬成分および外部投薬成分を含むことができ、後者は前者を覆う外膜の形態である。2つの成分は、胃における崩壊に耐える役目を果たし、内部の成分が完全な状態で十二指腸中へと通過することまたはその放出が遅延することを可能にする腸溶層により隔てられ得る。様々な材料が、そ

のような腸溶層またはコーティングのために使用され得、そのような材料は、いくつかのポリマー性の酸ならびにポリマー性の酸の、シェラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースのような材料との混合物を含む。

【0232】

適切な表面活性剤には、特に、非イオン性薬剤、例えば、ポリオキシエチレンソルビタン（例えば、Tween（商標）20、40、60、80または85）および他のソルビタン（例えば、Span（商標）20、40、60、80または85）が含まれる。表面活性剤を含む組成物は、好都合には0.05から5%の間の表面活性剤を含み、それは0.1から2.5%の間であり得る。他の成分、例えば、マンニトールまたは他の薬学的に許容されるビヒクルが、必要に応じて添加されてもよいことは、理解される。

10

【0233】

適切なエマルジョンは、商業的に入手可能な脂肪エマルジョン、例えば、Intralipid（商標）、Liposyn（商標）、Infonutrol（商標）、Lipofundin（商標）およびLipiphysan（商標）を使用して調製され得る。有効成分は、予め混合されたエマルジョン組成物中で溶解させることができるか、あるいはそれは油（例えば、ダイズ油、ベニバナ油、綿実油、ゴマ油、トウモロコシ油またはアーモンド油）中で溶解させることもでき、リン脂質（例えば、卵リン脂質、ダイズリン脂質またはダイズレシチン）および水との混合の際にエマルジョンが形成される。エマルジョンの張性を調節するために、他の成分、例えば、グリセロールまたはグルコースが添加されてもよいことは、理解される。適切なエマルジョンは、典型的に、20%までの、例えば、5から20%の間の油を含有する。脂肪エマルジョンは、0.1から1.0 μm の間、特に0.1から0.5 μm の間の脂肪液滴を含むことができ、5.5～8.0の範囲のpHを有することができる。

20

【0234】

エマルジョン組成物は、IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質をIntralipid（商標）またはその成分（ダイズ油、卵リン脂質、グリセロールおよび水）と混合することにより調製されたエマルジョン組成物であり得る。

【0235】

吸入またはガス注入のための組成物は、薬学的に許容される水性もしくは有機性溶媒中の溶液および懸濁液、またはそれらの混合物、ならびに粉末を含む。液体または固体組成物は、上記で述べられたような適切な薬学的に許容される賦形剤を含有し得る。一部の態様では、組成物は、局所または全身作用のために、経口または経鼻呼吸経路により投与される。好ましくは無菌の薬学的に許容される溶媒中の組成物は、ガスの使用により噴霧され得る。噴霧された溶液は、噴霧デバイスから直接呼吸され得るか、または噴霧デバイスは、フェイスマスク、テントもしくは断続的陽圧呼吸模擬装置に取り付けられ得る。溶液、懸濁液または粉末組成物は、好ましくは経口または経鼻で、製剤を適切な様式で送達するデバイスから投与され得る。

30

キット

本発明はまた、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質のいずれかまたは全てを含むキットも提供する。本発明のキットは、本明細書に記載されているIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質を含む1つまたは複数の容器および本明細書に記載されている本発明の方法のいずれかに従う使用のための説明書を含む。一般に、これらの説明書は、上記の治療的処置のためのIL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質の投与の記載を含む。一部の態様では、キットは、単一用量の投与単位を産生するために提供される。ある特定の態様では、キットは、乾燥タンパク質を有する第1の容器および水性製剤を有する第2の容器の両方を含有し得る。ある特定の態様では、単一および複数チャンバーの事前充填シリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ（lyosyringe））を含有するキットが含まれる。

40

【0236】

IL-15バリエーションまたはIL-15融合タンパク質の使用に関する説明書は、一般

50

に、投薬量、投薬スケジュール、および意図した処置のための投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルク包装（例えば、多用量包装）またはサブ単位用量であり得る。本発明のキット中で提供される説明書は、典型的に、ラベルまたは添付文書（例えば、キット中に含まれる紙シート）上の書面による説明書であるが、機械可読指示書（例えば、磁気記憶ディスクまたは光学記憶ディスク上で運搬される説明書）もまた許容される。

【0237】

本発明のキットは適切な梱包材料中にある。適切な梱包材料には、バイアル、ビン、ジャー、可撓性梱包材料（例えば、密封 Mylar またはプラスチックバッグ）などが含まれるがこれらに限定されない。特定のデバイス、例えば、吸入器、鼻孔投与デバイス（例えば、アトマイザー）または注入デバイス、例えばミニポンプと組み合わせた使用のための包装もまた企図される。キットは、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって突き刺し可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る）。容器もまた、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって突き刺し可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性な薬剤は IL-15 バリエーションまたは IL-15 融合タンパク質である。容器は第2の薬学的に活性な薬剤をさらに含んでもよい。

【0238】

キットは、任意選択に、さらなる成分、例えば、緩衝液および解釈情報を提供してもよい。通常、キットは、容器および容器上または容器に付随したラベルまたは添付文書を含む。

生物学的寄託

本発明の代表的な材料を、2019年1月23日にアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection)、10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209、米国に寄託した。ATCC 受託番号 PTA-125686 を有するベクター VK1-39 は、抗体 VK1-39 軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドであり、ATCC 受託番号 PTA-125685 を有するベクター VH1-69b-Ho-2 は、VH1-69 重鎖可変領域および IL-15 バリエーション M2 をコードするポリヌクレオチドである。寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約の条項とその下の規制 (the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations thereunder) (ブダペスト条約) の下で行った。これは、寄託の日から30年間の寄託物の生存培養の維持を保証する。寄託物は、ブダペスト条約の条項の下で、かつ Pfizer, Inc. と ATCC との間の同意に従って ATCC により入手可能にされることになり、この同意は、関連する米国特許が発行された際または任意の米国もしくは外国特許出願が公衆に公開された際のいずれか早い方に、公衆に寄託物の培養物の子孫の永続的かつ非制限的利用可能性を保証し、米国特許法第122条およびそれに従う長官規則 (連邦規則法典第37巻第1.14条を含み、886 O.G. 38 を特に参照して) に従って資格を与えると米国特許商標庁長官が決定した者に子孫の利用可能性を保証する。

【0239】

本出願の譲受人は、寄託されている材料の培養物が、適切な条件下で培養された場合に死滅し、または喪失もしくは破壊された場合、材料を別の同じものと通知後即座に置き換えることに同意している。寄託された材料の利用可能性は、任意の政府の権限下でその特許法に従って付与された権利に違反して発明を実施するライセンスとして解釈されるべきでない。

【0240】

以下の実施例は、例示目的のためにのみ提供され、本発明の範囲を限定することは決して意図しない。実際、本明細書に示され、記載されているものに加えた、本発明の種々の修飾は、上述の説明から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲の範囲内に入る。

【実施例】

【0241】

実施例 1

条件培地におけるヒト IL-15 バリエントの調製および抗体-IL-15 融合タンパク質の精製

この実施例は、条件培地におけるヒト IL-15 バリエントの産生および本明細書に記載されている種々の IL-15 融合タンパク質の精製を例示する。

10

【0242】

表 1～2 に示しているような突然変異を有する各々のカルボキシル末端 8-ヒスチジン-AVI タグ化 IL-15 突然変異体の 4 マイクログラムの DNA を、24 ウェルブロックの各ウェルにおいて約 3×10^6 細胞/mL の密度にて Expi-293 細胞に一過性にトランスフェクトした。トランスフェクション後の 5 日後、分泌した IL-15 突然変異体を含む細胞の条件培地上清を遠心分離によって回収し、96 ウェルブロックに移し、続いて濾過し、動態および親和性決定の準備をした。

【0243】

抗体-IL-15 融合タンパク質（例えば、表 1～2 に示すような IL-15 突然変異を有する PD-1 抗体）を、約 3×10^6 細胞/mL の密度にて Expi-293 細胞において抗体重鎖-IL-15 キメラ、抗体重鎖および抗体軽鎖の DNA プラスミドによる一過性トランスフェクションによって産生した。トランスフェクション後の 5 日後、分泌した抗体-IL-15 融合タンパク質を含む細胞の上清を遠心分離によって回収し、続いて濾過した。次いで抗体-IL-15 融合タンパク質を、Mab Select Sure カラム（GE Lifesciences、Marlborough、MA）上のプロテイン A アフィニティークロマトグラフィー、ニッケルアフィニティークロマトグラフィー、Mono S 5/50 GL または Mono S 10/100 GL カラム（GE Lifesciences、Marlborough、MA）上のイオン交換クロマトグラフィー、および HiLoad 16/600 Superdex 200 分取グレードまたは HiLoad 26/600 Superdex 200 分取グレードカラム（GE Lifesciences、Marlborough、MA）上のサイズ排除クロマトグラフィーを使用して細胞上清から精製した。

20

30

【0244】

実施例 2

37℃でのヒト IL-15 バリエントまたは抗 PD-1-h IL-15 融合タンパク質/IL-15 R α および IL-2 R β 相互作用の動態および親和性の決定

この実施例は、37℃でヒト IL-15 R α およびヒト IL-2 R β に結合する種々のヒト IL-15 バリエントの動態および親和性を例示する。

【0245】

全ての実験は、Biacore 8K または Biacore 4000 表面プラズモン共鳴ベースのバイオセンサ（GE Lifesciences、Marlborough、MA）で実施した。抗 AVI タグセンサチップを、10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20、pH 7.4 のランニング緩衝液を用いて 25℃にて調製した。Biacore CM4 センサチップの全ての表面を、10 μ L/分の流速にて 7 分間、400 mM EDC および 100 mM NHS の 1:1 (v/v) 混合物を用いて活性化した。抗 Avi 試薬（ウサギ抗 Avi タグ、Genscript カタログ番号 A00674-200）を 10 mM 酢酸ナトリウム（pH 4.5）中で 30 μ g/mL に希釈し、20 μ L/分にて 7 分間、全てのフローセル上に注入した。全てのフローセルを、10 μ L/分にて 7 分間、200 mM のホウ酸塩緩衝液 pH 8.5 中の 100 mM のエチレンジアミンを用いてブロックした。

40

50

【0246】

全てのタンパク質相互作用実験は、10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20、pH7.4、1mg/mL BSAのランニング緩衝液を使用して37℃にて実施した。Biacore 4000で実施した実験に関して、Aviタグ化IL-15バリエントを、10μL/分の流速にて2分間、フローセル1、2、3および4上のスポット1および5上に、希釈していない上清から捕捉した。異なる突然変異体を各スポット上に捕捉した。フローセル1、2、3および4上のスポット2および4を参照表面として使用した。IL15バリエントの捕捉後、分析物（緩衝液、12.3nM、37nM、111nM、333nMおよび1μM濃度のヒトIL-15RαまたはヒトIL-2Rβ）を、30μL/分の流速にて2分間、全てのフローセル中に注入した。各分析物の注入後、解離を5分間モニターし、続いて75mMリン酸の3回の30秒の注入により全てのフローセルを再生した。緩衝液サイクルを、二重参照目的（Myszka, D. G., Improving biosensor analysis. J. Mol. Recognit. 12, 279~284ページ（1999）に記載されている二重参照）のために、各々の捕捉したIL-15V49R突然変異体について収集した。動態分析のために、二重参照センサーグラムを、Biacore 4000評価ソフトウェアバージョン1.1を使用して、マストランSPORT結合モデルを用いた単純な1:1ラングミュア（Langmuir）に全体的に適合させた。定常状態親和性分析のために、二重参照平衡結合応答を、Biacore 4000評価ソフトウェアバージョン1.1を使用して1:1ラングミュア定常状態モデルに適合させた。

10

20

【0247】

Biacore 8Kで実施した実験に関して、Aviタグ化IL-15バリエントを、各チャンネルにおけるフローセル2上で10μL/分にて2分間、希釈していない上清から捕捉し、一方で、フローセル1を参照表面として使用した。異なるIL-15バリエントを各チャンネルにおいて捕捉した。IL-15V49R突然変異体の捕捉後、分析物（緩衝液、3.2nM、16nM、80nM、400nM、1840nMのヒトIL-15Rαおよび0.8nM、4nM、20nM、100nM、500nMのヒトIL-2Rβ）を、30μL/分の流速にて2分間、両方のフローセル上に注入した。各分析物の注入後、解離を10分間モニターし、続いて75mMのリン酸の3回の30秒の注入により全てのフローセルを再生した。緩衝液サイクルを、二重参照目的（Myszka, D. G., Improving biosensor analysis. J. Mol. Recognit. 12, 279~284ページ（1999）に記載されている二重参照）のために、各々の捕捉したIL-15バリエントについて収集した。動態分析のために、二重参照センサーグラムを、Biacore 8K評価ソフトウェアバージョン1.1.1.7442を使用して、マストランSPORT結合モデルを用いた単純な1:1ラングミュアに全体的に適合させた。定常状態親和性分析のために、二重参照平衡結合応答を、Biacore 8K評価ソフトウェアバージョン1.1.1.7442を使用して1:1ラングミュア定常状態モデルに適合させた。

30

【0248】

試験したIL-15バリエントについての動態および親和性パラメーターを表1~2に示す。「IL-15Rasu」という用語は、IL-15Rアルファsushiドメインを指す。

40

【0249】

以下の実施例は、37℃でヒトIL-15RαおよびヒトIL-2Rβに結合する種々の抗PD-1-hIL-15融合タンパク質の動態および親和性を決定する。実験は、Biacore T200表面プラズモン共鳴ベースのバイオセンサ（GE Lifesciences, Marlborough, MA）で実施した。

【0250】

抗ヒトFcセンサチップを、10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20、pH7.4のランニング緩衝液を用いて25℃にて調製

50

した。Biacore CM4 センサチップの全ての表面を、 $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ の流速にて7分間、 400mM EDC および 100mM NHS の $1:1$ (v/v) 混合物を用いて活性化した。抗ヒトFc 試薬 (ヤギ抗ヒトIgG Fc- γ 特異的、Southern Biotech、Birmingham、AL、カタログ番号2014-01) を、 10mM の酢酸ナトリウム ($\text{pH} 4.5$) 中で $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、 $20\ \mu\text{L}/\text{分}$ にて7分間、全てのフローセル上に注入した。全てのフローセルを、 $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ にて7分間、 200mM のホウ酸塩緩衝液 $\text{pH} 8.5$ 中の 100mM のエチレンジアミンを用いてブロックした。

【0251】

全てのタンパク質相互作用実験は、 10mM HEPES、 150mM NaCl、 0.05% (v/v) Tween-20、 $\text{pH} 7.4$ 、 $1\text{mg}/\text{mL}$ BSA のランニング緩衝液を使用して 37°C にて実施した。抗PD-1-hIL-15 融合タンパク質を、 $10\ \mu\text{L}/\text{分}$ の流速にて2分間、 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ にて捕捉した。異なる融合タンパク質をフローセル2、3および4中に捕捉した。参照表面として使用したフローセル1上にタンパク質は捕捉されなかった。融合タンパク質の捕捉後、分析物 (緩衝液、 12.3nM 、 37nM 、 111nM 、 333nM 、 1000nM および 3000nM 濃度のヒトIL-15R α またはヒトIL-2R β) を、 $30\ \mu\text{L}/\text{分}$ の流速にて2分間、全てのフローセル中に注入した。各分析物の注入後、解離を5分間モニターし、続いて 75mM リン酸の3回の60秒の注入により全てのフローセルを再生した。緩衝液サイクルを、二重参照目的 (Myszka、D. G. Improving biosensor analysis. J. Mol. Recognit. 12、279~284 ページ (1999) に記載されている二重参照) のために、各々の捕捉した融合タンパク質について収集した。動態分析のために、二重参照センサーグラムを、Biacore T200 評価ソフトウェアバージョン2.0を使用して、マストランスポート結合モデルを用いた単純な $1:1$ ラングミュアに全体的に適合させた。定常状態親和性分析のために、二重参照平衡結合応答を、Biacore T200 評価ソフトウェアバージョン2.0を使用して $1:1$ ラングミュア定常状態モデルに適合させた。

【0252】

抗PD-1-hIL-15 バリエント融合タンパク質についての動態および親和性パラメーターを表3~5に示す。

【0253】

10

20

30

【表 4】

表1. ヒトIL-15 α 結合を低減させた非融合ヒトIL-15バリエーションについての動態および親和性パラメーター:

突然変異体	hIL-15 α 動態			hIL-15R α K _D (nM)	hIL-2R β K _D (nM)	より低いhIL-15R α 親和性V49R?
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (分)			
IL-15R α -IL-15	N/A	N/A	N/A	結合なし	69.6*	—
IL-15 (野生型)	9.0E+06	2.1E-04	55.85	0.023	31	—
V49R	N/A	N/A	N/A	91.9*	109*	—
V49A	1.27E+06	1.11E-03	10.42	0.874	N/A	いいえ
V49E	N/A	N/A	N/A	43.4*	N/A	いいえ
V49G	1.69E+06	7.33E-03	1.58	4.32	N/A	いいえ
V49H	N/A	N/A	N/A	28.5*	N/A	いいえ
V49K	N/A	N/A	N/A	241*	86.6*	はい
V49N	2.07E+06	3.85E-03	3.00	1.86	N/A	いいえ
V49Q	1.56E+06	1.28E-02	0.91	8.17	N/A	いいえ
V49S	2.06E+06	2.77E-03	4.17	1.34	N/A	いいえ
Y26H	N/A	N/A	N/A	10.9*	87*	いいえ
Y26K	N/A	N/A	N/A	146*	75.7*	はい
Y26R	N/A	N/A	N/A	96.8*	57.9*	はい
E46G	N/A	N/A	N/A	267*	141*	はい

*速い動態に起因して定常状態親和性分析を使用した

【 0 2 5 4 】

【表 5 - 1】

表2. ヒトIL-2R β 結合を低減させたV49R突然変異のバックグラウンドにおける非融合ヒ

トIL-15バリエーションについての親和性パラメーター:

位置	突然変異	hIL-2R β K _D (nM)	hIL-15R α K _D (nM)	300nM超まで低 減したhIL-2R β K _D
IL-15 ^Δ	WT	21.6	0.023	N/A
IL-15Ras ^Δ -IL15 ^Δ	WT	54.4	N/A	N/A
V49	R	97.5	94.2	いいえ
N1	A	398	175	はい
N1	D	311	105	はい
N1	K	>500	264	はい
N1	S	194	140	いいえ
N1	H	235	151	いいえ
N1	R	479 *	243	はい
N1	E	340	171	はい
N1	T	249	104	いいえ
N1	Q	>500	115	はい
N1	G	>500	160	はい
N1	P	不明確(LC)	結合 [#] (LC)	N/A
N1	I	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
N1	L	結合 [#] (LC)	結合 [#] (LC)	N/A
N1	M	結合 [#] (LC)	結合 [#] (LC)	N/A
N1	F	結合 [#] (LC)	結合 [#] (LC)	N/A
N1	Y	結合 [#]	結合 [#]	N/A
N1	W	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
N1	V	結合 [#] (LC)	結合 [#] (LC)	N/A
N4	A	>500	98	はい
N4	D	365	103	はい
N4	K	結合なし	73.1	はい
N4	S	結合なし	94.7	はい
N4	H	96.4	81.5	いいえ
N4	R	結合 [#]	56.1	N/A
N4	E	311	79.8	はい
N4	T	不明確	88.6 (およそ)	いいえ
N4	Q	>500	59.5	はい
N4	G	>500	105	はい
N4	P	結合 [#]	356	N/A
N4	I	結合なし	結合 [#]	はい
N4	L	429	98.6	はい
N4	M	233	88.1	いいえ
N4	F	247	結合 [#]	いいえ
N4	Y	117*	結合 [#]	はい
N4	W	438	143	いいえ
N4	V	結合 [#]	結合 [#]	N/A

