(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-533848
(P2024-533848A)
(43)公表日　令和6年9月12日(2024.9.12)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00	ZNA	4B065
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C076
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C084
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		4H045
A61K	*47/68*	*(2017.01)*	A61K	47/68		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全44頁）　最終頁に続く

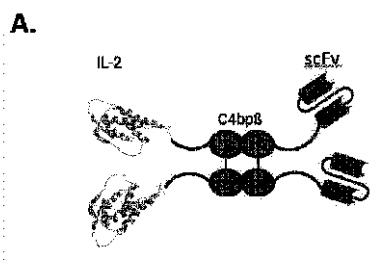
(21)出願番号　特願2024-520962(P2024-520962)
(86)(22)出願日　令和4年10月6日(2022.10.6)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月22日(2024.5.22)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/077847
(87)国際公開番号　WO2023/057588
(87)国際公開日　令和5年4月13日(2023.4.13)
(31)優先権主張番号　21306399.3
(32)優先日　令和3年10月6日(2021.10.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518083571
イルトゥー・ファルマ
ＩＬＴＯＯ ＰＨＡＲＭＡ
フランス７５０１３パリ、リュ・デ・ルキュレット１４番
(71)出願人　518059934
ソルボンヌ・ユニヴェルシテ
ＳＯＲＢＯＮＮＥ ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＥ
フランス国、７５００６ パリ、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥシーヌ２１
(71)出願人　591140123
アシスタンス ピュブリク－オピトー ドゥ パリ
ＡＳＳＩＳＴＡＮＣＥ ＰＵＢＬＩＱＵＥ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　炎症組織へのターゲティング特異性を備えるインターロイキン２キメラコンストラクト

(57)【要約】
本発明は、ｉ）インターロイキン２（ＩＬ２）部分と、ｉｉ）酸化タンパク質または酸化脂質に結合するターゲティング部分とを含む、標的に向けられたキメラコンストラクトに関する。ターゲティング部分は、特定の酸化タンパク質または酸化脂質を結合する抗体またはｓｃＦｖであるのが好ましく、融合タンパク質を標的である炎症性組織に向かわせる。キメラコンストラクトは、好ましくは、二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質（Ｃ４ＢＰ）のベータ鎖をさらに含む。
【選択図】図１Ａ