【 0 2 5 5 】

【表 5 - 2】

S7	A	220	84	いいえ
S7	D	>500	121	はい
S7	K	>500	103	はい
S7	N	>500	93.2	はい
S7	H	354	75.6	はい
S7	R	>500	77	はい
S7	E	>500	87.6	はい
S7	T	>500	93.9	はい
S7	Q	215	88.1	いいえ
S7	G	>500	147	はい
S7	P	結合#	>500	N/A
S7	I	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
S7	L	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
S7	M	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
S7	F	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
S7	Y	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
S7	W	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
S7	V	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
D8	A	結合なし	102	はい
D8	K	結合なし	101	はい
D8	S	結合なし	124	はい
D8	N	結合なし	119	はい
K10	A	321	150	はい
K10	D	>500	270	はい
K10	S	496	195	はい
K10	N	230	128	いいえ
K10	H	114	85.6	いいえ
K10	R	146	94.5	いいえ
K10	E	360	126	はい
K10	T	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
K10	Q	250	100	いいえ
K10	G	>500	209	はい
K10	P	結合なし	結合#	はい
K10	I	不明確	結合#	N/A
K10	L	348	124	はい
K10	M	391	122	はい
K10	F	結合#(LC)	結合#(LC)	N/A
K10	Y	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
K10	W	185	101	いいえ
K10	V	結合#	結合#	N/A
K11	A	206	191	いいえ
K11	D	>500	242	はい
K11	S	453	194	はい
K11	N	291	217	いいえ
K11	H	104	147	いいえ
K11	R	138	140	いいえ
K11	E	160	159	いいえ
K11	T	225	169	いいえ

【 0 2 5 6 】

【表 5 - 3】

K11	Q	107	156	いいえ
K11	G	結合#	結合#	N/A
K11	P	結合なし	結合#	N/A
K11	I	76	95.8	いいえ
K11	L	92.2	142	いいえ
K11	M	180	結合#	いいえ
K11	F	162	結合#	いいえ
K11	Y	143	219	いいえ
K11	W	346 *	361	はい
K11	V	110	142	いいえ
S29	A	274	154	いいえ
S29	D	238	121	いいえ
S29	K	248	261	いいえ
S29	N	322	154	はい
D30	A	273	151	いいえ
D30	K	351	158	はい
D30	S	249	146	いいえ
D30	N	163	94	いいえ
D30	H	149	121	いいえ
D30	R	290	155	いいえ
D30	E	165	124	いいえ
D30	T	269	184	いいえ
D30	Q	197	111	いいえ
D30	G	513 *	結合#	はい
D30	P	結合#	結合なし	N/A
D30	I	201	197	いいえ
D30	L	277	237	いいえ
D30	M	238	142	いいえ
D30	F	213	166	いいえ
D30	Y	231	159	いいえ
D30	W	321	結合#	はい
D30	V	258	153	いいえ
V31	A	269	129	いいえ
V31	K	>500	結合なし	はい
V31	S	>500	265	はい
V31	D	>500	>500	はい
H32	A	218	152	いいえ
H32	K	149	92.8	いいえ
H32	S	176	110	いいえ
H32	D	123	85.5	いいえ
H32	N	124	85.9	いいえ
H32	R	156	131 (およそ)	いいえ
H32	E	130	108	いいえ
H32	T	186	結合#	いいえ
H32	Q	147	64	いいえ
H32	G	459	249	はい
H32	P	146	162	いいえ
H32	I	110	113	いいえ
H32	L	159	189	いいえ

【 0 2 5 7 】

【表 5 - 4】

H32	M	161	134	いいえ
H32	F	315 *	結合 [#]	はい
H32	Y	結合 [#]	結合 [#]	N/A
H32	W	376	結合 [#]	はい
H32	V	247	99.8	いいえ
D61	A	>500	78.2	はい
D61	K	結合なし	116	はい
D61	S	結合なし	102	はい
D61	N	結合なし	121	はい
E64	A	>500	130	はい
E64	K	結合なし	164	はい
E64	N/S	>500	130	はい
E64	N	>500	115	はい
E64	D	291	108	いいえ
E64	H	>1000	112	はい
E64	R	結合 [#]	結合 [#]	N/A
E64	T	>500	141	はい
E64	Q	>500	127	はい
E64	G	結合 [#]	結合 [#]	N/A
E64	P	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
E64	I	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
E64	L	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
E64	M	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
E64	F	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
E64	Y	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
E64	W	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
E64	V	不明確(LC)	結合 [#]	N/A
N65	A	結合なし	202	はい
N65	K	193	201	いいえ
N65	S	結合なし	158	はい
N65	D	>500	121	はい
I68	A	>500	113	はい
I68	K	結合なし	94.2	はい
I68	S	結合なし	104	はい
I68	D	結合なし	106	はい
I68	H	>1000	87.6	はい
I68	R	>500	102	はい
I68	T	>500	76.3	はい
I68	Q	不明確	132	N/A
I68	G	結合 [#]	101	N/A
I68	P	結合なし	結合なし	はい
I68	N	>1000	85	はい
I68	L	245	73.6	いいえ
I68	M	≥1000	96.2	はい
I68	F	>1000	78.5	はい
I68	Y	>1000	92.9	はい
I68	W	結合 [#]	93.7	N/A
I68	V	296	104	いいえ
I68	E	結合 [#]	122	N/A

【表 5 - 5】

L69	A	>500	82.9	はい
L69	K	結合なし	結合なし	はい
L69	S	>500	78.2	はい
L69	D	>500	65.6	はい
L69	H	結合#	54.5	N/A
L69	R	不明確	111	N/A
L69	T	>1000	63.6	はい
L69	Q	結合#	43.3 (およそ)	N/A
L69	G	結合#	結合#	N/A
L69	P	結合なし	結合なし	はい
L69	I	306	93.1	はい
L69	N	結合#	44	N/A
L69	M	≥1000	74.5	はい
L69	F	不明確	106	N/A
L69	Y	不明確	137	N/A
L69	W	不明確(LC)	不明確(LC)	N/A
L69	V	>1000	85.5	はい
L69	E	>1000	47.8	はい
N72	A	148	117	いいえ
N72	D	101	105	いいえ
N72	K	>500	101	はい
N72	S	182	118	いいえ
Q108	A	462	161	はい
Q108	D	215	125	いいえ
Q108	K	249	85.4	いいえ
Q108	S	290	144	いいえ
M109	A	>500	198	はい
M109	K	>500	215	はい
M109	S	362	190	はい
M109	D	339	288	はい
I111	A	375	173	はい
I111	K	397	199	はい
I111	S	>500	223	はい
I111	D	>500	214	はい

^ 野生型 IL-15 および IL-15Rsu-IL15 は V49R 突然変異を含有しない

* 報告された親和性は動態適合からのものである(述べられた全ての他の K_D 値は定常状態 K_D 値である)

適合は低い応答のために得ることができなかった

LC 上清の低い捕捉率

【0 2 5 9】

10

20

30

【表 6】

表3. ヒトIL-2R β 結合に対する抗PD-1-hIL-15バリエーション融合タンパク質についての親和性パラメーター:

突然変異体	hIL-2R β 動態			K _D (nM)
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (s)	
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15	2.36E+06	9.88E-02	7.00	41.8
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N)	N/A	N/A	N/A	271*
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/I68S)	N/A	N/A	N/A	>3000
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/N4K)	N/A	N/A	N/A	767*
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/M109A)	N/A	N/A	N/A	315*
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/I68S/M109A)	N/A	N/A	N/A	>1500
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/N4K/M109A)	N/A	N/A	N/A	>3000
Ab8.8-hIL15Rasu-hIL15	2.62E+06	9.71E-02	7.14	37.1
xmPD-1-hIL15(野生型)	N/A	N/A	N/A	561
xmPD-1-hIL15 V49R	N/A	N/A	N/A	494*
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G	N/A	N/A	N/A	437*
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/N1A/D30N	N/A	N/A	N/A	433*
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/N1G/E64Q/D30N	N/A	N/A	N/A	>1500
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/N1G/N4Q/D30N	N/A	N/A	N/A	>1500
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N	N/A	N/A	N/A	>3000
xmPD-1-hIL15 V49R/Y26K/E64Q/D30N	N/A	N/A	N/A	>1500
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/I68S	N/A	N/A	N/A	結合なし
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/N4K	N/A	N/A	N/A	結合なし
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/M109A	N/A	N/A	N/A	>3000
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/I68S/M109A	N/A	N/A	N/A	結合なし
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/N4K/M109A	N/A	N/A	N/A	結合なし
xmPD-1-hIL15 V49R/E46Q	N/A	N/A	N/A	560*
xmPD-1-hIL15 V49R/E53Q	N/A	N/A	N/A	590*
xmPD-1-hIL15 V49R/E93Q	N/A	N/A	N/A	451*
xmPD-1-hIL15 NQ突然変異体	N/A	N/A	N/A	518*
xmPD-1-hIL15 NQ-3d	N/A	N/A	N/A	446*
xmPD-1-hIL15 NQ-2a	N/A	N/A	N/A	514*
xmPD-1-hIL15 NQ-2b	N/A	N/A	N/A	724*
xmPD-1-hIL15 NQ-2c	N/A	N/A	N/A	262*
Ab8.8-hIL15 NQ突然変異体	N/A	N/A	N/A	506*

*速い動態に起因して定常状態親和性分析を使用した

【 0 2 6 0 】

【表 7】

表4. ヒトIL-15R α 結合に対する抗PD-1-hIL-15バリエーション融合タンパク質についての親和性パラメーター:

突然変異体	hIL-15R α 動態			K _D (nM)
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (s)	
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15	結合なし			
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N)	結合なし			
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/I68S)	結合なし			
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/N4K)	結合なし			
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/M109A)	結合なし			
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/I68S/M109A)	結合なし			
xmPD-1-hIL15Rasu-hIL15(E64Q/D30N/N4K/M109A)	結合なし			
Ab8.8-hIL15Rasu-hIL15	結合なし			
xmPD-1-hIL15(野生型)	4.31E+06	3.63E-04	N/A	0.084
xmPD-1-hIL15 V49R	N/A	N/A	N/A	119*
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/N1A/D30N	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/N1G/E64Q/D30N	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/N1G/N4Q/D30N	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/Y26K/E64Q/D30N	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/I68S	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/N4K	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/M109A	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/I68S/M109A	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46G/E64Q/D30N/N4K/M109A	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E46Q	結合なし			
xmPD-1-hIL15 V49R/E53Q	N/A	N/A	N/A	>1500
xmPD-1-hIL15 V49R/E93Q	N/A	N/A	N/A	943*
xmPD-1-hIL15 NQ突然変異体	結合なし			
xmPD-1-hIL15 NQ-3d	結合なし			
xmPD-1-hIL15 NQ-2a	N/A	N/A	N/A	>3000
xmPD-1-hIL15 NQ-2b	結合なし			
xmPD-1-hIL15 NQ-2c	1.06E+06	2.84E-02	24.4	26.8
Ab8.8-hIL15 NQ突然変異体	結合なし			

*速い動態に起因して定常状態親和性分析を使用した

【0261】

【表 8】

表5. ヒトPD-1結合に対する抗ヒトPD-1-hIL-15バリエーション融合タンパク質についての親和性パラメーター:

突然変異体	hPD-1動態			K _D (nM)
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (s)	
Ab8.8-hIL15Rasu-IL15	N/A	N/A	N/A	結合なし
xhPD1-hIL15Rasu-IL15	1.63E+05	5.41E-04	1281.2	3.32
xhPD1-hIL15 NQ突然変異体	1.73E+05	5.96E-04	1163.8	3.44

【0262】

実施例 3

IL-15受容体の構成的発現およびPD-1の誘導的発現を伴うレポーター細胞株の構

10

20

30

40

50

築

この実施例は、I L-15 ベースの分子の生物活性を評価するために有用なレポーター細胞株を確立するための方法を実証する。

【0263】

本明細書に記載されている I L-15 ベースの分子をアッセイするために、I L-15 に対する機能的応答を有するレポーター細胞株を生成し、P D-1-標的駆動活性の効果をアッセイするために使用した。この目的のために、以下の特性：(1) 機能的 I L-15 シグナル伝達受容体の構成的発現：I L-2 R β (C D 1 2 2 としても知られている)、および共通ガンマ鎖 (C D 1 3 2 としても知られている)；ならびに (2) ヒトまたはマウス P D-1 のいずれかの誘導的発現を伴うレポーター細胞株を構築した。

10

【0264】

レンチウイルス系を、Met z g e r, T. ら、C a n c e r R e s. 7月1日；76 (13)：3684～9 ページ (2016)) によって以前に記載されているように使用した。全長ヒト I L-2 R β を発現させるために、プラスミド p R F 7 9 1 も生成した。簡潔に述べると、T u r b o G F P 蛍光タンパク質をコードする c D N A 配列、続いて短いグリシン-セリンリンカー配列、ウイルス T 2 A 配列、および全長ヒト C D 1 2 2 (I L-2 R β) 配列を、それらが E F 1 アルファプロモーターの制御下で発現されるように、レンチウイルストランスファクターにクローニングした。p R F 7 9 1 を使用して、Met z g e r, T. ら (2016) に記載されているようにレンチウイルス粒子を生成し、得られたウイルスを使用して、アメリカンタイプカルチャーコレクション (A T C C) に記載されているように通常、培地中で増殖させるネズミ 3 2 D 細胞株を形質導入した。この細胞株を、それがマウス I L 2 R b またはマウス I L-15 R アルファではなく、共通ガンマ鎖のみを発現するために選択し、以前に I L-15 生物活性をアッセイするための宿主としても使用した (例えば、Z h u, X. ら、J I m m u n o l. 2009 年 9 月 15 日；183 (6)：3598～607 ページを参照のこと。形質導入細胞を、100 μ g / m L のブラストサイジンに対する耐性および G F P 蛍光によって同定した。細胞のブラストサイジン耐性、G F P 発現集団を選択し、系統ポリクローナル株 3 2 D [p R F 7 9 1] として維持した。

20

【0265】

ドキシサイクリン誘導性 T e t O n 3 g プロモーターの制御下でヒトまたはマウス P D-1 を発現させるために、m C h e r r y 蛍光タンパク質をコードする c D N A 配列、続いて短いグリシン-セリンリンカー配列、ウイルス T 2 A 配列、および全長ヒトまたはマウス P D-1 を、レンチウイルストランスファクター p L V X-S F F V-P u r o-P 2 A-T e t O n 3 G にクローニングした (例えば、Met z g e r ら (2016) を参照のこと)。得られたベクターである、p R F 7 6 8 (ヒト P D-1 を発現する) および p R F 7 7 0 (マウス P D-1 を発現する) を各々使用して、Met z g e r, T. ら (2016) に記載されているようにレンチウイルス粒子を生成し、得られたウイルスを使用して 3 2 D [p R F 7 9 1] 細胞株を形質導入した。形質導入細胞を、100 μ g / m L のブラストサイジン+10 μ g / m L のピューロマイシンに対する耐性、ならびに G F P および m C h e r r y 蛍光によって同定した。細胞のブラストサイジン耐性、ピューロマイシン耐性、G F P 発現集団を選択し、それらが p R F 7 6 8 または p R F 7 7 0 由来のウイルスを形質導入したかどうかに応じて、それぞれ、ポリクローナル株 3 2 D [p R F 7 6 8 + p R F 7 9 1] または 3 2 D [p R F 7 7 0 + [p R F 7 9 1] として維持した。

30

40

【0266】

m C h e r r y-P D-1 の誘導的発現を、ドキシサイクリン (1 μ g / m L 最終濃度まで) を 12～16 時間添加し、続いてフローサイトメトリーによる m C h e r r y 発現の分析によって、3 2 D [p R F 7 6 8 + p R F 7 9 1] および 3 2 D [p R F 7 7 0 + p R F 7 9 1] において確認した。I L-2 R b および P D-1 の発現もまた、それぞれ、C D 1 2 2 (I L-2 R β) または P D-1 に特異的な抗体による染色によって確認し

50

た。

【0267】

クローン細胞株を確立するために、32D [pRF768+pRF791] または32D [pRF770+pRF791] 細胞を1ug/mLのドキサイクリンにより12～16時間誘導し、次いでGFPおよびmCherry蛍光についてフローサイトメトリーによって分析した。蛍光強度の上位十分位数内に入る各細胞株の単一細胞を96ウェルプレートの特有のウェルに選別し、細胞の小さなコロニーが現れるまで2週間培養した。これらのコロニーを増殖させて単一細胞クローン株を生成し、これを導入遺伝子発現についてフローサイトメトリーによって確認した。

【0268】

10

実施例4

レポーター細胞株に対する抗体-I L 15キメラ分子の結合アッセイ

この実施例は、抗体結合標的の発現を伴うかまたは伴わないいずれかの、I L-15受容体(CD122+CD132)を発現する細胞に対する抗体-サイトカイン融合分子の直接結合をアッセイするための方法を記載している。

【0269】

細胞に対する抗体-I L-15分子の結合を検出するために、精製した組換え分子の各々約200マイクログラムを、Click-IT Alexa Fluor 647 s DIBO Alkyneキットを使用し、製造業者のプロトコールに従ってAlexa 647フルオロフォアにより標識した。この実施例および後の全ての実施例に記載されている抗体およびキメラ分子を以下の表6にまとめる：

20

【0270】

【表 9 - 1】

表 6: 以下の全ての実施例において利用した分子のリスト:

名称	関連する配列番号	簡単な説明
xmPD-1	12(VH)+64(CH1-ヒンジ-IgG2dA-D265A-CH2-CH3)+30(LC:VK-CK)	ヒト IgG2dA 定常領域を有する抗マウス PD-1(クローン F12.3)
xmPD-1-IL15RaSu-IL15*	28(R-アーム)+22(E-アーム)+30	ヒト IL15Ra Sushi ドメイン-ヒト IL15(野生型成熟タンパク質配列)との抗マウス PD-1(クローン F12.3)IgG 融合
xmPD-1-IL15 NQ*	28 + 29 + 30	ヒト IL15 NQ バリエーション(配列番号 1 の 6 個の突然変異 D22N/Y26F/E46Q/E53Q/E89Q/E93Q、IL-15R アルファとの結合をなくす)との抗マウス PD-1(クローン F12.3)IgG 融合
xmPD-1-IL15 NQ-2a	28 + 30 + 58	ヒト IL15 NQ-2a バリエーション(IL-15R アルファとの結合を低減させる)との抗マウス PD-1(クローン F12.3)IgG 融合
xmPD-1-IL15 NQ-2b	28 + 30 + 59	ヒト IL15 NQ バリエーション(IL-15R アルファとの結合を低減させる)との抗マウス PD-1(クローン F12.3)IgG 融合
xmPD-1-IL15 NQ-3d	28 + 30 + 61	ヒト IL15 NQ バリエーション(IL-15R アルファとの結合を低減させる)との抗マウス PD-1(クローン F12.3)IgG 融合
xmPD-1-IL15 m1	86 + 30 + 88	ヒト IL15 m1 バリエーション(配列番号 1 の 4 個の突然変異 V49R/E46G/N1A/D30N、IL-15R アルファとの結合をなくし、IL-2R ベータ-ガンマとの結合を低減させる)との抗マウス PD-1(クローン F12.3)IgG 融合
xmPD-1-IL15 m2	87+ 30 + 88	ヒト IL15 m2 バリエーション(配列番号 1 の 5 個の突然変異 V49R/E46G/N1G/E64Q/D30N、IL-15R アルファとの結合をなくし、IL-2R ベータ-ガンマとの結合を低減させる)との抗マウス PD-1(クローン F12.3)IgG 融合

【表 9 - 2】

xhPD-1-IL15 m1	74+65+89	ヒト IL15 m1 バリエーション(配列番号 1 の 4 個の突然変異 V49R/E46G/N1A/D30N、IL-15R アルファとの結合をなくし、IL-2R ベータ-ガンマとの結合を低減させる)との抗ヒト PD-1(VH1-69b/VK1-39)IgG 融合
xhPD-1-IL15 m2	74+65+90	ヒト IL15 m2 バリエーション(配列番号 1 の 5 個の突然変異 V49R/E46G/N1G/E64Q/D30N、IL-15R アルファとの結合をなくし、IL-2R ベータ-ガンマとの結合を低減させる)との抗ヒト PD-1(VH1-69b/VK1-39)IgG 融合

*これらのタンパク質の突然変異体は、「元のアミノ酸残基数-新しいアミノ酸」の形式で本文中に示され、ここで残基数は配列番号 1 に示されるヒト IL-15 のアミノ酸配列リストに対応する。

【0272】

以下の細胞株を増殖培地中で 0.7×10^6 細胞/mL まで懸濁し、16 時間培養した：1) 未形質導入 32D (親株)；2) 32D [pRF770 + pRF791]；および 3) $1 \mu\text{g/mL}$ のドキシサイクリンの存在下で増殖させて PD-1 発現を誘導させた 32D [pRF770 + pRF791]。次いで培養物を 1.0×10^6 細胞/mL の最終濃度に再懸濁し、各懸濁液 0.1 mL を実験に必要とされる十分な数の 96 ウェル底プレートの別個のウェルに播種した。次いで各 Alexa647 標識化抗体または抗体-サイトカインキメラタンパク質を特有のウェルに添加して、所与のウェルにおいて 500 nM、100 nM、10 mM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、または 0.001 nM の最終濃度を得た。プレートを 4°C にて 30 分間インキュベートし、次いで細胞を遠心分離 ($300 \times g$ 、5 分) によってペレット化し、 0.2 mL の PBS に再懸濁した。この洗浄ステップを 2 回繰り返した。最後の再懸濁後、細胞を LSRII フローサイトメーターで分析した。データを、FlowJo バージョン 10 を使用して分析した。バックグラウンドより上の Alexa647 チャンネルにおいて蛍光を示した細胞 (標識化抗体-サイトカインキメラが添加されていない細胞によって定義される) を、結合について陽性としてスコア化した。添加した標識化タンパク質濃度の関数として Alexa647 陽性細胞のパーセントを図 2A ~ 2D に示す。

【0273】

抗マウス PD-1 部分を特徴とする各々の標識化分子は、低ピコモルの最終濃度でさえ、濃度依存的に PD-1 発現細胞 (「[pRF770 + pRF791] + Dox」) に結合することができた。xmPD1-IL15RaSu-IL-15 融合分子 (図 2C) はまた、CD122 + CD132 のみを発現する細胞 (「[pRF770 + pRF791]」) へのより少量の結合を示した；対照的に、抗マウス PD1-IL15 NQ バリエーションは、これらの同じ種類の細胞への低減した結合を示した (図 2D)。アイソタイプ対照抗体型 (Ab8.8-IL15RaSu-IL15) は、最も高い試験した最終タンパク質濃度にて細胞のいずれかへの結合のみを示した (図 2B)。試験した 4 つ全ての組換えタンパク質は、比較的高濃度 (10 nM 以上の各化合物) にて同様に 32D 親株への結合のバックグラウンドレベルも示した。

【0274】

この実施例は、抗体-IL-15 キメラタンパク質の抗 PD-1 抗体部分がタンパク質の細胞への結合を導く重要な決定因子であることを実証する。このアッセイはまた、(抗

体またはPD-1非依存的に)CD122+CD132を発現する細胞へ結合する各々の能力における野生型IL-15とNQ突然変異タンパク質との相違を明らかにする。

【0275】

実施例5

レポーター細胞株を使用した抗マウスPD-1-IL15キメラ分子の*in vitro*機能アッセイ

この実施例は、抗体結合標的の発現を伴うかまたは伴わないいずれかの、IL-15受容体(CD122+CD132)を発現する細胞に対する抗体-サイトカイン融合分子の機能的活性アッセイを記載している。

【0276】

この実施例では、レポーター細胞株32D[pRF770+pRF791]における下流の細胞内シグナル伝達を誘発する抗マウスPD-1-IL15キメラ融合タンパク質の能力を測定した。細胞株32D[pRF770+pRF791]は内因性マウスCD132(共通ガンマ鎖)と共にヒトCD122を発現し、ドキシサイクリン誘導性マウスPD-1を発現することができる。CD122/CD132下流シグナル伝達の活性化を、IL-15シグナル伝達の下流の結果であることが知られているリン酸化STAT5(pSTAT5)の相対変化をモニタリングすることによって測定した(例えば:Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Trends Pharmacol Sci. 2012年1月; 33(1): 35~41ページを参照のこと)。32D[pRF770+pRF791]細胞を、増殖培地中で $0.4 \sim 0.8 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度に再懸濁し、 $1 \mu\text{g/mL}$ の最終濃度のドキシサイクリンの存在下または非存在下のいずれかで一晚(12~16時間)増殖させた。細胞を遠心分離($230 \times g$ 、5分)によって収集し、IL-3および子牛の血清を欠く増殖培地中で一度洗浄し、次いで 1.0×10^6 細胞/mLの最終濃度にて再懸濁し、 37°C にて4時間インキュベートした。単一細胞クローン株のうち、ドキシサイクリン誘導細胞の約40,000~50,000個および非ドキシサイクリン細胞の150,000~160,000個を合わせ、各ウェルに添加した。非単一細胞選別株については、本発明者らは、ドキシサイクリン誘導時に、フローサイトメトリー分析によって約20~30%の検出可能なmCherry発現を実証した細胞集団を慣例的に利用した。目的の組換えタンパク質化合物を、各々の最終濃度が500nMから0.1pMの間であるように各ウェルに添加した。各条件について三連のウェルを同様に設定した。プレートを 37°C にて30分間、細胞培養インキュベーター内でインキュベートし、次いで細胞を遠心分離($230 \times g$ 、5分)によってペレット化した。次いでパラホルムアルデヒドを各ウェルに直ちに添加し(PBS中で最終濃度4%)、細胞を、凝集を阻止するために1回上下にピペティングすることによって穏やかに混合し、次いで 37°C にて15分間インキュベートした。次いで細胞を遠心分離($230 \times g$ 、5分)によってペレット化し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液で洗浄した。このステップをさらに2回繰り返した。残留PBSを注意深く吸引し、0.1mLの冷(-20°C)メタノールを添加し、続いて凝集を阻止するために1回穏やかにピペティングした。プレートを箔で密封し、すぐに -20°C の冷凍庫に少なくとも1時間および数日間(通常、12~16時間)まで置いた。分析の日に、細胞をPBSまたはFACS緩衝液で3回を洗浄した(細胞を $300 \times g$ のRCFにて回転させてペレットを確保した)。最終細胞ペレットを、抗pSTAT5抗体(抗Stat5(pY694)-A647(BD Biosciences, Clone: 47/Stat5(pY694))の1:50希釈液50 μL 中に再懸濁した。細胞を暗所において室温にて1時間インキュベートした。次いでプレートを遠心分離し、上記のようにFACS緩衝液で3回洗浄した。細胞をウェル当たり125~150 μL のFACS緩衝液中に再懸濁し、細胞をLSRIIフローサイトメーターで分析した。FlowJoバージョン10を使用してデータを分析した。

【0277】

プラスミドpRF770は、mCherryのドキシサイクリン誘導性発現のためのカ

10

20

30

40

50

セット、続いてマウスPD-1（ウイルス2A切断配列によって分離され、2つの独立したポリペプチドを生じる）を含有するので、mCherryを発現する細胞（PE-Texas Redチャネルを使用して適切に装備されたフローサイトメーター上で検出される）は、「PD-1+」として確実にスコア化され；バックグラウンドより上のこのチャネルにおいて蛍光を発しない細胞が「PD-1-」または「PD-1（低）」とみなされた。したがって、pSTAT5陽性細胞の分析は、同じ実験反応内に存在するように、PD-1+またはPD-1-（またはPD-1（低））細胞上でゲートされた。

【0278】

図3は、上記の方法に従って、いくつかのIL-15含有分子をアッセイするための32D[pRF770+791]レポーター細胞株の使用を示す。図3Aは、32D[pRF770+791]PD-1+およびPD-1（低）レポーター細胞の混合集団にAb8-IL15RaSu-IL15を添加した効果を示し、ここで、それはPD-1+およびPD-1（低）細胞の両方の同等のpSTAT5活性化を引き起こす。図3Bは、32D[pRF770+791]PD-1+およびPD-1（低）レポーター細胞の混合集団にxmPD-1-IL15RaSu-IL15を添加した効果を示す。この場合、PD-1+細胞は、pSTAT5レベルによって測定した場合、PD-1（低）細胞と比較して、xmPD-1-IL15RaSu-IL15に対してはるかに高い感度、およびより低いEC50を示す。図3Cは、32D[pRF770+791]PD-1+（すなわち、ドキシサイクリン誘導性）およびPD-1（低）（すなわち、非ドキシサイクリン誘導性）レポーター細胞の混合集団にxmPD-1-IL15 NQを添加した効果を示す。PD-1+細胞は、pSTAT5レベルによって測定した場合、PD-1（低）細胞と比較して、xmPD-1-IL15 NQに対してはるかに高い感度、およびより低いEC50を示す。さらに、抗マウスPD-1-IL15 NQに対するEC50値は、PD-1+およびPD-1（低）細胞の両方で、xmPD-1-IL15RaSu-IL15に対するEC50値と比較して約10倍大きく、このことは、CD215（IL-15受容体アルファ）への検出可能な結合を排除する特性を有することに加えて、xmPD-1-IL15 NQが、（CD122/CD132依存性pSTAT5活性化によって測定した場合）低減した活性を有する突然変異タンパク質バリエーションを表すことを示す。以下の表7は、上述の分子について計算したEC50値をまとめ、また、PD-1+細胞とPD-1（低）細胞との間のEC50の比としての倍率変化を示す。

【0279】

【表10】

表7.

分子	EC50 (nM)		
	PD-1+	PD-1(低)	変化倍率*
Ab8.8-IL15RaSu-IL15	0.3	0.15	0.51
xmPD1-IL15RaSu-IL15	0.01	2.19	365.32
xmPD1-IL15 NQ	0.09	21.14	223.07

*変化倍率=EC50(PD-1(低))/EC50(PD-1+)

【0280】

IL-15部分が、様々な機能的活性またはCD122および／もしくはCD132への結合をもたらす突然変異を含有する、抗体標的化IL-15のさらなるバリエーションを同定するために、以下の実験を行った：

表8（下記）に記載し、図4に示したように、xmPD1-IL15RaSu-IL15の種々のIL-15突然変異タンパク質形態を生成し、上記に詳述した32D[pRF

770 + pRF791] レポーター細胞株を使用してアッセイした。各突然変異タンパク質について、野生型成熟ヒト IL-15 タンパク質配列と比較して存在する突然変異（元のアミノ酸の形式では、配列番号 1 に存在するアミノ酸残基番号、その位置での新たなアミノ酸）が示されることに留意されたい。pSTAT5 について陽性であった PD-1 + または PD-1（低）細胞のパーセンテージ（フローサイトメトリー分析による）を図 4A～H にプロットし、得られたプロットを使用して以下の表 8 に示したように EC50 値を計算する。

【0281】

【表 11】

表 8.

分子	EC50 (nM)		
	PD-1+	PD-1(低)	変化倍率*
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15	0.05	5.42	108
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15 K11S/D30N	0.42	18.76	44
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15 D61N/D30N	0.16	22.04	139
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15 E64Q/D30N	0.069	24.89	360
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15 K11S/M109A	0.16	3.13	19
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15 D61N/M109A	0.07	12.88	193
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15 E64Q/M109A	0.06	10.05	163
xmPD1-hIL15Rasu-hIL-15 D61N	0.38	6.91	18

*変化倍率=EC50(PD-1(低))/EC50(PD-1+)

【0282】

したがって、本発明の *in vitro* アッセイ法は、野生型 IL-15 配列を含有する対応するキメラタンパク質とは異なる非標的駆動活性または抗体標的駆動活性のいずれかを有するそれらの突然変異体を同定することができる。

【0283】

図 5 は、この実施例における上記の方法に従って、32D [pRF770 + 791] レポーター細胞株を使用していくつかのさらなる抗体-IL-15 分子をアッセイした実験の結果を示す。この例では、分子のいずれも IL-15 受容体アルファ Sushi ドメイン (IL-15 RaSu) を含まなかった。pSTAT5 について陽性であった PD-1 + または PD-1（低）細胞のパーセンテージを図 5A～G にプロットし、得られたプロットを使用して以下の表 9 に示したように EC50 値を計算する。

【0284】

10

20

30

【表 1 2】

表 9.

分子(記載した関連のある突然変異)	EC50 (nM)		
	PD-1+	PD-1(低)	変化倍率*
xmPD-IL15 NQ	0.00574	1.724	300.3484
xmPD-IL15 NQ2a	0.009495	2.939	309.5313
xmPD-IL15 NQ2b	0.01349	8.001	593.106
xmPD-IL15 NQ3d	0.02294	3.731	162.6417
xmPD-IL15 V49R	0.05476	1.511	27.59313
xmPD-IL15 V49R/E46G	0.01491	3.432	230.1811
xmPD-IL15 V49R/ E46G/ E64Q/ D30N	0.1371	97.98	714.6608

*変化倍率=EC50(PD-1(低))/EC50(PD-1+)

【0 2 8 5】

したがって、*in vitro*アッセイ法を使用して、IL-15 Rasuを欠き、比較基準 xmPD1-IL15 NQとは異なる非標的駆動活性または抗体標的駆動活性のいずれかを有するそれらの突然変異体を同定した。

【0 2 8 6】

図 6 は、この実施例における上記の方法に従って、32D [pRF770+791] レポーター細胞株を使用していくつかのさらなる抗体-IL-15 分子をアッセイした、さらなる実験の結果を示す。この例では、分子の大部分はIL-15 受容体アルファ Sus h i ドメイン (IL-15 Rasu) を欠き; xmPD-1-IL15 Rasu-IL15 はIL15 RsSu 含有対照比較基準として含まれた。pSTAT5 について陽性であったPD-1+またはPD-1 (低) 細胞のパーセンテージを図 6 A~G にプロットし、得られたプロットを使用して以下の表 10 に示したようにEC50 値を計算する。

【0 2 8 7】

【表 1 3】

表 10.

分子(記載した関連のある突然変異)	EC50 (nM)		
	PD-1+	PD-1(低)	変化倍率*
xmPD-IL15 NQ	0.03026	7.29	240.91
xmPD1-V49R	0.1634	4.378	26.79
xmPD1-V49R/E64G	0.0188	5.45	289.75
xmPD1-V49R/Y26K/E64Q/D30N	0.05614	21.43	381.72
xmPD1-IL15 V49R/E46Q	0.002937	1.335	454.55
xmPD1-IL15 V49R/Y26K	0.00412	0.8539	207.21
xmPD1-IL15Rasu-IL15	0.0054	0.602	110.9

*変化倍率=EC50(PD-1(低))/EC50(PD-1+)

【0 2 8 8】

図 7 は、この実施例における上記の方法に従って、32D [pRF770+791] レポーター細胞株を使用していくつかのさらなる抗体-IL-15 分子をアッセイしたさらなる実験の結果を示す。この例では、分子の大部分は、IL-15 とIL-15 Rアルファとの間の相互作用をモジュレートしたV49 位において突然変異を含有した。pSTA

T 5 について陽性であった P D - 1 + または P D - 1 (低) 細胞のパーセンテージを図 7 A ~ 7 E にプロットし、得られたプロットを使用して以下の表 1 1 に示したように E C 5 0 値を計算する。

【 0 2 8 9 】

【表 1 4】

表 11.

分子(記載した関連のある突然変異)	EC50 (nM)		
	PD-1+	PD-1(低)	変化倍率*
xmPD1-IL15 V49R	0.05573	0.3284	5.89
xmPD1-IL15 V49R E46G	0.01182	4.535	383.67
xmPD1-IL15 V49K E46G	0.007902	3.977	503.29
xmPD1-IL15 V49K Y26K	0.01751	3.975	227.01
xmPD1-IL15 V49NAT	0.04394	3.047	69.34

*変化倍率=EC50(PD-1(低))/EC50(PD-1+)

【 0 2 9 0 】

図 7 F ~ 7 H は、3 2 D [p R F 7 7 0 + 7 9 1] レポーター細胞株を使用して、I L - 1 5 N Q と比較して I L - 1 5 と I L - 2 R ベータガンマとの間の相互作用をモジュレートした N 1、D 3 0 および E 6 4 位において突然変異を含有する分子を含む、いくつかのさらなる抗体 - I L - 1 5 分子をアッセイしたさらなる実験の結果をさらに示す。p S T A T 5 について陽性であった P D - 1 + または P D - 1 (低) 細胞のパーセンテージを図 7 F ~ 7 H にプロットし、得られたプロットを使用して以下の表 1 1 A に示したように E C 5 0 値を計算する。

【 0 2 9 1 】

【表 1 5】

表 11A.