FIGURE 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２（ＩＬ２）部分と；
ｉｉ）酸化タンパク質または酸化脂質に結合する少なくとも１つのターゲティング部分と
を含む、キメラコンストラクト。
【請求項２】
ターゲティング部分が、炎症誘発性の酸化タンパク質または酸化脂質に結合する、請求項１に記載のキメラコンストラクト。
【請求項３】
ターゲティング部分が、酸化特異的エピトープ（ＯＳＥ）に結合する、請求項１または２に記載のキメラコンストラクト。
【請求項４】
ターゲティング部分が、（ｉ）マロンジアルデヒド（ＭＤＡ）エピトープに、（ｉｉ）２－（ω－カルボキシエチル）ピロール（ＣＥＰ）エピトープに、（ｉｉｉ）４－ヒドロキシノネナール（４－ＨＮＥ）エピトープに、または（ｉｖ）ホスホコリン含有酸化リン脂質（ＰＣ－ＯｘＰＬ）、酸化ホスファチジルエタノールアミン（ＯｘＰＥ）、酸化ホスファチジルセリン（ＯｘＰＳ）もしくは酸化カルジオリピン（ＯｘＣＬ）などの酸化リン脂質（ＯｘＰＬ）に、好ましくはホスホコリン含有酸化リン脂質（ＰＣ－ＯｘＰＬ）に、結合する、前記請求項のいずれか一項に記載のキメラコンストラクト。
【請求項５】
ターゲティング部分が、抗体または単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）などの抗体断片であり、好ましくは、ターゲティング部分が、Ｅ０６抗体またはＥ０６　ｓｃＦｖなどのＥ０６抗体断片；ＬＲ０４抗体またはＬＲ０４　ｓｃＦｖなどのＬＲ０４抗体断片；ＮＡ１７抗体またはＮＡ１７　ｓｃＦｖなどのＮＡ１７抗体断片；Ｅ０１４抗体またはＥ０１４　ｓｃＦｖなどのＥ０１４抗体断片；ＭＤＡ２抗体またはＭＤＡ２　ｓｃＦｖなどのＭＤＡ２抗体断片；ＩＫ１７抗体またはＩＫ１７　ｓｃＦｖなどのＩＫ１７抗体断片；ＬＲ０１抗体またはＬＲ０１　ｓｃＦｖなどのＬＲ０１抗体断片、およびそれらの機能性変異体からなる群から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載のキメラコンストラクト。
【請求項６】
ターゲティング部分が、
－　配列番号１２に示されるアミノ酸配列、または配列番号１２と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（ＶＨ）ドメイン；および
－　配列番号１１に示されるアミノ酸配列、または配列番号１１と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（ＶＬ）ドメイン
を含む、Ｅ０６　ｓｃＦｖまたはその変異体である、請求項５に記載のキメラコンストラクト。
【請求項７】
前記ＩＬ－２部分が、ヒトＩＬ－２またはその相同性変異体であり、該変異体は、ヒト野生型ＩＬ－２と少なくとも８５％のアミノ酸同一性を有し、好ましくは、該変異体は、ヒト野生型ＩＬ－２と少なくとも９０％のアミノ酸同一性を有するヒトＩＬ－２の活性型アナログであり、前記ＩＬ－２部分が、配列番号２のＮ８８位に置換を含むＩＬ２ムテインであることが好ましく、置換Ｎ８８ＲまたはＮ８８Ｄであることがさらに好ましい、前記請求項のいずれか一項に記載のキメラコンストラクト。
【請求項８】
ＩＬ２部分とターゲティング部分とが、インフレームで、またはアミノ酸リンカー、好ましくはポリＧリンカーを介して融合されている、前記請求項のいずれか一項に記載のキメラコンストラクト。

【請求項９】
前記キメラコンストラクトが、二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体をさらに含み、好ましくは、Ｃ４ＢＰβの断片が、Ｃ４ＢＰβのアミノ酸残基１９４～２５２、またはＮ末端で最大アミノ酸１３５まで及ぶＣ４ＢＰβのより長い断片を含むかまたはそれらからなる、前記請求項のいずれか一項に記載のキメラコンストラクト。
【請求項１０】
Ｃ４ＢＰβの機能性変異体を含み、Ｃ４ＢＰβの機能性変異体は、
ａ）Ｃ４ＢＰβの断片のアミノ酸の２５パーセント未満、好ましくは１０パーセント未満が切除されてあるかまたは置き換えられてあり、２０２位および２１６位に位置するシステインならびに各システインの上流および下流で少なくとも３個のアミノ酸が保存されてある、Ｃ４ＢＰβの断片の改変配列；または
ｂ）二量体化を担うシステインが、好ましくはアラニン、バリン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシンおよびトリプトファンから選択されるアミノ酸で置換されており、Ｃ４ＢＰβの断片の別のアミノ酸がシステインで置換されている、Ｃ４ＢＰβの断片の改変配列；または
ｃ）二量体化を担うシステインの間へのベータ鎖に対して異種性である配列の挿入によって改変されたＣ４ＢＰβの断片の配列；または
ｄ）二量体化を担うシステインの間のアミノ酸を切除することによって改変されたＣ４ＢＰβの断片の配列
を含む、請求項９に記載のキメラコンストラクト。
【請求項１１】
ＩＬ－２部分が、Ｃ４ＢＰβまたはその前記断片のＮ末端で融合されており、Ｃ４ＢＰβまたはその前記断片のＣ末端は、ターゲティング部分に連結されていることが好ましい、請求項９または１０に記載のキメラコンストラクト。
【請求項１２】
請求項１～１１のいずれかに記載のキメラコンストラクトをコードする核酸。
【請求項１３】
請求項１２に記載の核酸を含むベクター。
【請求項１４】
請求項１２に記載の核酸または請求項１３に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項１５】
自己免疫性疾患および／または炎症性疾患の治療に使用するための、請求項１～１１のいずれかに記載のキメラコンストラクト。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＩＬ２と炎症組織への特異性をもたらすターゲティング部分とを含むキメラコンストラクトに関する。
【背景技術】
【０００２】
インターロイキン－２（ＩＬ２またはＩＬ－２）は、免疫系のキーとなる側面を調節するサイトカインである。ＩＬ２は、がんならびに自己免疫性疾患および／または炎症性疾患の患者において免疫応答をブーストする試みで使用されてきた。ＩＬ２は強力なＴ細胞増殖因子であり、これは、抗原活性化Ｔ細胞のクローン性増殖を含めて免疫応答を促進し、ＣＤ４＋　Ｔヘルパー（Ｔｈ）１［（Ｔｈ）１］細胞およびＴｈ２細胞の発達を駆動し、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を終末的に分化させ、かつＣＤ４＋　Ｔｈ１７（Ｔｈ１７）細胞およびＴ濾胞性ヘルパー（Ｔｆｈ）細胞の発達に対抗する。ＩＬ２はまたＴ細胞記憶リコール応答を形づくる。
【０００３】