分子(記載した関連のある突然変異)	EC50 (nM)		
	PD-1+	PD-1(低)	変化倍率*
xmPD1-IL15 NQ	0.01088	13.35	1227.02
xmPD1-IL15 M1 (V49R E46G N1A D30N)	0.05314	76.91	1447.31
xmPD1-IL15 M2 (V49K E46G N1G E64Q D30N)	0.3097	734.3	2371

*変化倍率=EC50(PD-1(低))/EC50(PD-1+)

【 0 2 9 2 】

実施例 6

非担腫瘍マウスにおける最大耐量 (M T D) の決定

この実施例は、本明細書に記載されている抗体 - I L - 1 5 融合タンパク質の i n v i v o 最大耐量の決定を記載している。

【 0 2 9 3 】

健常なメスの 6 ~ 8 週齢の C 5 6 / B 1 6 マウスを、示したように、x m P D - 1 - I L - 1 5 R a S u - I L 1 5、または x m P D - 1 - I L - 1 5 N Q のいずれか各 3 用量により処置した。実験の 0、3 および 6 日目に、マウスに、各動物の体重に基づいて、示した濃度の各分子を生じるのに十分な組換えタンパク質を皮下 (首の後ろ) に注射した。各化合物を 1 0 匹の動物のコホートに投与した。各動物の体重変化 (試験開始時のその

10

20

30

40

50

体重と比較して)を測定し、各群についての平均値を記録した。図8Aおよび8Bは、 2 mg/kg 、 1 mg/kg 、または 0.2 mg/kg を投与したxmPD1-IL15RaSu-IL15群の動物の体重の変化および全生存率をそれぞれプロットしている。 2 mg/kg または 1 mg/kg を投与したマウスでは、突然の体重減少およびその後の死亡が認められたので、試験の8日目までに、これらの群の全ての動物が死亡したか、または屠殺する必要がある。図8Cに示したさらなる試験では、最終投与濃度 1 mg/kg 、 0.8 mg/kg 、または 0.5 mg/kg にてxmPD1-IL15RaSu-IL15によりマウスを処置した。 1 mg/kg 群および 0.8 mg/kg 群のマウスでは、それらの開始時の体重の15~18%が減少し、背中を丸め、苦痛を感じているようであった； 0.5 mg/kg 投与群の動物では、より軽度の一過性の体重減少が認められた。xmPD1-IL15RaSu-IL15についてのMTDは 0.5 mg/kg またはそれ未満と定めた。図8Dは、 3 mg/kg 、 2 mg/kg 、または 1 mg/kg の最終濃度でのxmPD1-IL15NQの投与後の体重の変化を示す。全ての群の動物では、一過性の体重減少(投与停止後にリバウンド)が認められたが、これはより低い用量のxmPD1-IL15RaSu-IL15で見られたものよりも軽度であり、明らかな苦痛の徴候は全く見られなかった。したがってxmPD1-IL15NQについてのMTDは、 3 mg/kg またはそれ未満と定め、xmPD1-IL15RaSu-IL15よりも良好な耐容性が示された。

【0294】

実施例7

B16F10ネズミ同系腫瘍モデルの特徴付け

種々のマウス腫瘍細胞株は一般に入手可能であり(例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション、ATCCから)、免疫細胞浸潤プロファイルがこれらの多くについて評価されている(例えば、Mosley, S. I. ら、Cancer Immunol Res. 2017年1月; 5(1): 29~41ページを参照のこと)。Mosleyらおよびその他の者は、腫瘍細胞株B16F10は、C57/B16マウスに皮下移植されると、比較的少ない量のT細胞(全免疫細胞浸潤の一部として)を含有し、抗PD-1抗体療法にもほとんど反応しない腫瘍を発生することを示している。腫瘍浸潤リンパ球(TIL)ならびに末梢免疫細胞でのPD-1の発現を評価するために、以下の実験を実施した：

メスのC57/B16マウスに、単一の(1×10^7 細胞の)低継代バイアルから新たに解凍した約500,000個のB16F10細胞を大腿上部に皮下移植し、移植に十分な細胞を確立するのに必要とされる最小限の時間培養した。 $300 \sim 400\text{ mm}^3$ ($(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ によって定義される)の目に見える腫瘍塊を有する動物のコホートを得ると、マウスを安楽死させ、屠殺し、各動物の脾臓および原発腫瘍塊を得た。 40 uM メッシュフィルターを通して脾臓をすりつぶし、続いて 10 mL のPBSを添加し、遠心分離($250 \times g$ 、5分)により収集することによって脾細胞を得た。細胞を 2 mL のACK緩衝液に5分間再懸濁し、続いて 10 mL のPBSを添加し、上記のように遠心分離によって収集した。細胞ペレットを 2 mL のPBSに再懸濁し、 40 uM メッシュフィルターを通し、全細胞を計数した。 $1/10$ の量の酵素「R」を利用したことを除いて、製造業者のプロトコールに従ってMiltenyiマウス腫瘍解離キットおよびOctomaxディソシエーター(dissociator)を使用して腫瘍細胞懸濁液を得た。解離後、細胞をPBS中で洗浄し、遠心分離によって収集し、次いで上記のように計数した。次いで各マウス由来の約500万個の脾細胞および収集した腫瘍細胞の全量(典型的に、 $1 \sim 500$ 万個)を、以下の表12に記載している抗体のカクテルを使用して染色した：

【0295】

【表 16】

表 12. フローサイトメトリーのために脾細胞および腫瘍細胞懸濁液を染色するために使用した抗体。

標的	標識	クローン	供給業者
CD8a	APC-Cy7	53-6.7	Biolegend
PD1	BV421	29F.1A12	Biolegend
CD4	FITC	GK1.5	Biolegend
NKp46	PerCP-Cy5.5	29A1.4	BD
CD45	BV786	30-F11	Biolegend

10

【0296】

フローサイトメトリー分析のために、細胞を、生、一重項、CD45+リンパ球と定義した後、T細胞をCD4+またはCD8+のいずれかとしてゲートした；NK細胞をNKp46+細胞と定義した。図9Aは、上述の細胞集団の各々における抗PD-1染色の平均蛍光強度（MFI）を示す；図9Bは、陽性を染色した各集団のパーセントを示す（FMO対照試料に対するゲーティングによって定義される）。

【0297】

したがって、B16F10 TILの中で報告された少量のT細胞にもかかわらず、TILおよび末梢T細胞でのPD-1発現パターンは、IL-15部分のPD-1駆動ターゲットティングの効果を評価する機会を提示した。

20

【0298】

実施例 8

ネズミ同系B16F10メラノーマ腫瘍モデルにおける標的化IL-15分子の抗腫瘍有効性

この実施例は、ネズミ同系B16F10メラノーマ腫瘍モデルにおいて、マウスの腫瘍成長、体重変化、および全生存率に対する3つのPD-1標的化IL-15突然変異タンパク質を含む、種々の化合物の効果を実証する。この腫瘍モデルにおけるPD-1標的化IL-15突然変異タンパク質の効果を評価するために、以下の実験を実施した：

30

メスのC57/B16マウスに、単一の（ 1×10^7 細胞の）低継代バイアルから新たに解凍した約500,000個のB16F10細胞を大腿上部に皮下移植し、移植に十分な細胞を確立するのに必要とされる最小限の時間培養した。60~100 mm³（（長さ×幅²）／2によって定義される）の目に見える腫瘍塊を有する十分な動物を得ると、マウスを投与直前に（n=10の動物の）群に無作為化した。目的の各化合物を、3~4日ごとに、合計3回の用量（0日目を初回投与日と定義した）を所与の群の各動物に皮下注射した（首の後ろ）。腫瘍体積、体重、および動物生存率を、実験の過程を通して追跡した。動物を、それらの腫瘍体積が少なくとも2000 mm³に測定された時点で屠殺した。各処置群におけるマウスの全生存率、および各処置群内の動物の体重を記録した。

【0299】

40

図10は、担腫瘍マウスに、xmPD1-IL15 NQを5、3、1、もしくは0.3 mg/kgの濃度にて；またはxmPD1-IL15 RaSu-IL15を0.3 mg/kgにて；またはPBSをビヒクル対照として投与した試験の結果を示す。図10Aは、0日目（薬物注射の初日）から始まる移植腫瘍のサイズをプロットしている。5、3、1、または0.3 mg/kgの抗マウスPD-1-IL15 NQを投与した群の動物では、個々の動物あたりの平均腫瘍体積および腫瘍体積において用量依存的阻害が認められた。さらに、様々な群の動物では、持続的な腫瘍退縮（薬物投与の完了から45日を超えて検出可能な腫瘍塊なし）が認められ、以下の表13に示したような長期生存が認められた：

【0300】

50

【表 17】

表 13. 抗 PD-1-IL15 化合物により処置した動物からの長期生存。

処置群*	長期生存動物*
PBS	0/10
xmPD-1-IL15 NQ, 5 mg/kg	5/6
xmPD-1-IL15 NQ, 3 mg/kg	8/10
xmPD-1-IL15 NQ, 1 mg/kg	6/10
xmPD-1-IL15 NQ, 0.3 mg/kg	5/9
xmPD-1-IL15RaSu-IL15, 0.3 mg/kg	3/8

*各処置群のマウスを長期生存(薬物処置の停止以降、45 日を超えて腫瘍がない)についてスコア化した。

【0301】

xmPD-1-IL15 NQ 処置後に長期生存した動物に、この実施例に記載されているように B16F10 腫瘍細胞を再チャレンジした。長期生存動物のいずれにおいても検出可能な腫瘍は成長しなかった (B16F10 細胞を並行して移植したナイーブマウスの 100% における腫瘍成長とは対照的である)。

【0302】

図 10B は、試験期間中の生存動物の割合をプロットしている。5 mg/kg の xmPD-1-IL15 NQ 処置群では、10 匹の動物のうち 4 匹が 500 mm³ 未満の腫瘍体積で試験中に死亡した。図 10C は、試験期間中の各処置群における動物の (0 日目のベースラインからの) 平均体重変化をプロットしている。5 mg/kg および 3 mg/kg の処置群の動物では、一過性の体重減少 (0 日目と比較して最大 15% の減少) が認められ、投与完了時にはベースラインに戻った (図 9C)。xmPD-1-IL15 NQ の最大耐量を 3 mg/kg またはそれ未満と定義した (実施例 6 に記載されている観察と一致する)。

【0303】

抗 PD-1 抗体；非標的化 IL-15 NQ 化合物；および PD-1 標的化 IL-15 NQ の担腫瘍マウスに対する効果を比較し、対比するために以下の実験を行った：

B16F10 腫瘍モデル試験を本明細書に前に記載したように確立した。この試験は、以下の表 14 にまとめているように n = 10 の動物の群を含んだ：

【0304】

10

20

30

【表 18】

表 14. B16 腫瘍有効性試験についての処置群。

群	処置
1	PBS
2	xmPD1-IL15 NQ, 1 mg/kg
3	xmPD1-IL15 NQ, 0.3 mg/kg
4	xmPD1, 1 mg/kg
5	xmPD1, 0.3mg/kg
6	Ab8.8-IL15 NQ, 1mg/kg
7	Ab8.8-IL15 NQ, 0.3mg/kg

10

【0305】

図 11 は、担腫瘍マウスに表 14 に記載されている化合物を投与した試験の結果を示す。図 11 A は、0 日目（薬物注射の初日）から開始した移植腫瘍のサイズをプロットしている。抗 PD-1 抗体、または非標的化 IL-15 NQ（Ab8.8-IL15 NQ）のいずれかによる処置は、PBS 処置動物と比較して腫瘍成長特性を有意に変化させなかった。対照的に、xmPD1-IL15 NQ により処置したマウスは用量依存的に有意な腫瘍成長阻害を示した。図 11 B は、試験期間中の各処置群の動物の（0 日目のベースラインからの）平均体重変化をプロットしている。1 mg/kg にて xmPD1-IL15 NQ または Ab8.8-IL15 NQ により処置したマウスは、3 回目の投与を受ける直前の 6 日目にわずかな体重減少（ベースラインから 10% 未満）を示した。この体重減少は一過性であり、処置停止により動物はベースラインの体重に戻った。

20

【0306】

したがって、等価用量では、xmPD1-IL15 NQ は、xPD-1 または Ab8.8-IL15 NQ よりも優れた腫瘍成長阻害をもたらし、耐容性は良好であった。

30

xmPD1-IL15 M1 の単回用量の効果を決定するために、以下の実験を行った。各化合物の 3 回の用量を以前に与える代わりに、以下に記載されている実験において単回用量のみを投与したことを除いて、B16F10 腫瘍モデル試験を本明細書に前に記載したように確立した。この試験は、以下の表 15 にまとめられているように n = 10 の動物の群を含んだ。

【0307】

【表 19】

表 15. B16 腫瘍有効性試験についての処置群。

群	処置
1	PBS
2	xmPD1-IL15 M1 5 mg/kg
3	xmPD1-IL15 M1 1 mg/kg
4	xmPD1-IL15 M1 0.3 mg/kg
5	xmPD1-IL15 M1 0.1 mg/kg

40

50

【0308】

図11Cおよび11Dは、担腫瘍マウスに、表15に記載されているxmPD1-IL15 M1のいずれかの濃度、またはビヒクル対照としてのPBSを単回投与した試験の結果を示す。図11Cは、xmPD1-IL15 M1が用量依存的にB16F10腫瘍成長を低減させることを実証する。試験した全てのxmPD1-IL15 M1用量（0.1～5mg/kg）は、対照と比較して腫瘍成長の有意な阻害を実証した。以下の表15は、各処置と比較して腫瘍がないと決定された試験終了時のマウスの数をまとめている。5mg/kgのxmPD1-IL15 M1により、試験終了時まで最大数の腫瘍がないマウス（6/10）が生じた。図11Dは、試験期間中の各処置群における動物の（0日目のベースラインからの）平均体重変化をプロットしている。5mg/kgのxmPD1-IL15 M1の単回用量により処置したマウスは、6日目にベースラインから13.5%の平均体重減少を示した。この体重減少は一過性であり、体重は次の測定（3日後）までに上昇し、処置停止によりベースラインに戻った。試験期間の間、他の処置群は全く体重減少を示さなかった。

10

【0309】

【表20】

表 16. 試験終了時に腫瘍がないマウスの数。

処置群	腫瘍がないマウス*
PBS	0/10
xmPD1-IL15 M1 5 mg/kg	2/10
xmPD1-IL15 M1 1 mg/kg	3/10
xmPD1-IL15 M1 0.3 mg/kg	3/10
xmPD1-IL15 M1 0.1 mg/kg	6/10

20

*試験終了時に腫瘍サイズが触知不能であるか、またはD0(投与開始)腫瘍体積未満を測定したマウスに基づいて腫瘍がないマウスを決定した。

30

【0310】

xmPD1-IL15 M2の単回用量の効果を決定するために、以下の実験を行った。各化合物の3回の用量を以前に与える代わりに、以下に記載されている実験において単回用量のみを投与したことを除いて、B16F10腫瘍モデル試験を本明細書に前に記載したように確立した。この試験は、以下の表17にまとめられているようにn=10の動物の群を含んだ。

【0311】

【表 2 1】

表 17. B16 腫瘍有効性試験についての処置群。

群	処置
1	PBS
2	xmPD1-IL15 M2 5 mg/kg
3	xmPD1-IL15 M2 1 mg/kg
4	xmPD1-IL15 M2 0.3 mg/kg
5	xmPD1-IL15 M2 0.1 mg/kg

10

【0 3 1 2】

図 1 1 E および 1 1 F は、担腫瘍マウスに、表 1 7 に記載されている x m P D 1 - I L - 1 5 M 2 のいずれかの濃度、またはビヒクル対照としての P B S を単独で投与した試験の結果を示す。図 1 1 E は、x P D 1 - I L 1 5 M 2 が用量依存的に B 1 6 F 1 0 腫瘍成長を低減させることを実証する。試験した全ての x m P D 1 - I L 1 5 M 2 用量（0. 1 ～ 5 m g / k g）は、対照と比較して腫瘍成長の有意な阻害を実証した。以下の表 1 8 は、各処置と比較して腫瘍がないと決定された試験終了時のマウスの数をまとめている。5 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 M 2 により、試験終了時までに最大数の腫瘍がないマウス（4 / 1 0）が生じた。図 1 1 F は、試験期間中の各処置群における動物の（0 日目のベースラインからの）平均体重変化をプロットしている。5 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 M 2 の単回用量により処置したマウスは、6 日目にベースラインから 2. 9 % の平均体重減少を示した。この体重減少は一過性であり、体重は 3 日後の次の測定までにベースラインに戻った。試験期間の間、他の処置群は全く体重減少を示さなかった。

20

【0 3 1 3】

【表 2 2】

30

表 18. 試験終了時に腫瘍がないマウスの数。

処置群	腫瘍がないマウス*
PBS	0/10
xmPD1-IL15 M2 5 mg/kg	1/10
xmPD1-IL15 M2 1 mg/kg	1/10
xmPD1-IL15 M2 0.3 mg/kg	3/10
xmPD1-IL15 M2 0.1 mg/kg	4/10

40

*試験終了時の腫瘍サイズが触知不能であるか、または D0(投与開始)腫瘍体積未滿を測定したマウスに基づいて腫瘍がないマウスを決定した。

【0 3 1 4】

x m P D 1 - I L - 1 5 M 1 の単回用量の効果を x m P D 1 単独と比較するために、以下の実験を行った。各化合物の 3 回の用量を以前に与える代わりに、以下に記載されている実験において単回用量のみを投与したことを除いて、B 1 6 F 1 0 腫瘍モデル試験を本明細書に前に記載したように確立した。この試験は、以下の表 1 9 にまとめられている

50

ように $n = 10$ の動物の群を含んだ。

【0315】

【表23】

表 19. B16 腫瘍有効性試験についての処置群。

群	処置
1	PBS
2	xmPD1 1mg/kg
3	xmPD1-IL15 M1 1mg/kg

10

【0316】

以前に実証したように、B16F10 担腫瘍マウスに単回用量として与えた 1 mg/kg の xmPD1-IL15 M1 は全く体重減少を示さない有意な腫瘍阻害を実証した。図 11G は、 1 mg/kg の xmPD1 の単回用量が B16F10 腫瘍成長を弱め得る一方で、xmPD1-IL15 M1 が xmPD1 単独のものよりも有意に大きな好転を示すことを実証する。図 11H は、試験期間中の各処置群における動物の（0 日目のベースラインからの）平均体重変化をプロットしている。 1 mg/kg の xmPD1-IL15 M1、または 1 mg/kg の xmPD1 の単回用量により処置したマウスのいずれもベースラインからの体重減少を全く示さなかった。

20

【0317】

実施例 9

ネズミ同系 MC38 結腸腺がん腫瘍モデルにおける標的化 IL-15 分子の抗腫瘍有効性
この実施例は、ネズミ同系 MC38 結腸腺がん腫瘍モデルにおけるマウスの腫瘍成長および体重変化に対する、2 つの PD-1 標的化 IL-15 突然変異タンパク質を含む、種々の化合物の効果を実証する。この腫瘍モデルにおける PD-1 標的化 IL-15 突然変異タンパク質の効果を評価するために、以下の実験を実施した。

【0318】

メスの C57/B16 マウスに、単一の（ 1×10^7 細胞の）低継代バイアルから新たに解凍した約 500,000 個の MC38 細胞を大腿上部に皮下移植し、移植に十分な細胞を確立するのに必要とされる最小限の時間培養した。 $60 \sim 90 \text{ mm}^3$ （（長さ×幅²）／2 によって定義される）の目に見える腫瘍塊を有する十分な動物を得ると、マウスを投与直前に（ $n = 10$ の動物の）群に無作為化した。目的の各化合物を、所与の群の各動物に 1 回（0 日目、初回投与日として定義される）、皮下注射した（首の後ろ）。腫瘍体積および体重を、実験の過程を通して追跡した。動物を、それらの腫瘍体積が少なくとも 2000 mm^3 に測定された時点で屠殺した。

30

【0319】

図 11I および 11J は、担腫瘍マウスに、5、1、0.3、または 0.1 mg/kg の濃度にて xmPD1-IL15 M1 を投与した；またはビヒクル対照として PBS を投与した試験の結果を示す。図 11I は、0 日目（薬物注射の初日）から開始した移植腫瘍のサイズをプロットしている。5、1 および 0.3 mg/kg の抗マウス PD-1-IL15 M1 を与えた群の動物では、個々の動物あたりの平均腫瘍体積および腫瘍体積において用量依存的な阻害が認められた。以下の表 20 は、各処置と比較して腫瘍がないと決定された、試験終了時のマウスの数をまとめている。 5 mg/kg の xmPD1-IL15 M1 により、試験終了までに最大数の腫瘍がないマウス（9／10）が生じた。図 11J は、試験期間中の各処置群の動物の（0 日目のベースラインからの）平均体重変化をプロットしている。 5 mg/kg の xmPD1-IL15 M1 を与えた動物は、D0 から一過性の 13.2% の体重減少が生じ、試験終了時までにベースラインレベルに戻った。

40

50

【0320】

【表24】

表 20. 試験終了時に腫瘍がないマウスの数。

処置群	腫瘍がないマウス*
PBS	0/10
xmPD1-IL15 M1 0.1 mg/kg	0/10
xmPD1-IL15 M1 0.3 mg/kg	2/10
xmPD1-IL15 M1 1 mg/kg	4/10
xmPD1-IL15 M1 5 mg/kg	9/10

10

*試験終了時の腫瘍サイズが触知不能であるか、または D0(投与開始)腫瘍体積未満を測定したマウスに基づいて腫瘍がないマウスを決定した。

【0321】

図 11K および 11L は、担腫瘍マウスに、5、1、0.3、または 0.1 mg/kg の濃度にて xmPD1-IL15 M2 を投与した；またはビヒクル対照として PBS を投与した試験の結果を示す。図 11K は、0 日目（薬物注射の初日）から開始した移植腫瘍のサイズをプロットしている。5、1 および 0.3 mg/kg の抗マウス PD-1-IL15 M2 を与えた群の動物では、個々の動物あたりの平均腫瘍体積および腫瘍体積において用量依存的な障害が認められた。以下の表 21 は、各処置と比較して腫瘍がないと決定された、試験終了時のマウスをまとめている。5 mg/kg の xmPD1-IL15 M2 により、試験終了までに最大数の腫瘍がないマウス（4/10）が生じた。図 11L は、試験期間中の各処置群の動物の（0 日目のベースラインからの）平均体重変化をプロットしている。上記の用量での xmPD1-IL15 M2 は試験期間中に全く体重減少を生じなかった。

20

【0322】

30

【表25】

表 21. 試験終了時に腫瘍がないマウスの数。

処置群	腫瘍がないマウス*
PBS	0/10
xmPD1-IL15 M2 0.1 mg/kg	0/10
xmPD1-IL15 M2 0.3 mg/kg	0/10
xmPD1-IL15 M2 1 mg/kg	3/10
xmPD1-IL15 M2 5 mg/kg	4/10

40

*試験終了時に腫瘍サイズが触知不能であるか、または D0(投与開始)腫瘍体積未満を測定したマウスに基づいて腫瘍がないマウスを決定した。

【0323】

実施例 10

ネズミ免疫細胞集団に対する標的化 IL-15 の効果の特徴付け

この実施例は、脾臓および腫瘍浸潤リンパ球の免疫細胞フェノタイピングを使用して、

50

P D - 1 標的化 I L - 1 5 突然変異タンパク質をマウスに投与することの機能的結果を評価するための方法を記載している。

【 0 3 2 4 】

B 1 6 F 1 0 担腫瘍マウスを、処置群あたり $n = 4$ または 5 のマウスを用いて、本質的に実施例 8、表 1 4 に記載されているように確立した。表 2 2 に、各群に与えた化合物および群あたりの動物の数を記載している：

【 0 3 2 5 】

【表 2 6】

表 22. 免疫細胞プロファイリング試験についての処置群。

群	処置
1	PBS, $n=5$
2	xmPD1-IL15 NQ, 0.3 mg/kg, $n=4$
3	xmPD1, 0.3 mg/kg, $n=5$
4	Ab8.8-IL15 NQ, 0.3 mg/kg, $n=5$

10

【 0 3 2 6 】

脾細胞および腫瘍細胞懸濁液を、実施例 7 に記載されているように各動物から得た。次いで得られた細胞懸濁液を、以下の表 2 3 に示しているように、以下の蛍光標識化抗体または生存性色素のカクテルにより染色した：

【 0 3 2 7 】

【表 2 7】

表 23. 免疫細胞プロファイリング試験についての抗体および生/死色素染色パネル。

標的	標識	クローン	製造業者	希釈
L/D Blue			Life Tech	1:100
CD45	A700	30-F11	Biolegend	1:100
CD90.2	BUV395	30-H12	Biolegend	1:100
CD4	PerCPCy5.5	GK1.5	Biolegend	1:100
CD8	BV785	53-6.7	Biolegend	1:100
FoxP3	Pac Blue	FJK-16s	eBiosciences	1:50
xhFc	APC	H2	Southern Biotech	1:500
CD16	APCe780	ebioCB16	Invitrogen	
パーフォリン	PE	dG9	Biolegend	

30

【 0 3 2 8 】

フローサイトメトリーによる細胞の染色、洗浄、および分析を、実施例 7 に記載されているように実施した。

図 1 2 A は、単離された脾細胞または腫瘍浸潤リンパ球上の A b 8 . 8 - I L 1 5 N Q、x m P D 1 - I L 1 5 N Q、または x P D - 1 のいずれかを検出するように設計した実験からの結果を示す。腫瘍（ヒストグラム、上段に示す）または脾臓（下段に示す）のいずれかからの T 細胞（生存可能、一重項、C D 9 0 . 2 +）を、C D 8 +（左列）または C D 4 +（右列）にさらに細分した。各細胞集団についての重ね合わせたヒストグラムは、各プロットの隣に記載している化合物により処置した動物からの抗ヒト F c（組換え分子の各々に存在する共通のヒト I g G F c 部分を検出するため）でこれらの細胞を染色した結果を示す。x m P D 1 - N Q 分子を C D 8 + T I L 上で検出し、C D 4 +

40

50

T I L上ではわずかな程度で検出し、より低い強度ではあるが、x m P D 1分子の検出を反映している。A b 8. 8 - I L 1 5 N Q分子は、C D 8 + T I L上でバックグラウンドレベルを超えて検出されなかった。分析時にC D 4 +またはC D 8 +脾細胞由来の全ての分子についてバックグラウンド染色を超えるシグナルはほとんど観察されなかった。表 2 4 は、この実験を含む全ての動物からの脾細胞およびT I Lを染色することから得られた結果をまとめている。

【 0 3 2 9 】

【表 2 8】

表 24. 種々の処置群のマウス由来の抗ヒト Fc+脾細胞またはTIL の概要。

腫瘍				脾臓			
試料番号	処置群	CD8+の xFC+%	CD4+の xFC+%	試料番号	処置群	CD8+の xFC+%	CD4+の xFC+%
T1	xPD1	85.9	70.3	S1	xPD1	3.84	4.75
T2	xPD1	68.6	87.1	S2	xPD1	1.64	15.5
T3	xPD1	87.4	57.4	S3	xPD1	1.98	7.64
T4	xPD1	81.1	69.7	S7	xPD1-IL15 NQ	0.25	1.39
T5	xPD1	88	66.7	S8	xPD1-IL15 NQ	0.48	0.91
T7	xPD1-IL15 NQ	63.2	22.5	S9	xPD1-IL15 NQ	0.27	0.84
T8	xPD1-IL15 NQ	39.8	12.8	S10	xPD1-IL15 NQ	0.23	2.17
T9	xPD1-IL15 NQ	51.7	22.5	S11	Ab8.8-IL15 NQ	0.049	0.28
T10	xPD1-IL15 NQ	23.8	12.9	S12	Ab8.8-IL15 NQ	0.074	0.2
T11	Ab8.8-IL15 NQ	0.68	1	S13	Ab8.8-IL15 NQ	0.44	0.32
T12	Ab8.8-IL15 NQ	2.06	5.88	S14	Ab8.8-IL15 NQ	13.1	0.23
T13	Ab8.8-IL15 NQ	1.1	3.5	S15	Ab8.8-IL15 NQ	0.84	0.14
T14	Ab8.8-IL15 NQ	2.09	3.56	S16	PBS	0.17	0.096
T15	Ab8.8-IL15 NQ	1.72	6.18	S17	PBS	0.07	0.089
T16	PBS	0.56	0.93	S18	PBS	0.092	0.14
T17	PBS	0.38	0.44	S19	PBS	0.089	0.14
T18	PBS	0.33	0.44	S20	PBS	0.031	0.12
T19	PBS	2.2	1.02				
T20	PBS	0.25	0.21				

【 0 3 3 0 】

要約すると、抗 P D 1 および x m P D 1 - I L 1 5 N Q は同様のターゲティングのパターンを示す：特に、それらは腫瘍常在性 C D 8 + T 細胞上に豊富にある。

さらに、これらの同じ染色した脾細胞およびT I Lを分析して上述の処置に起因する免疫細胞頻度の変化を評価した。図 1 2 B および図 1 2 C は、それぞれ脾細胞またはT I Lにおける種々の処置に起因する免疫細胞サブセットの変化を示す。図 1 2 D は、脾臓および腫瘍におけるT細胞のC D 8 : C D 4 比をプロットしている。注目すべきことに、腫瘍におけるC D 8 : C D 4 T細胞比はx m P D 1 - I L 1 5 N Q処置で増加したが、A

b 8. 8-I L 1 5 N Qまたはx m P D 1 処置では増加しなかった。処置群のいずれにおいても脾臓のC D 8 : C D 4 比に変化はなかった。したがって、I L - 1 5 N Q突然変異タンパク質のP D - 1 標的化型を使用すると、C D 8 : C D 4 比に有意な変化が生じ、同様に抗腫瘍有効性にも有意な相違が生じた（図10A）。

【0331】

図13は、末梢血および腫瘍浸潤リンパ球の免疫細胞フェノタイピングを使用して、P D - 1 標的化I L - 1 5 突然変異タンパク質M 1 およびM 2 をマウスに投与することの薬力学的効果を評価するための方法を記載している。

【0332】

B 1 6 F 1 0 担腫瘍マウスを、処置群あたりn = 5 のマウスで、本質的に実施例8の表15に記載されているように確立した。表25に、各群に与えた化合物および群あたりの動物の数を記載している：

【0333】

【表29】

表 25. 免疫細胞プロファイリング試験についての処置群。

群	処置
1	PBS, n=5
2	xmPD1-IL15 M1, 0.3 mg/kg, n=5
3	xmPD1-IL15 M1, 1 mg/kg, n=5
4	xmPD1-IL15 M2, 1 mg/kg, n=5
5	xmPD1-IL15 M2, 3 mg/kg, n=5

【0334】

末梢血および腫瘍細胞懸濁液を、実施例7に記載されているように、x m P D 1 - I L 1 5 処置後の3、6または9日目に各動物から得た。次いで得られた細胞懸濁液を、表23に示しているように、蛍光標識化抗体または生存性色素のカクテルにより染色した。フローサイトメトリーによる細胞の染色、洗浄、および分析を、実施例7に記載されているように実施した。

【0335】

図13Aおよび13Bは、6日目における末梢血または腫瘍浸潤リンパ球中のNK、C D 8 + T およびT r e g 細胞の絶対数を示し、これにより、それぞれx m P D 1 - I L 1 5 M 1 およびx m P D 1 - I L 1 5 m 2 によって最大効果を有することが示された。両方のx m P D 1 - I L 1 5 突然変異タンパク質は末梢血および腫瘍中のT r e g 細胞を増殖させなかった。NK細胞は、末梢血、特により高い用量でC D 8 + T 細胞よりも多く増殖した。このことは、NK細胞はI L - 2 受容体のより高い発現レベルを有する一方で、C D 8 + T 細胞はP D - 1 の発現が全くないか、または低いという事実に起因する。しかし、C D 8 + T 細胞は腫瘍内でNK細胞よりも多く増殖し、両方のx m P D 1 - I L 1 5 突然変異タンパク質はNK細胞よりC D 8 + T I L 上のP D - 1 を介して腫瘍に標的化されていることが示唆される。

【0336】

x m P D 1 - M 1 の抗腫瘍有効性にどの免疫細胞型が必要とされるか、ならびにT細胞移動が有効性：NK 1. 1 + 枯渇、C D 8 T 細胞枯渇、およびT細胞移動の阻害剤であるF T Y 7 2 0 による処置に必要とされるかどうかを決定するために3つの試験を実施した（図13C、13Dおよび13Eに示す）。C D 8 T 細胞はC D 8 b 抗体により枯渇させた（クローン53-5. 8、M 1 注射の3日前および1日前ならびにその後毎週350mgをi. p. 投与した）。NK細胞はNK 1. 1 抗体により枯渇させた（クローンP

K 1 3 6、1 m g / k g の M 1 注射の 2 日前およびその後毎週 2 0 0 □ g i . p .) 。
対照群は、I g G 2 a アイソタイプ (クローン C 1 . 1 8 . 4) および I g G 1 アイソタイプ (クローン T N P 6 A 7) を含んだ。F T Y 7 2 0 化合物を、1 m g / k g の M 1 注射の 3 日前および 1 日前に 1 m g / k g を i . p . 投与し、その後 3 日ごとに投与した。

【 0 3 3 7 】

図 1 3 C および 1 3 D は、1 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 M 1 の処置後の B 1 6 モデルにおける抗腫瘍有効性に対する C D 8 T および N K 1 . 1 + 細胞の枯渇のそれぞれの効果を示す。N K 1 . 1 + 細胞は N K 細胞および N K T 細胞の両方を含有する。これらの試験により、x m P D 1 - M 1 の有効性は C D 8 T 細胞の非存在下では喪失したが、N K 1 . 1 + 細胞では喪失しなかったことが示唆された。

10

【 0 3 3 8 】

図 1 3 E は、1 m g / k g の x m P D 1 - I L 1 5 M 1 の処置後の B 1 6 モデルにおける抗腫瘍有効性に対する、T 細胞放出を阻害する F T Y 4 2 0 処置の効果を示す。結果は、T 細胞移動が有効性には必要とされないことを示す。

【 0 3 3 9 】

実施例 1 1

i n v i v o でのサイトカイン産生に対する標的化 I L - 1 5 の効果の特徴付け

この実施例は、末梢血中に存在するサイトカインを評価することによって、P D - 1 標的化 I L - 1 5 突然変異タンパク質をマウスに投与することの機能的結果を評価するための方法を記載している。

20

【 0 3 4 0 】

メス (8 週齢) の C 5 7 B 6 / 6 J マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s 、 S a c r a m e n t o 、 C A) に、以下の表 2 6 に記載している化合物および用量を皮下投与した：

【 0 3 4 1 】

【表 3 0】

表 26. i n v i v o でのサイトカイン試験についての処置群。

群	処置
1	xmPD1-IL15 NQ, 1 mg/kg
2	xmPD1-IL15 NQ, 0.3 mg/kg
3	xmPD1-IL15RaSu, 1 mg/kg
4	xmPD1-IL15RaSu, 0.3 mg/kg
5	Ab8.8-IL15 NQ, 1mg/kg
6	Ab8.8-IL15 NQ, 0.3 mg/kg

30

40

【 0 3 4 2 】

顎下腺静脈穿刺 (生存中) によって、または即座の心臓穿刺 (C O ₂ による安楽死後) によって、投与後 0 時間、2 時間、4 時間、6 時間、2 4 時間、4 8 時間、7 2 時間、9 6 時間および 1 2 0 時間 (時点ごとに n = 3 のマウス) に血液を採取し、マイクロ 1 . 1 m l Z - ゲルチューブ (S a r s t e d t 、 N u m b r e c h t 、 ドイツ) 中で処理して血清を得た。各マウスにおいて採血のための適切な体積は、マウスおよびラットの生存採血に関する N I H ガイドライン (N I H G u i d e l i n e s f o r S u r v i v a l B l e e d i n g o f M i c e a n d R a t s) <http://oac.u.od.nih.gov/ARAC/survival.pdf> に従った。全ての動物

50

をA A A L A C公認施設に維持し、実験動物のケアおよび使用に関するガイド (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (Institute on Laboratory Animal Resources, Rockville, MD) に記載されている推奨に従って使用した。

【0343】

I F NガンマおよびI L-6を含む複数の血清サイトカインを、マルチスポット電気化学発光U-プレックスアッセイ (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) を使用して測定した。各マウスの試料からの総血清の1:5希釈物をアッセイ緩衝液中で作製し、4℃で一晩のインキュベーションのためにプレートに添加した。残りのステップは製造業者が記載している通りに従った。S E Mを用いてデータを群としてプロットし、2群または2-way A N O V Aを比較した場合、統計をt検定によって行い、続いてT u k e yの多重比較検定 (G r a p h P a d P r i s m、L a J o l l a、C A) を行った。

【0344】

図14は、種々の処置群動物における血清サイトカインレベルの分析から得られた結果を示す。図14Aは測定したI F N γ のレベルを示す。注目すべきことに、x m P D 1-I L 1 5 R a S u-I L 1 5 処置群の動物は、投与後48時間まで他の処置群からの動物よりも有意に高いI F N γ を有した。72時間では、x m P D 1-I L 1 5 N Q 処置群の動物は、x m P D 1-I L 1 5 R a S u-I L 1 5 0.3mg/kg群からの動物よりもわずかに高いI F N γ を示し、96時間では、両方のx m P D 1-I L 1 5 N Q群からの動物は他のどの群からのマウスよりもわずかに高いI F N γ を有した。この相違は試験終了時 (投与後120時間) まで持続した。対照的に、非標的化、N Q突然変異体I L 1 5を与えた動物 (すなわち、A b 8.8-I L 1 5 N Q動物) は、48および72時間の時点で有意に低いI F N γ を生成した。したがって、I F N γ 生成の動態および最大応答は試験した分子間で異なり、N Qバリエーションは、等価用量で野生型I L-15含有分子と比較して低減したレベルのI F N γ を生成する。さらに、抗P D-1ターゲティングアームの存在はI F N γ 生成において有意な相違をもたらし、標的駆動サイトカイン様式を使用する価値が強調される。

【0345】

図14Bは、種々の処置群において測定したサイトカインI L-6のレベルを示す。1mg/kgで試験した3つ全ての群を比較すると、m P D 1-I L 1 5 R a S u-I L 1 5 処置群の動物は、投与後48時間まで、他の処置群からの動物よりも有意に高いI L-6を有した。72~120時間の時点の試料では、x m P D 1-I L 1 5 N Qの群は、x m P D 1-I L 1 5 R a S u-I L 1 5 1mg/kg処置群からのものに匹敵するI L-6レベルを生成した。対照的に、A b 8.8-I L 1 5 N Q群からの動物は一貫した量のI L-6を生成し、これはP D-1標的化型によって生成されたレベルと常に同等かまたはそれ未満であった。I L-6生成の同様のパターンが0.3mg/kg群において見られ、x m P D 1-I L 1 5 R a S u-I L 1 5は、より早く、より高いピークを生じ、続いてx m P D 1-I L 1 5 N Qは、より遅く出現し、より長く持続するピークを生じた。したがって、N Qバリエーションは、同等の用量でi n v i v oで産生される2つの炎症性サイトカインの動態および最大出力においてその野生型I L-15部分対応物とは異なり；標的化N Qは、非標的化よりも複数の時点にわたってより多くのI F N γ およびI L-6を産生した。

【0346】

実施例12

ヒト末梢血単核細胞 (h P B M C) を使用した抗ヒトP D-1-I L 1 5 M 1およびM 2分子のi n v i t r oでの機能アッセイ

この実施例では、p S T A T 5の誘導に対する標的化抗ヒトP D-1-I L 1 5の効果、h P B M C由来のヒトN K細胞、C D 8⁺エフェクターメモリー (e m) T細胞およびC D 8⁺中枢メモリー (c m) T細胞に対する非標的化アイソタイプ対照-抗体-I L

15キメラ分子の効果と比較する。

【0347】

健常ボランティアから血液を採取し、フィコールパーク（ficoll-paque）（GE Healthcare）勾配を使用してhPBMCを単離し、PBSで洗浄して血小板を除去し、ACK溶解緩衝液（Gibco）を使用して赤血球を取り除いた。次いで細胞を、50ulの無血清RPMI 1640培地（Gibco）中で 2×10^6 細胞／ウェルにて播種し、37℃にて2～4時間静置させた。静置後、細胞を、37℃で30分間、所与の濃度にて記載した分子（表18）により処理した。次いで細胞を、室温にて10分間、2%PFA（Electron Microscopy Science）で即座に固定し、その後、それらを、4℃にて30分間、表面マーカーについて染色した。次いで細胞を、室温にて10分間、2%PFAで再び固定し、次いで冷Perm Buffer III（BD）に再懸濁し、-20℃にて一晩保存した。翌日、細胞を、45分間、透過化緩衝液（ebioscience）中で抗体（以下の表27に記載されている）を使用して細胞内マーカーについて染色し、次いでフローサイトメトリーによって分析した。

【0348】

【表31】

表27. フローサイトメトリーのためのhPBMCおよびpSTAT5活性において異なるリン

パ球を染色するために使用した抗体。

標的	標識	クローン	供給業者
CD45	BV605	HI30	Biolegend
CD3	BUV395	SK7	BD
CD4	BV711	RPA-T4	Biolegend
CD8	BV510	SK1	Biolegend
CD25	BV421	BC96	Biolegend
CD62L	BV786	DREG-56	Biolegend
CD45RO	FITC	UCHL1	Biolegend
CD16	APCe780	ebioCB16	Invitrogen
パーフォリン	PE	dG9	Biolegend
pSTAT5	A647	47/STAT5(p694)	BD

【0349】

図15A～15Fは、標的化抗ヒトPD-1（xhPD1）-IL15および非標的化アイソタイプ対照抗体-IL15キメラ分子をhPBMCに添加する効果を示し、それらは、ヒトNK細胞、CD8⁺em T細胞およびCD8⁺cm T細胞上で異なるpSTAT5活性化を引き起こす。NK細胞はPD-1発現を有さないかまたは低いPD-1発現を有するので（表28）、NK細胞では、アイソタイプ対照-IL15のターゲティング活性と比較して、xhPD1-IL15に対する有意なターゲティング活性は存在しない（図15AのM1および図15DのM2）。CD8⁺em T細胞およびCD8⁺cm T細胞はPD-1発現を有するので（表28）、CD8⁺em T細胞およびCD8⁺cm T細胞では、アイソタイプ対照-IL15のターゲティング活性と比較して、xhPD1-IL15に対する有意なターゲティング活性が存在する（図15B～15CのM1および図15E～15FのM2）。NK細胞上のアイソタイプ対照-IL15についてのEC50値は、CD8⁺em T細胞およびCD8⁺cm T細胞上のEC50値と比較して3～4倍低く、NK細胞は、それらがより高いレベルのCD122／CD132発現を有するという事実起因して、一般にIL15活性化に対してより感受性であること

が確認される。しかしながら、 $CD8^{+}cm^{-}$ T細胞および $CD8^{+}cm^{-}$ T細胞は、これらの細胞型でのPD-1発現によって駆動されるターゲティング活性のために、xPD1-IL15活性化に対してより感受性である。この実施例は、xPD1-IL15がまた、以前の実施例に示されるように、ヒト系およびマウス系において、PD-1（低）細胞よりもPD-1+細胞を優先的に活性化し得ることを示す。以下の表28は、上述の分子についての計算したEC50値をまとめ、また、アイソタイプ対照-IL15とxhPD1-IL15とのEC50の比としての倍率変化を示す。

【0350】

【表32】

表 28.