低用量のＩＬ２を使用して寛容を選択的にブーストし、その結果、自己組織の自己免疫様攻撃と関連する望ましくない免疫応答を抑制してきた。今日までの経験とは、この療法が安全であり、自己攻撃的Ｔ細胞の再活性化の徴候はないが、一方、制御Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）が患者ほぼ全員において増加し、このことは臨床的改善を伴うこと、であった。

【０００４】

それにもかかわらず、療法としてのＩＬ２については改善の余地がある、特に、ＩＬ２を目的の標的組織に送り込み、それによって目的の組織にて局所的に濃度を上昇させることによって、治療の有効性を改善することが望ましい。また、ＩＬ－２に応答して活性化することができるリンパ球集団の遍在的存在に関連する潜在的な「オフターゲット」効果を制限するために、ターゲティング特異性を備えるＩＬ２コンストラクトを提供する必要もある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明は、炎症性組織にターゲティング特異性を備えるＩＬ２キメラコンストラクトを提供する。

【０００６】

本発明者らは、驚くべきことに、そのような標的に向けられたキメラコンストラクトがＩＬ２治療の有効性を著しく改善することを示してきた。特に、本発明者らは、本発明の標的に向けられたキメラコンストラクトの使用が、炎症部位に動員されるＴｒｅｇ数の増加、およびＴｒｅｇの増殖の増加につながることを示してきた。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

具体的には、本発明のキメラコンストラクトは、（ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２部分と；ｉｉ）炎症誘発性の酸化タンパク質または酸化脂質などの酸化タンパク質または酸化脂質に結合する少なくとも１つのターゲティング部分とを含む。

【０００８】

好ましい実施形態では、ターゲティング部分は、酸化特異的エピトープ（ＯＳＥ）に結合する。特定の実施形態では、ターゲティング部分は、（ｉ）マロンジアルデヒド（ＭＤＡ）エピトープに、（ｉｉ）２－（ω－カルボキシエチル）ピロール（ＣＥＰ）エピトープに、（ｉｉｉ）４－ヒドロキシノネナール（４－ＨＮＥ）エピトープに、または（ｉｖ）ホスホコリン含有酸化リン脂質（ＰＣ－ＯｘＰＬ）、酸化ホスファチジルエタノールアミン（ＯｘＰＥ）、酸化ホスファチジルセリン（ＯｘＰＳ）もしくは酸化カルジオリピン（ＯｘＣＬ）などの酸化リン脂質（ＯｘＰＬ）に、好ましくはホスホコリン含有酸化リン脂質（ＰＣ－ＯｘＰＬ）に、結合する。

【０００９】

特定の実施形態では、ターゲティング部分は、抗体または単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）などの抗体断片である。