3匹の健康ドナーの平均	FMO/ %PD-1	FMO/ MFI PD-1	EC50 (nM)				変化倍率*	
			アイソタイプ対照-IL15 M1	xhPD1-IL15 M1	アイソタイプ対照-IL15 M2	xhPD1-IL15 M2	M1	M2
NK細胞	1.4/ 6.55	495/491	0.9455	0.4746	11.22	8.266	1.99	1.36
CD8 ⁺ em T細胞	2.53/ 70.4	-3.76/ 897	3.386	0.03329	35.71	0.1198	101.71	298.08
CD8 ⁺ cm T細胞	2.89/ 61.3	-10.1/ 742	3.665	0.07804	37.63	0.4916	46.96	76.55

*変化倍率=EC50(アイソタイプ対照-IL15)/EC50(xhPD1-IL15)

【0351】

実施例 13

MC38モデルにおける抗マウスPD-1-IL15 M1および抗EDA-IL-10融合タンパク質のin vivo有効性試験

この実施例は、抗EDA-IL-10融合タンパク質（xE DA-IL10）と組み合わせてPD-1標的化IL-15分子（xPD1-IL15 M1）を投与することの抗腫瘍有効性を評価するための方法を記載している。マウスに以下のように投与した：xPD1-IL15 M1を0日目に0.3mg/kgまたは1mg/kgで投与し、抗EDA-IL-10融合タンパク質（xE DA-IL10）を0日目およびその後週に2回、合計5回、各用量5mg/kgで投与した。図16Aおよび16Bに示すように、抗EDA-IL-10融合タンパク質（xE DA-IL10）と組み合わせて投与したxPD1-IL15 M1の両方の用量において、特に、より低い用量（0.3mg/kg）のxPD1-IL15 M1において相乗効果を観察した。

【0352】

図16Cは、試験期間中の各処置群の動物の（0日目のベースラインからの）平均体重変化をプロットしている。5mg/kgの抗EDA-IL-10融合タンパク質（xE DA-IL10）と組み合わせた1mg/kgのxPD1-IL15 M1の単回用量で処置したマウスは、6日目にベースラインから12%の平均体重減少を示した。この体重減少は一過性であり、体重は3日後の次の測定までにベースラインに戻った。試験期間中、他の処置群は全く体重減少を示さなかった。

【0353】

開示された教示は、種々の適用、方法、キットおよび組成物に関して記載されてきたが、種々の変更および修飾が、本明細書の教示および以下の特許請求された本発明から逸脱することなしになされ得ることが理解される。上述の実施例は、開示された教示をよりよく説明するために提供されるのであって、本明細書に提示された教示の範囲を限定する意図はない。本明細書の教示は、これらの例示的な態様に関連して記載されてきたが、当業者は、これらの例示的な態様の多数のバリエーションおよび修飾が、過度の実験なしに可

10

20

30

40

50

能であることを容易に理解する。全てのこのようなバリエーションおよび修飾は、本明細書の教示の範囲内である。

【0354】

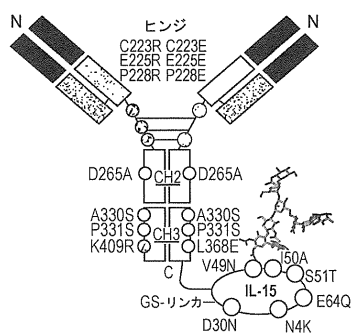
特許、特許出願、論文、教科書などを含む、本明細書で引用された全ての参考文献、およびそれらの中で引用された参考文献は、まだ引用されていない範囲まで、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。定義された用語、用語の用法、記載された技術などが含まれるがこれらに限定されない、組み込まれた文献および同様の資料のうち1つまたは複数、本出願とは異なる場合または本出願と矛盾する場合には、本出願が優先する。

【0355】

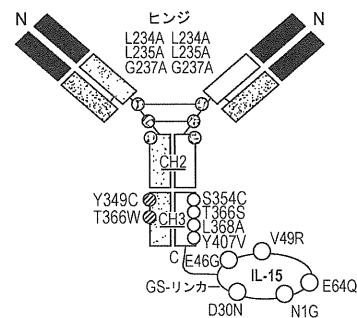
上述の説明および実施例は、本発明のある特定の具体的な態様を詳述し、本発明者らが企図する最良の形態を記載している。しかしながら、上述の詳細がいくら本文中に現れていても、本発明が多くの方法で実施され得、本発明が、添付の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従って解釈されるべきであることが、理解される。