【００１０】

特定の実施形態では、ターゲティング部分は、Ｅ０６抗体またはＥ０６　ｓｃＦｖなどのＥ０６抗体断片；ＬＲ０４抗体またはＬＲ０４　ｓｃＦｖなどのＬＲ０４抗体断片；ＮＡ１７抗体またはＮＡ１７　ｓｃＦｖなどのＮＡ１７抗体断片；Ｅ０１４抗体またはＥ０１４　ｓｃＦｖなどのＥ０１４抗体断片；ＭＤＡ２抗体またはＭＤＡ２　ｓｃＦｖなどのＭＤＡ２抗体断片；ＩＫ１７抗体またはＩＫ１７　ｓｃＦｖなどのＩＫ１７抗体断片；ＬＲ０１抗体またはＬＲ０１　ｓｃＦｖなどのＬＲ０１抗体断片、およびそれらの機能性変異体、からなる群から選択される。

【００１１】

好ましい実施形態では、ターゲティング部分は、Ｅ０６抗体もしくはＥ０６　ｓｃＦｖなどのＥ０６抗体断片、またはそれらの機能性変異体である。

特定の実施形態では、Ｅ０６　ｓｃＦｖは、

－　配列番号１２に示されるアミノ酸配列、または配列番号１２と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（ＶＨ）ドメイン；および
－　配列番号１１に示されるアミノ酸配列、または配列番号１１と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（ＶＬ）ドメイン
を含む。

【００１２】

特定の実施形態では、ＩＬ－２部分は、ヒトＩＬ－２またはその相同性変異体であり、該変異体は、ヒト野生型ＩＬ－２と少なくとも８５％のアミノ酸同一性を有し、好ましくは、該変異体は、ヒト野生型ＩＬ－２と少なくとも９０％のアミノ酸同一性を有するヒトＩＬ－２の活性型アナログであり、前記ＩＬ－２部分は、配列番号２のＮ８８位に置換を含むＩＬ２ムテインであることが好ましく、置換Ｎ８８ＲまたはＮ８８Ｄであることがさらに好ましい。

【００１３】

特定の実施形態では、ＩＬ２部分とターゲティング部分とは、インフレームで、またはアミノ酸リンカー、好ましくはポリＧリンカーを介して融合されている。

【００１４】

特定の実施形態では、前記キメラコンストラクトは、二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体をさらに含む。

【００１５】

特定の実施形態では、Ｃ４ＢＰβの断片は、Ｃ４ＢＰβのアミノ酸残基１９４～２５２、またはＮ末端で最大アミノ酸１３５まで及ぶＣ４ＢＰβのより長い断片を含むかまたはそれらからなる。

【００１６】

特定の実施形態では、キメラコンストラクトは、Ｃ４ＢＰβの機能性変異体を含み、Ｃ４ＢＰβの機能性変異体は、
ａ）Ｃ４ＢＰβの断片のアミノ酸の２５パーセント未満、好ましくは１０パーセント未満が切除されてあるかまたは置き換えられてあり、２０２位および２１６位に位置するシステインならびに各システインの上流および下流で少なくとも３個のアミノ酸が保存されてある、Ｃ４ＢＰβの断片の改変配列；または
ｂ）二量体化を担うシステインが、好ましくはアラニン、バリン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシンおよびトリプトファンから選択されるアミノ酸で置換されており、Ｃ４ＢＰβの断片の別のアミノ酸がシステインで置換されている、Ｃ４ＢＰβの断片の改変配列；または
ｃ）二量体化を担うシステインの間へのベータ鎖に対して異種性である配列の挿入によって改変されたＣ４ＢＰβの断片の配列；または
ｄ）二量体化を担うシステインの間のアミノ酸を切除することによって改変されたＣ４ＢＰβの断片の配列
を含む。

【００１７】

特定の実施形態では、ＩＬ－２部分は、Ｃ４ＢＰβまたはその前記断片のＮ末端で融合されており、Ｃ４ＢＰβまたはその前記断片のＣ末端はターゲティング部分に融合されていることが好ましい。

【００１８】

特定の実施形態では、キメラコンストラクトは、二量体形態であり、単量体は、Ｃ４ＢＰβの２個のシステイン同士の間の共有結合によって会合している。ホモ二量体およびヘテロ二量体については、下でさらに詳しく説明する。

【００１９】

本発明の別の態様は、本発明のキメラコンストラクトをコードする核酸に関する。本発明はまた、前記核酸を含むベクターに、および前記核酸または前記ベクターを含む宿主細胞にも関する。

【００２０】

本発明はまた、自己免疫性疾患および／または炎症性疾患の治療に使用するための、本発明のキメラコンストラクトにも関する。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１】図１：標的に向けられた融合タンパク質の機能設計のインビトロ（Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）評価。標的に向けられた融合タンパク質のそれぞれをコードする導入遺伝子を含有するレンチウイルスベクターを形質導入した安定なＨＥＫ　２９３Ｔ細胞株を、無血清培地中で４８時間培養した。Ａ）標的に向けられた融合タンパク質の設計Ｂ）酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）による、安定したＨＥＫ　２９３Ｔ細胞上清中の標的に向けられた融合タンパク質の検出。Ｃ）次いで、濃縮および濾過した上清を使用して、ＩＬ２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖおよびＩＬ２Ｎ８８Ｒ－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖを、一次ポリクローナル抗ヒトＩＬ－２抗体または一次モノクローナル抗ヒスチジン抗体のいずれかを使用するウェスタンブロットによって特徴付けた。Ｄ）標的に向けられた融合タンパク質の機能活性を、フローサイトメトリーを使用したヒトＣＤ４＋制御性Ｔ細胞、ＣＤ４＋通常型Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＮＫ細胞におけるＳＴＡＴ５リン酸化（ｐＳＴＡＴ５）応答の評価によって評価した。

【図２】図２：大腸炎炎症実験モデルにおける標的に向けられた融合タンパク質の治療効果。Ａ）６～８週齢のＣ５７ＢＬ／６（Ｊｒｊ）雌性マウス（ｎ＝６）を、ＩＬ２、ｓｃＦｖＥ０６、ＩＬ２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６またはＩＬ２$_{Ｎ８８Ｒ}$－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６をコードするＡＡＶ　５．１０^{１０}～５．１０^{１１}ｖｇ（ウイルスゲノム）で腹腔内経路により注射するかまたは治療せずに放置しておき、その７日後、水で希釈したデキストラン硫酸ナトリウム（２％）を６日間経口投与することにより免疫を行った。ＡＡＶ注射の７日後の末梢血中のＣＤ４＋　ＴｒｅｇおよびＣＤ２５　ＭＦＩ、ＣＤ４＋　Ｔｃｏｎｖ　ＣＤ２５＋およびＮＫ細胞の免疫モニタリング解析を実施した（Ｂ）。臨床疾患の評価は、体重減少（Ｃ）、便形（Ｄ）、出血（Ｅ）、および疾患活動性指数（Ｆ）に基づいている。上腕リンパ節および大動脈周囲リンパ節におけるインテグリンα４β７（Ｇ）およびＫｉ６７（Ｈ）を発現するＴｒｅｇの免疫モニタリング解析。統計学的有意性については、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍバージョン６．００を使用してＡＵＣの算出の後に治療に関して異なる群間で評価し、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定（平均値の比較、対応のない検定、ノンパラメトリック検定、両側Ｐ値）を使用して算出したが、この場合、Ｐ＜０．０５（＊）を統計学的有意性と解釈した（＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１）。すべてのグラフで、誤差バーは平均値の標準誤差（ＳＥＭ）を表す。

【図３】図３は、ＩＬ２またはＩＬ２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６の単回注射後のマウスにおける薬物動態を報告するグラフである。

【図４】図４は、ＤＳＳ誘導性大腸炎マウスモデルにおける免疫化学染色の写真のグループである。ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６で治療したマウスのみが、結腸おいてＩＬ２と６Ｘ－ＨｉｓＴａｇの両方の検出を示した。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