10

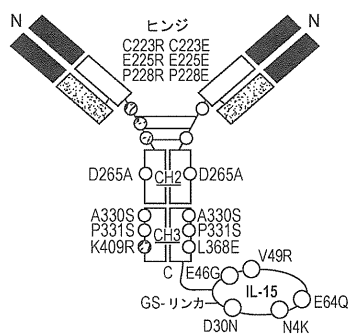
【図1A】



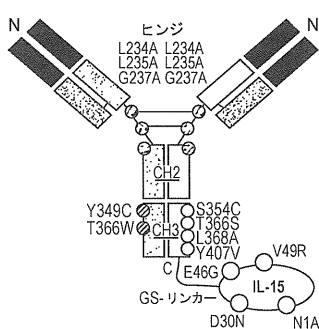
【図1C】



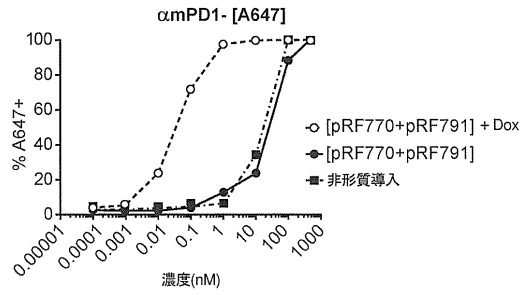
【図1B】



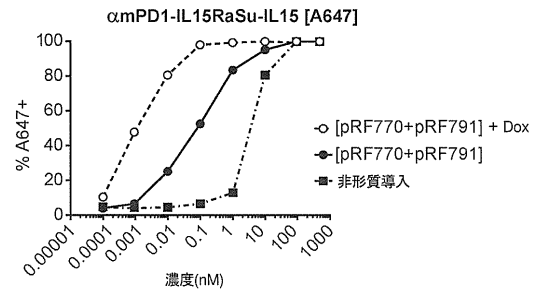
【図1D】



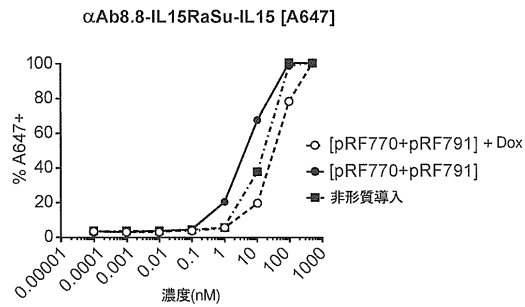
【図 2 A】



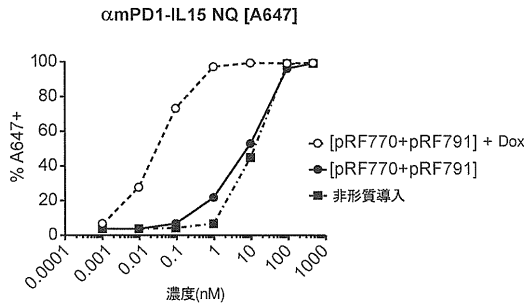
【図 2 C】



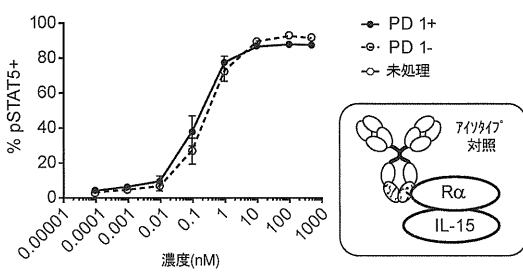
【図 2 B】



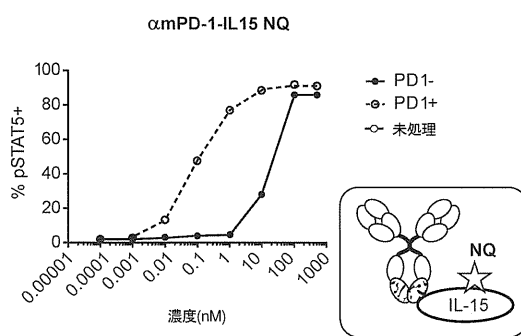
【図 2 D】



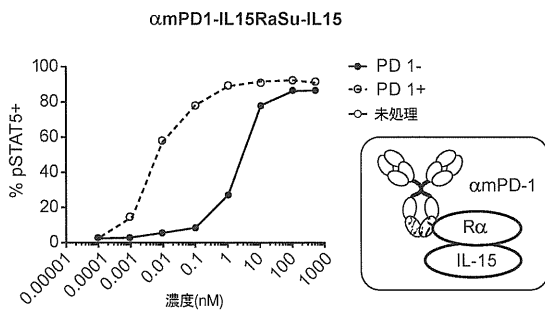
【図 3 A】



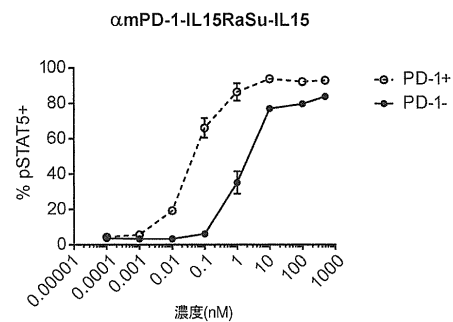
【図 3 C】



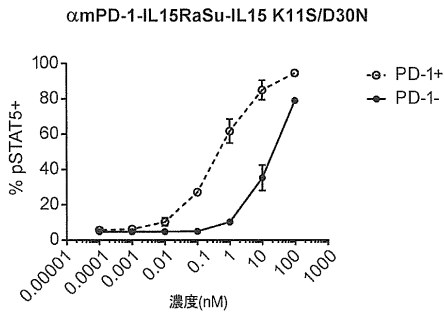
【図 3 B】



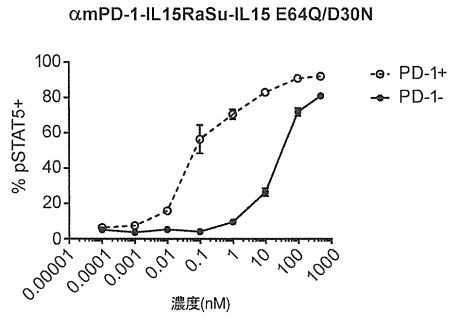
【図 4 A】



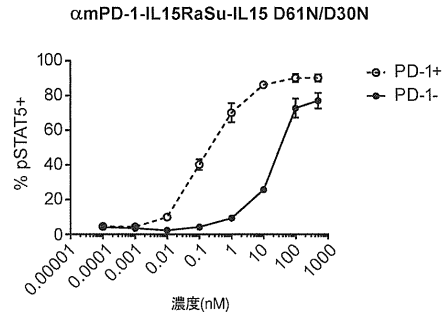
【図 4 B】



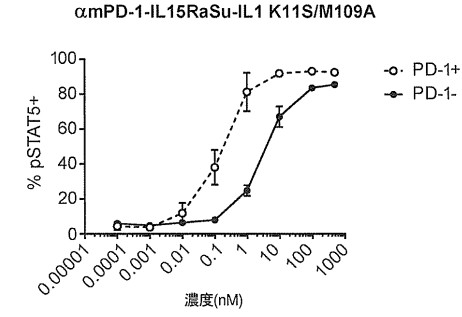
【図 4 D】



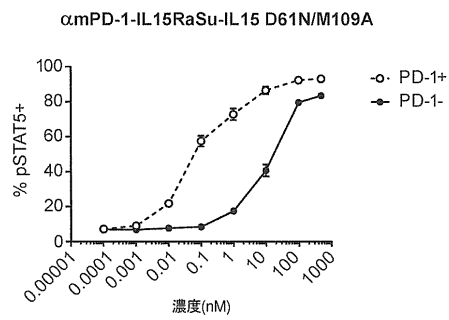
【図 4 C】



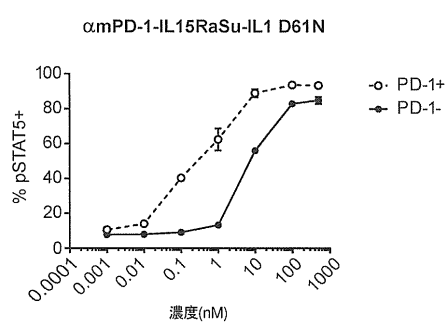
【図 4 E】



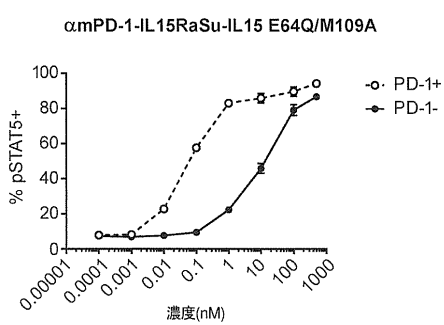
【図 4 F】



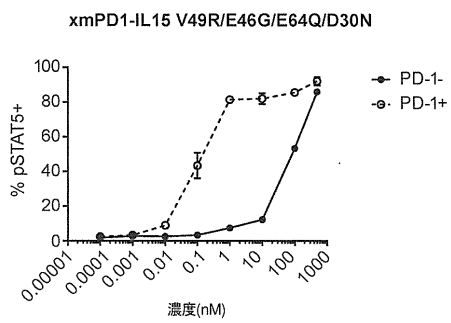
【図 4 H】



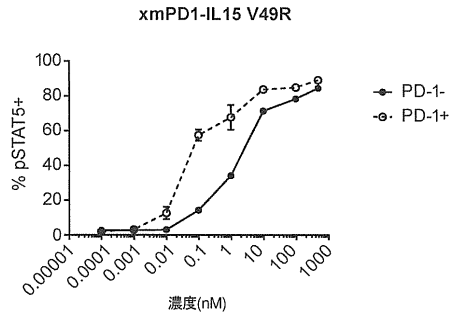
【図 4 G】



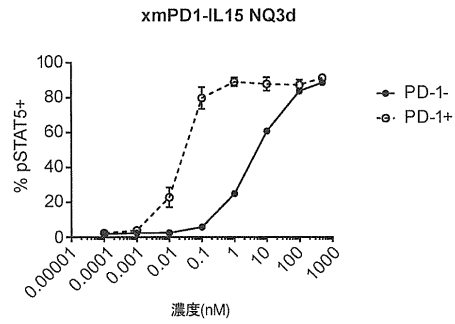
【図 5 A】



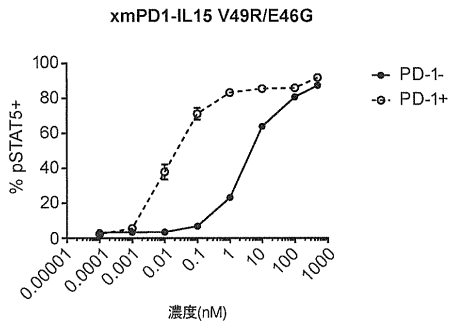
【図 5 B】



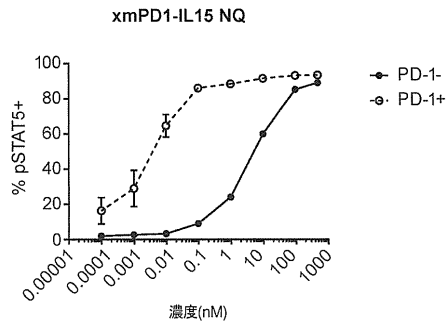
【図 5 D】



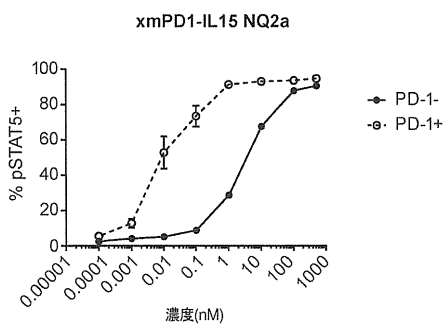
【図 5 C】



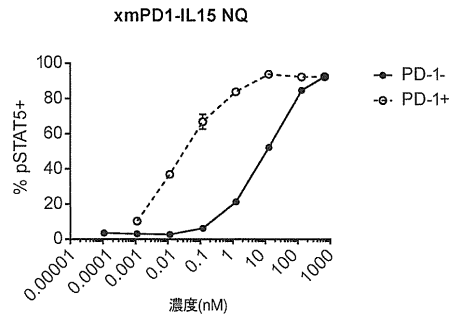
【図 5 E】



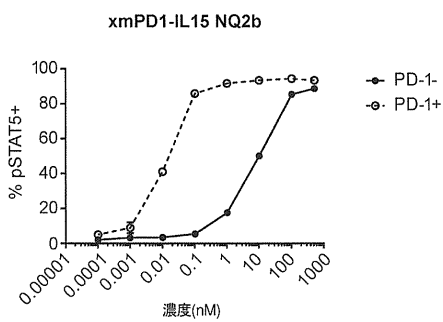
【図 5 F】



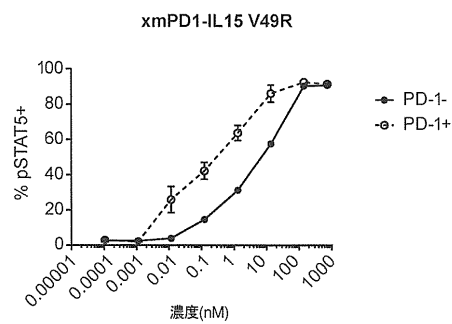
【図 6 A】



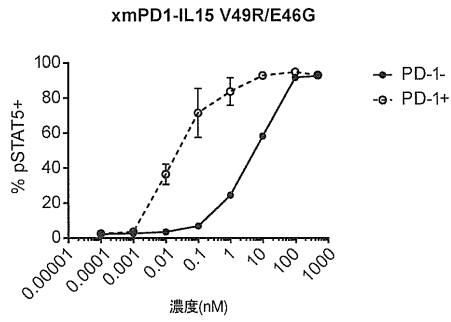
【図 5 G】



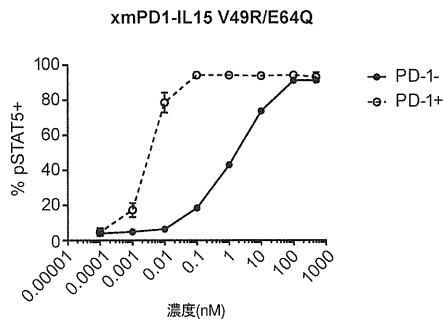
【図 6 B】



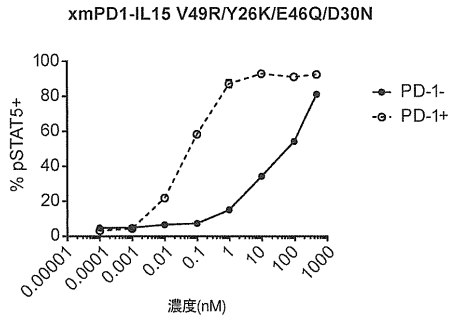
【図 6 C】



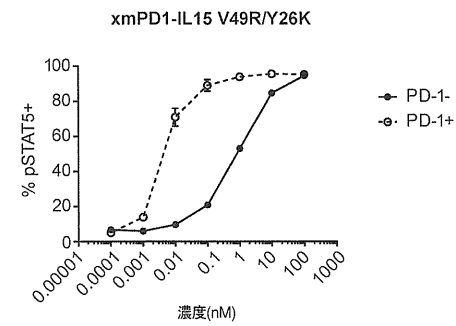
【図 6 E】



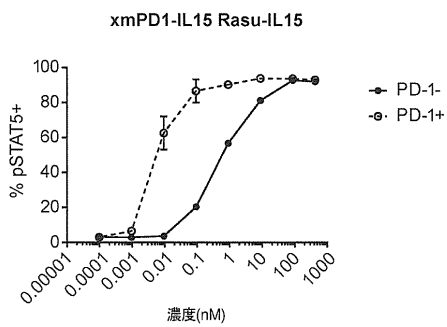
【図 6 D】



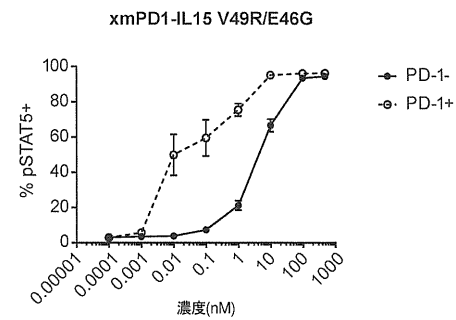
【図 6 F】



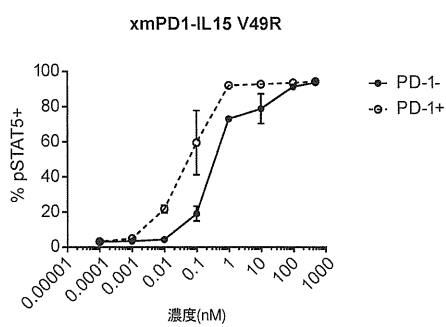
【図 6 G】



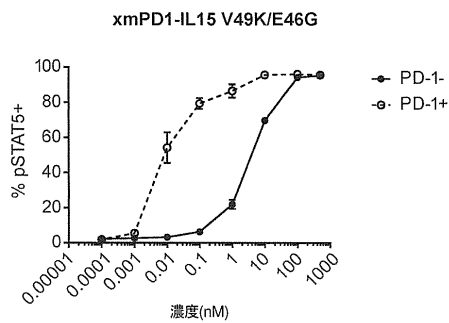
【図 7 B】



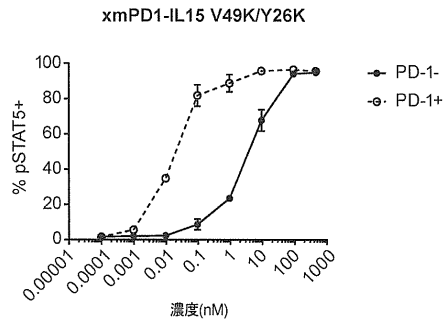
【図 7 A】



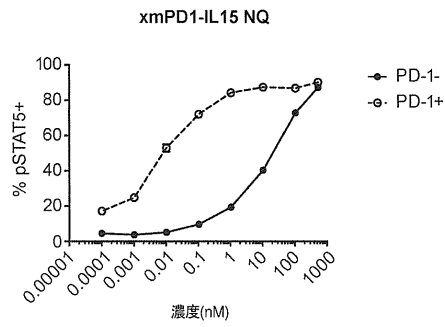
【図 7 C】



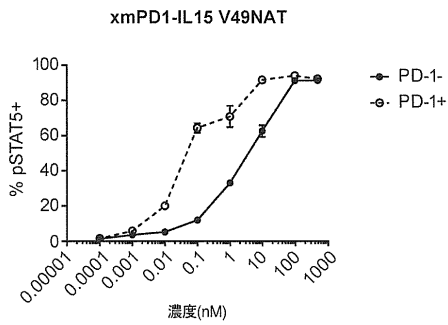
【図 7 D】



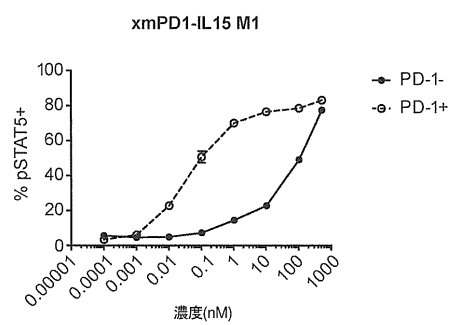
【図 7 F】



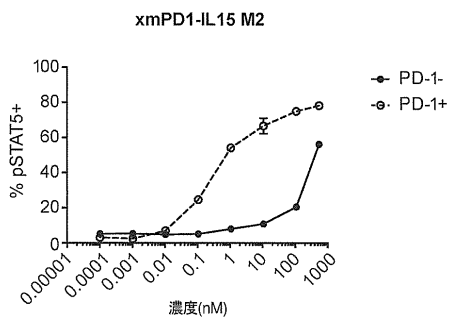
【図 7 E】



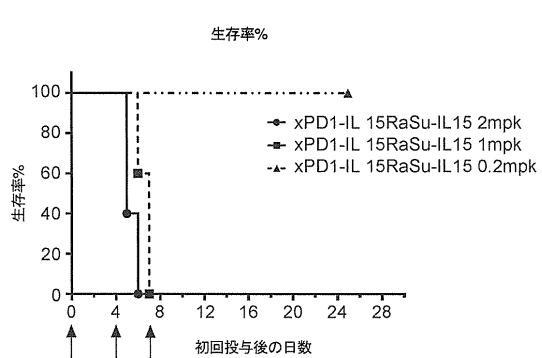
【図 7 G】



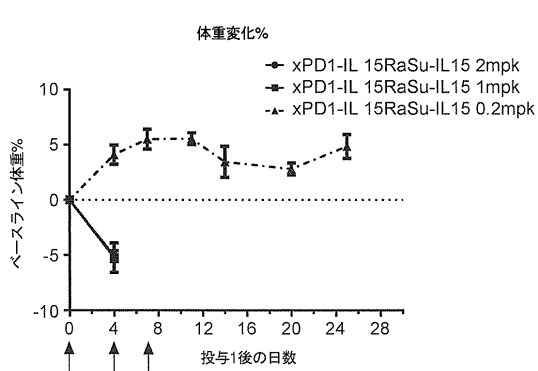
【図 7 H】



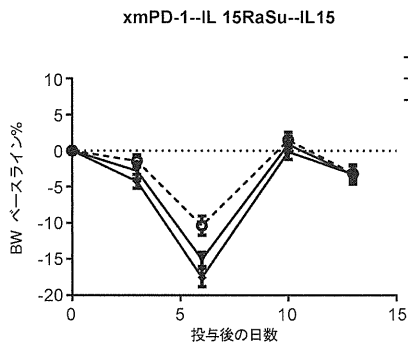
【図 8 B】



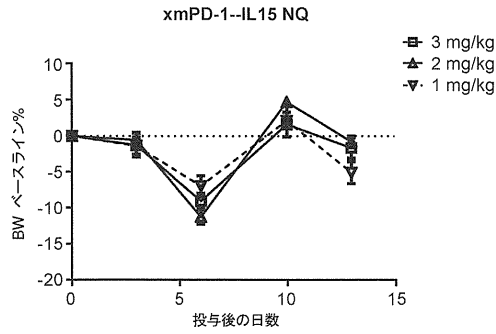
【図 8 A】



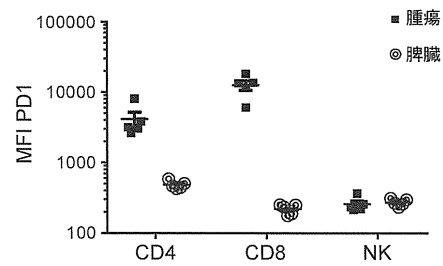
【図 8 C】



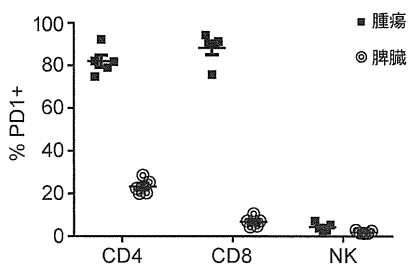
【図 8 D】



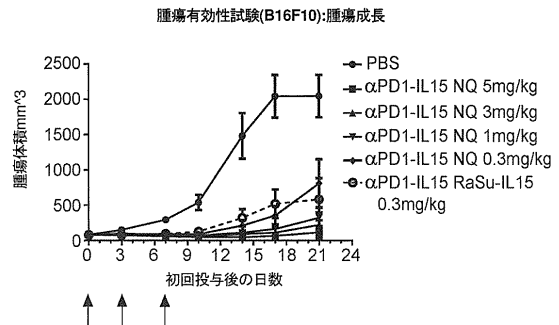
【図 9 B】



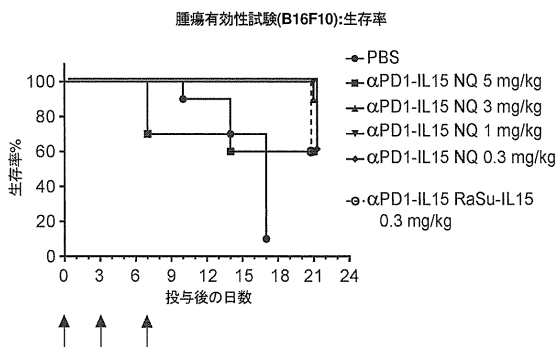
【図 9 A】



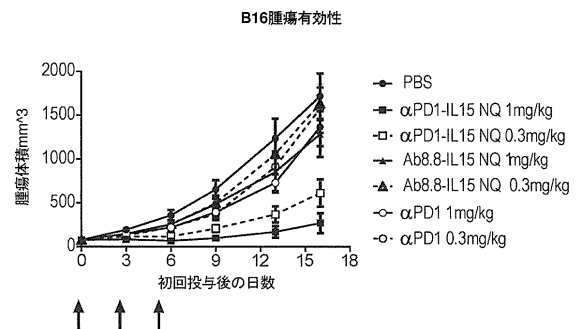
【図 10 A】



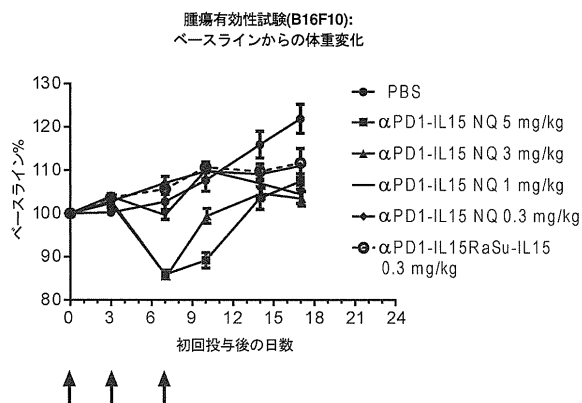
【図 10 B】



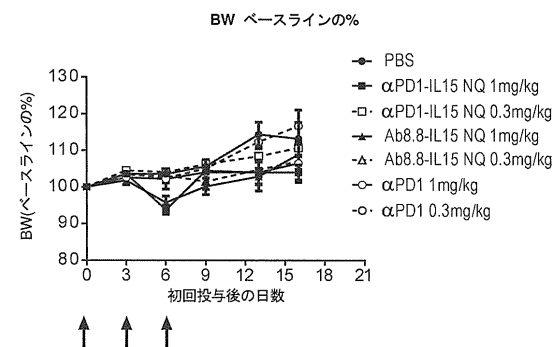
【図 11 A】



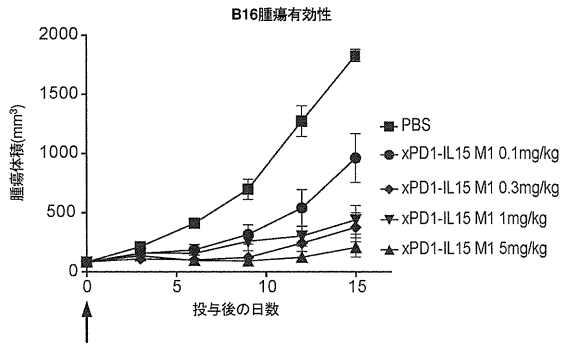
【図 10 C】



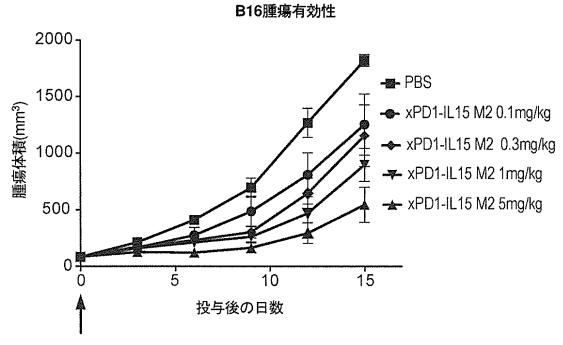
【図 11 B】



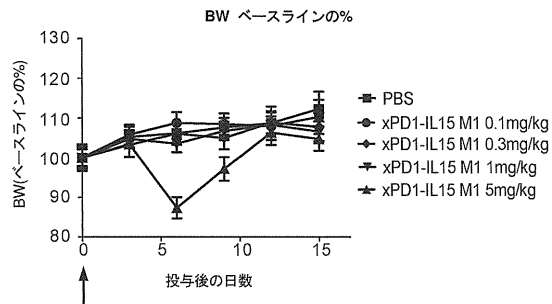
【図 1 1 C】



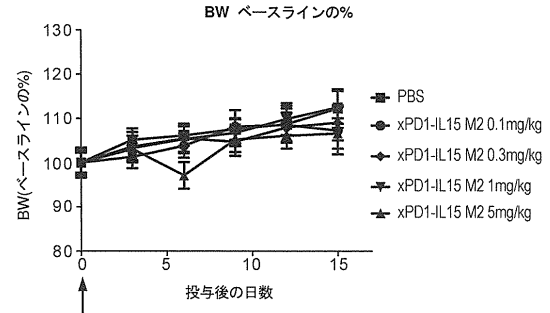
【図 1 1 E】



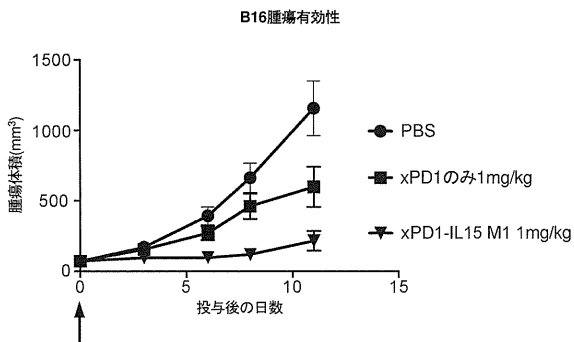
【図 1 1 D】



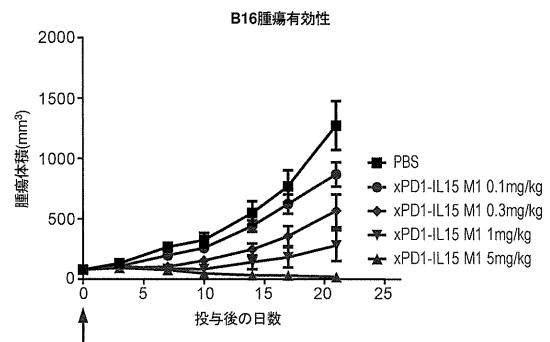
【図 1 1 F】



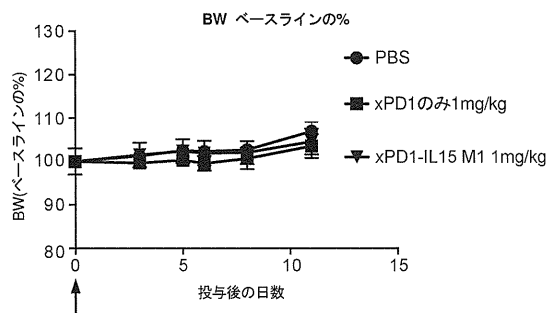
【図 1 1 G】



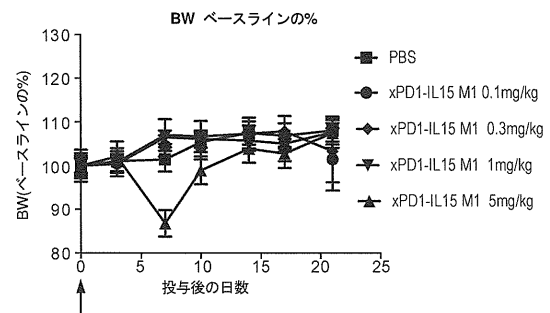
【図 1 1 I】



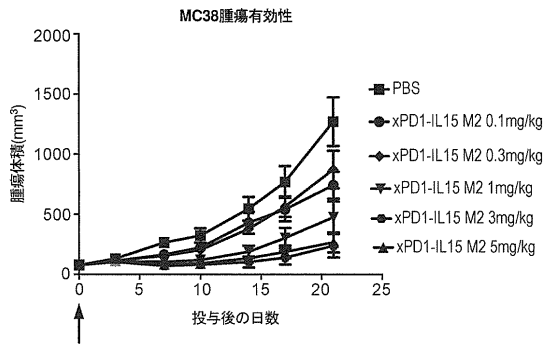
【図 1 1 H】



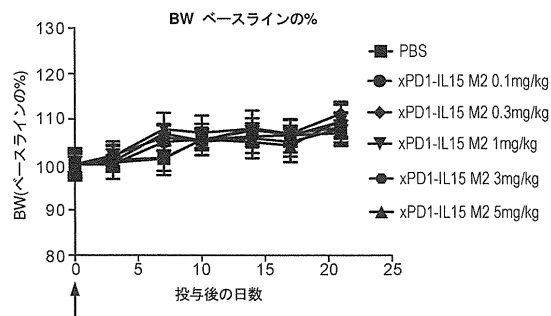
【図 1 1 J】



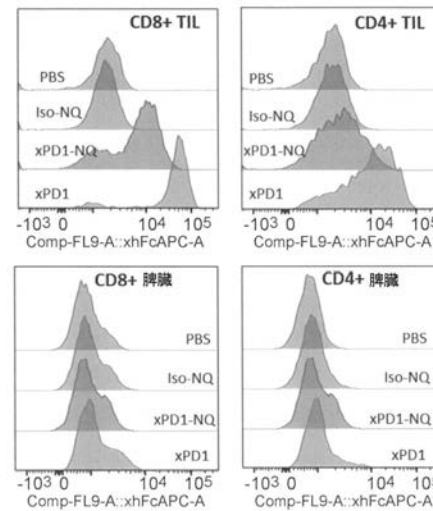
【図 1 1 K】



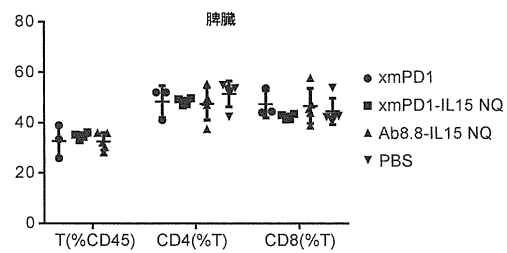
【図 1 1 L】



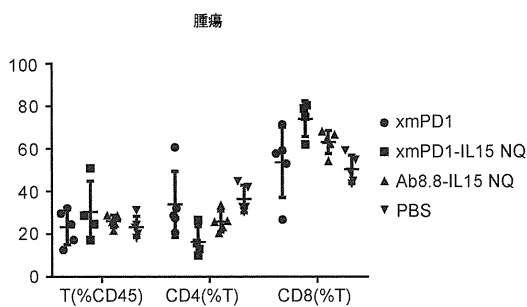
【図 1 2 A】



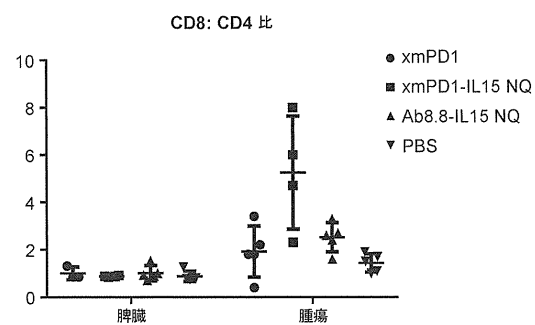
【図 1 2 B】



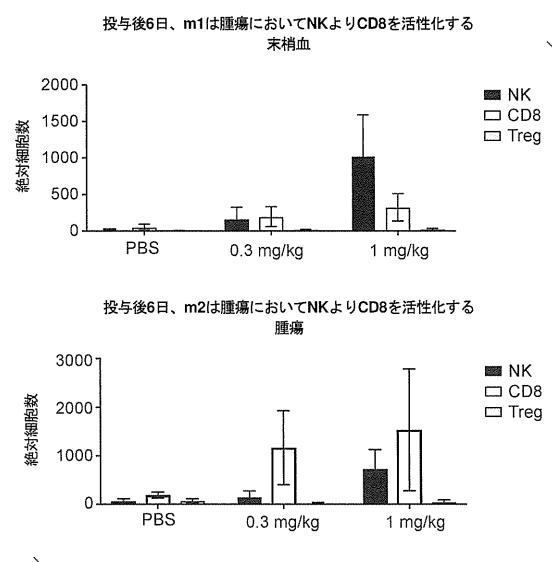
【図 1 2 C】



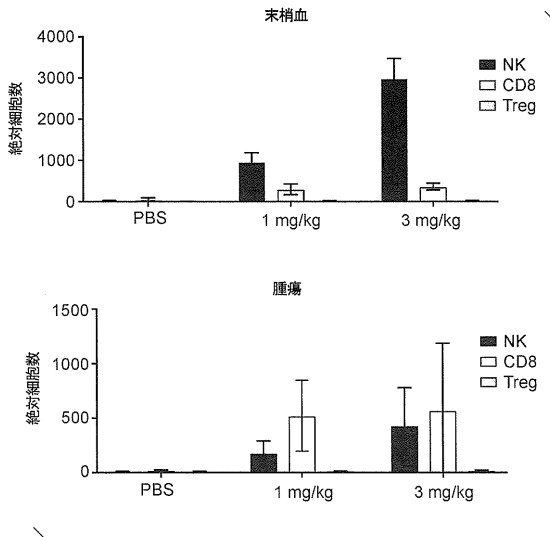
【図 1 2 D】



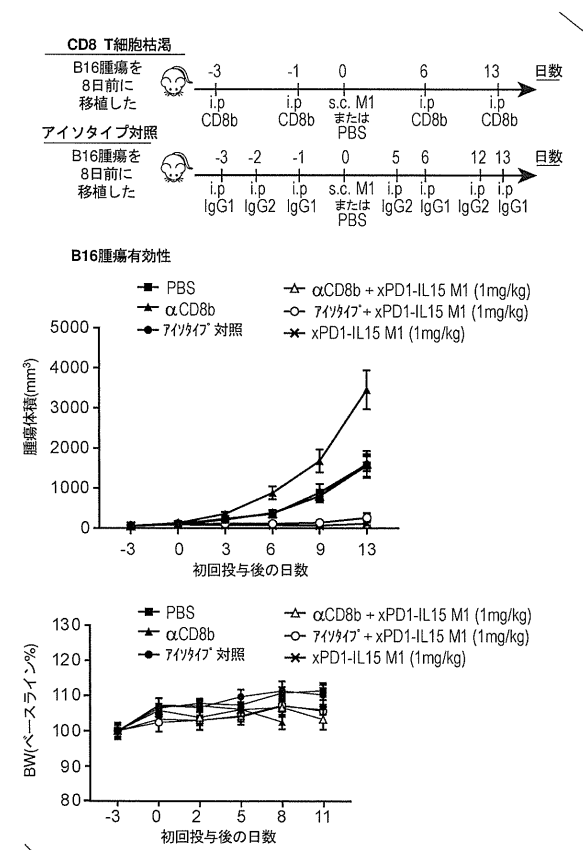
【図 1 3 A】



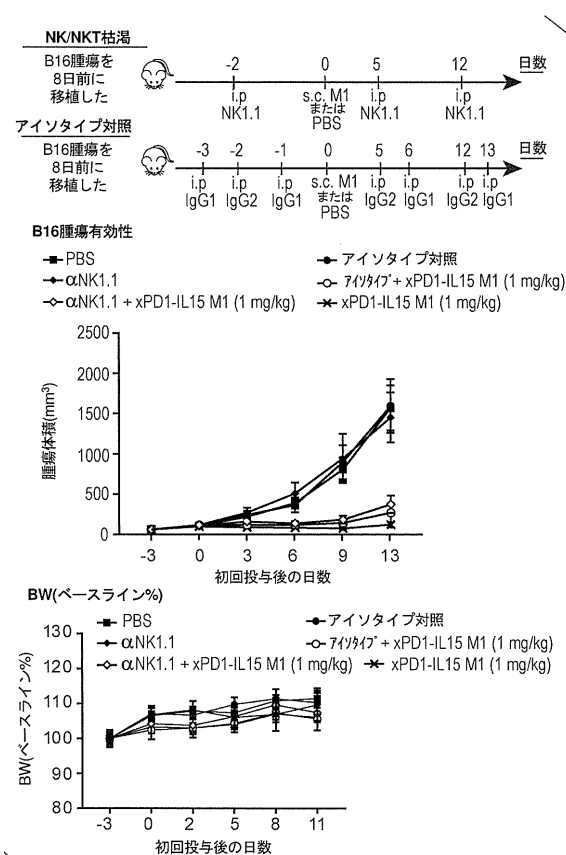
【図 1 3 B】



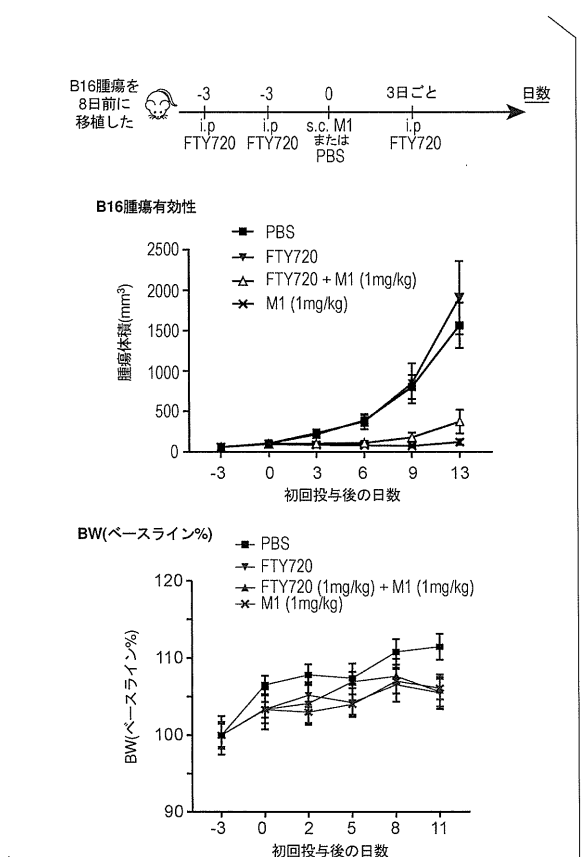
【図 1 3 C】



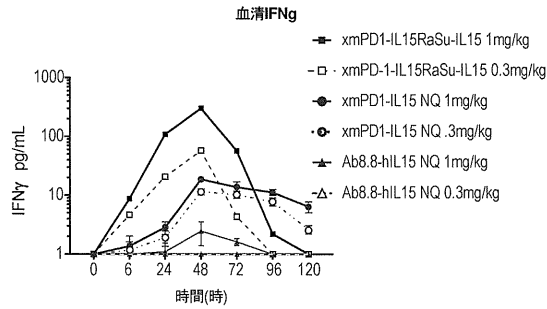
【図 1 3 D】



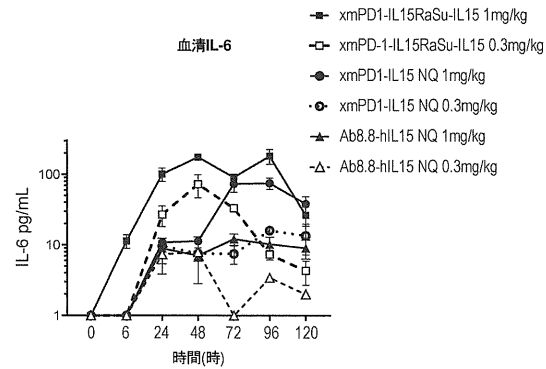
【図 1 3 E】



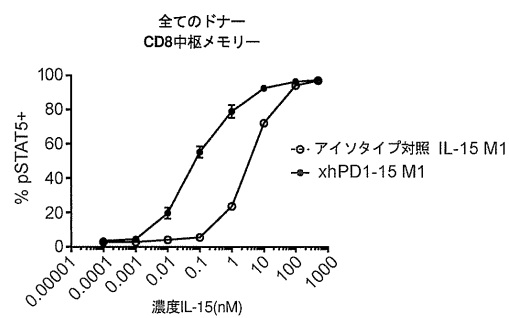
【図 1 4 A】



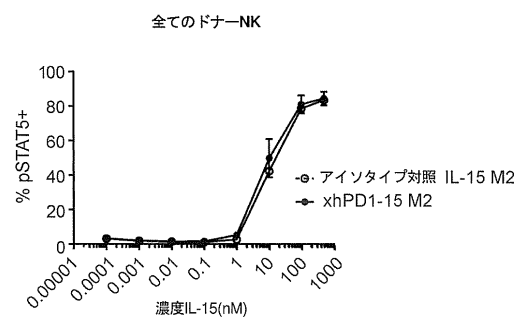
【図 1 4 B】



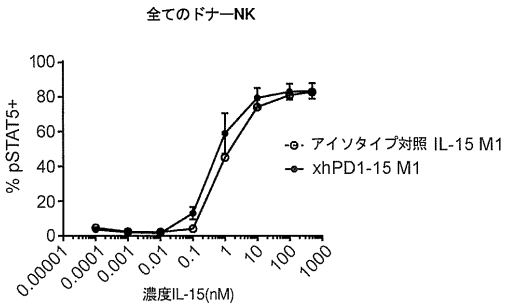
【図 1 5 C】



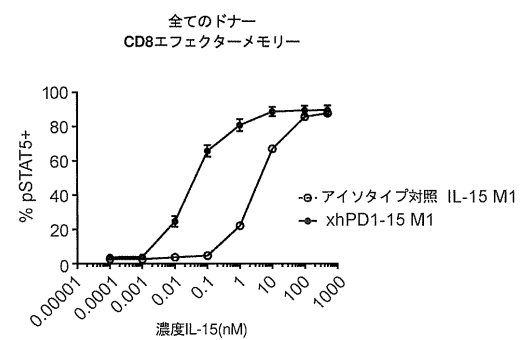
【図 1 5 D】



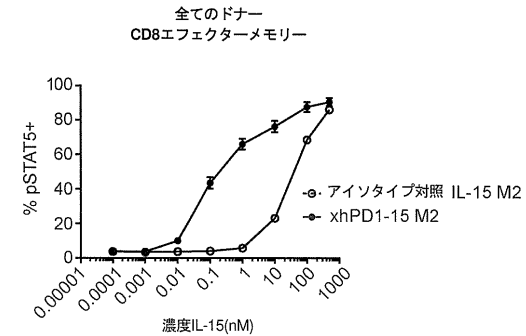
【図 1 5 A】



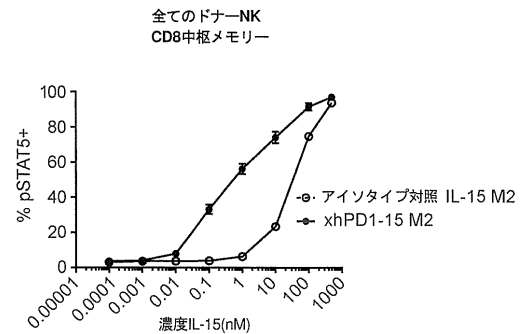
【図 1 5 B】



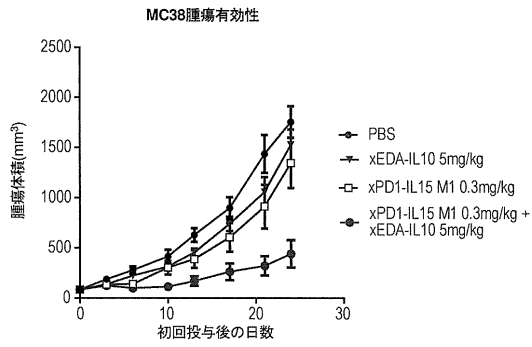
【図 1 5 E】



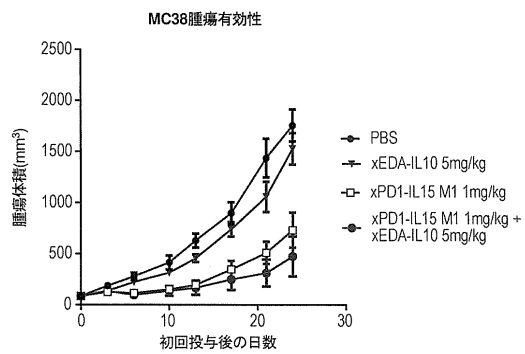
【図 1 5 F】



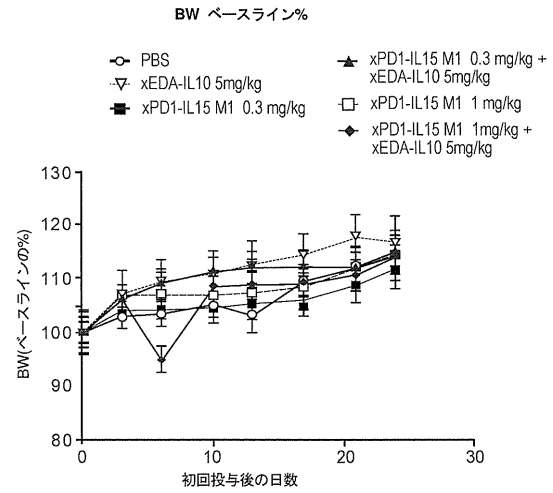
【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



【図 1 6 C】



【配列表】

2021516045000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/051539

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/54 A61K38/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

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

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

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIAOYI YANG ET AL: "Molecular Characterization and Functional Activity of an IL-15 Antagonist MutIL-15/Fc Human Fusion Protein", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 10, no. 2, 22 January 2013 (2013-01-22), pages 717-727, XP055582655, US ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp300513j abstract page 718, left-hand column, line 34 - line 60 page 721, right-hand column, line 19 - page 722, left-hand column, line 7; figure 2 ----- -/--	1-4, 25-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2019

Date of mailing of the international search report

17/07/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2019/051539

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GUO YIN ET AL: "Immunobiology of the IL-15/IL-15R[alpha] complex as an antitumor and antiviral agent", CYTOKINE AND GROWTH FACTOR REVIEWS, vol. 38, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 10-21, XP085253997, ISSN: 1359-6101, DOI: 10.1016/J.CYTOGFR.2017.08.002 abstract; figures 1-4 page 15, right-hand column - page 19, left-hand column, paragraph 1 -----	1-4, 25-40
A	EP 3 235 830 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO [CN] ET AL.) 25 October 2017 (2017-10-25) paragraph [0011] - paragraph [0011]; claim 3 -----	1-4, 25-40
A	EP 3 064 507 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE] ET AL.) 7 September 2016 (2016-09-07) paragraph [0028] - paragraph [0033] -----	1-4, 25-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/051539

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, 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.:
1-4(completely); 25-40(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ IB2019/ 051539

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4(completely); 25-40(partially)

A human IL15 variant comprising a glycosylated amino acid substitution at position V49 with decreased or no binding to human IL15R alpha and human IL2R beta gamma

2. claims: 5-8(completely); 25-40(partially)

A human IL15 variant comprising an amino acid substitution at positions E46 and V49 with decreased or no binding to human IL15R alpha and human IL2R beta gamma

3. claims: 9-12(completely); 18-40(partially)

A fusion protein comprising an antibody with an Fc domain and a human IL15 mutein variant having a glycosylated amino acid substitution at position 49, wherein the Fc domain of the antibody moiety has decreased or no ADCC activity

4. claims: 13-17(completely); 18-40(partially)

A fusion protein comprising an antibody with an Fc domain and a human IL15 mutein variant having amino acid substitutions at positions E46 and V49, wherein the Fc domain of the antibody moiety has decreased or no ADCC activity

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2019/051539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3235830	A1	25-10-2017	AU 2015366795 A1
			BR 112017012600 A2
			CA 2970385 A1
			CN 106459219 A
			EP 3235830 A1
			JP 2018500316 A
			KR 20170094341 A
			RU 2017124289 A
			TW 201623326 A
			US 2019070264 A1
			WO 2016095642 A1
EP 3064507	A1	07-09-2016	BR 112017018975 A2
			CA 2978808 A1
			CN 107636015 A
			EP 3064507 A1
			EP 3265478 A1
			JP 2018512168 A
			US 2018044391 A1
			WO 2016142314 A1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
				1 1 1
				C

(31)優先権主張番号 62/784,302

(32)優先日 平成30年12月21日(2018.12.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(72)発明者 イェン, イク・アンディ

アメリカ合衆国カリフォルニア州94080, サウス・サンフランシスコ, アバロン・ドライブ 288

(72)発明者 フェルドマン, レイド・マーティン・レニー

アメリカ合衆国カリフォルニア州94117, サンフランシスコ, ページ・ストリート 1653

(72)発明者 チュー, リン・ホン・マシュー

アメリカ合衆国カリフォルニア州95128, サン・ホセ, ティーツリー・コート 692

(72)発明者 チャパルロ・リガース, ハビエル・フェルナンド

アメリカ合衆国カリフォルニア州94401, サン・マテオ, ノース・デラウェア・ストリート 816, ナンバー 411

(72)発明者 ジュレティク, イワナ

アメリカ合衆国カリフォルニア州94066, サン・ブルーノ, サンタ・ルチア・アベニュー 1241

(72)発明者 リン, ローラ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02493, ウェストン, ゴールデン・ボール・ロード 50

(72)発明者 モジアク, リディア

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02459, ニュートン, リトルフィールド・ロード 92

Fターム(参考) 4B064 AG01 AG03 AG27 CA10 CA19 CC24 CE03 CE06 CE11 CE12
DA01 DA14
4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 MA02 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 CA41 DA02 DA76 EA28
EA51 FA74 GA10 GA15 GA22 GA23 GA26