定義

治療する「対象」または「患者」は、あらゆる哺乳動物、好ましくはヒトとすることができる。ヒト対象は小児であっても成人であっても高齢者であってもよい。

【００２３】

「治療する」または「治療」という用語は、疾患における任意の改善を意味する。本用語には、少なくとも１つの症状の緩和することまたは疾患の重症度もしくは発達を減少させることが含まれる。疾患が炎症性障害および／または自己免疫性障害である場合、本用

語にはより詳しくは、急性エピソード（フレア）のリスク、発生または重症度を減少させることが含まれる。「治療する」または「治療」という用語は、疾患の進行を減少させることを包含する。特に本発明は、疾患進行を予防することまたは減速させることを包含する。「治療する」または「治療」という用語は、とりわけ、無症候性であるが「リスクがある」と診断された対象において、リスクを減少させることまたは疾患の発症を遅延させることによる、予防的治療をさらに包含する。

【００２４】

「制御Ｔ細胞」または「Ｔｒｅｇ」とは、免疫抑制性活性を有するＴリンパ球である。天然Ｔｒｅｇは、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３＋細胞として特徴付けられる。Ｔｒｅｇは炎症性疾患の制御に主要な役割を演ずるが、このような疾患におけるその作用様式は十分には理解されていない。実際、大部分の炎症性疾患において、Ｔｒｅｇ除去は疾患を悪化させ、一方、Ｔｒｅｇ付加は疾患を縮小させる。大部分のＴｒｅｇはＣＤ４＋細胞であるが、抑制活性を有するＣＤ８＋Ｆｏｘｐ３＋Ｔリンパ球の稀な集団も存在する。

【００２５】

本出願の文脈において、「エフェクターＴ細胞」（または「Ｔｅｆｆ」）とは、１つ以上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現し、エフェクター機能（例えば、細胞傷害性活性、サイトカイン分泌等）を果たす、Ｔｒｅｇ以外の通常型Ｔリンパ球（文献ではＴｃｏｎｖと称されることもある）を示す。本発明によるヒトＴｅｆｆの主要集団には、ＣＤ４＋　Ｔヘルパーリンパ球（例えば、Ｔｈ０、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ９、Ｔｈ１７、Ｔｆｈ）およびＣＤ４＋またはＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球が含まれ、その集団は自己抗原に特異的である場合がありまたは非自己抗原に特異的である場合もある。ＴｅｆｆはＦｏｘｐ３＋制御性ＣＤ８＋Ｔ細胞を含まない。

【００２６】

本出願の文脈において、「Ｔ濾胞性ヘルパー細胞」（または「Ｔｆｈ」）とは、ＢｃＬ６、ＣＸＣＲ５およびＰＤ１を発現し、Ｆｏｘｐ３－であり、Ｂ細胞ヘルプを供給するＴＣＤ４＋リンパ球を示す。

【００２７】

本出願の文脈において、「Ｔ濾胞性制御性細胞」（または「Ｔｆｒ」）とは、ＣＤ４＋ＣＸＣＲ５＋ＰＤ－１＋Ｂｃｌ６＋Ｆｏｘｐ３＋ＣＤ２５－Ｔリンパ球を示す。

【００２８】

抗体は、他の物質に結合するよりも、大きい親和性で、大きい結合活性で、いっそう容易におよび／または大きい持続期間で結合する場合、標的抗原に「特異的に結合する」。「特異的な結合」または「優先的な結合」は、必ずしも排他的な結合であることを要さない（含むことはできるが）。一般に、必ずしもではないが、結合への言及は、優先的な結合を意味する。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野で知られており、そのいずれも本開示の目的のために使用することができる。

【００２９】

「抗体断片」とは、抗体の部分のみを含み、この場合、当該部分は、インタクトな抗体に存在する場合、その部分に通常関連する機能のうちの少なくとも１つ、より普通にはほとんどまたはすべてを通常には保持する。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、およびＦｖ断片；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。一実施形態では、抗体断片は、元来の抗体の抗原結合部位を含み、したがって、抗原を結合する能力を保持する。別の実施形態では、抗体断片、例えば、Ｆｃ領域を含むものは、元来の抗体に存在する場合にはＦｃ領域に通常関連する生物学的機能のうちの少なくとも１つ、例えば、ＦｃＲｎ結合、抗体半減期モジュレーション、ＡＤＣＣ機能および補体結合、を保持する。

【００３０】

抗原結合性領域または抗原結合断片は、抗体のＹ字状構造のアームに相当し、このアームはそれぞれ、重鎖のＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインと対合した完全な軽鎖から構成され、「Ｆａｂ断片」（抗原結合性断片に対して）と呼ばれる。Ｆａｂ断片は、天然免疫

グロブリン分子からパパイン消化により最初に生成されたが、パパイン消化は、抗体分子をヒンジ領域において鎖間ジスルフィド結合のアミノ末端側で切断し、よって同一の２つの抗原結合性アームを放出する。ペプシンなどの他のプロテアーゼもまた抗体分子をヒンジ領域において、しかし鎖間ジスルフィド結合のカルボキシ末端側で切断し、その結果、同一の２つのＦａｂ断片から構成され、ジスルフィド結合を介して連結されたままである断片を放出する；Ｆ（ａｂ’）２断片のジスルフィド結合を還元するとＦａｂ’断片が生成される。

【００３１】

ＶＨドメインおよびＶＬドメインに相当する抗原結合領域の部分は、Ｆｖ断片（可変性の断片に対して）と呼ばれる；上記部分は、抗原結合部位（パラトープとも呼ばれる）を形成するＣＤＲ（相補性決定領域）を含有する。

【００３２】

エフェクター分子または細胞へのその結合を担う抗体のエフェクター領域は、Ｙ字状構造の本幹に相当し、重鎖の対合したＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメイン（または抗体のクラスに応じて、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＨ４の各ドメイン）を含有し、Ｆｃ領域（結晶性領域の断片に対して）と呼ばれる。

【００３３】

「単鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」抗体断片は、抗体のＶＨドメインおよびＶＬドメインを含み、この場合、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、ｓｃＦｖポリペプチドは、ＶＨドメインとＶＬドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これによりｓｃＦｖが抗原結合に望ましい構造を形成することが可能になる。リンカーは通常、柔軟性のためのグリシンならびに溶解性のためのセリンまたはスレオニンに富んでおり、ＶＨのＮ末端をＶＬのＣ末端と接続するか、またはその逆に接続することができる。こういったｓｃＦｖ断片は、定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、元来の抗体の特異性を保持する。

【００３４】

配列表に以下の配列を示す：

配列番号１は野生型ヒトＩＬ２（２５３個のアミノ酸、シグナルペプチドを含む）である

配列番号２は成熟野生型ヒトＩＬ２（２３３個のアミノ酸、シグナルペプチド無し）である

配列番号３は、Ｃ４ＢＰベータ鎖（１～２５２）である

配列番号４は、Ｃ４ＢＰベータ鎖の断片１９４～２５２である

配列番号５は、Ｃ４ＢＰベータ鎖の断片１３７～２５２である

配列番号６は、シグナルペプチドを含むＣ４ＢＰβＣの末端領域に融合されたヒトＩＬ－２（Ｈｉ２ｃｂ）のアミノ酸配列である

配列番号７は、Ｃ４ＢＰβのＣ末端領域に融合された突然変異型ＩＬ－２（Ｎ８８Ｒ）（Ｈｉ２ｍｃｂ）のアミノ酸配列であり、シグナルペプチドを含む

配列番号８は、ＧＧＧＧＳパターン（リンカー）である

配列番号９は、シグナルペプチド無しのＣ４ＢＰβのＣ末端領域に融合されたヒトＩＬ－２（Ｈｉ２ｃｂ）のアミノ酸配列である

配列番号１０は、シグナルペプチド無しのＣ４ＢＰβのＣ末端領域に融合された突然変異型ＩＬ－２（Ｎ８８Ｒ）（Ｈｉ２ｍｃｂ）のアミノ酸配列である

配列番号１１は、Ｅ０６　ｓｃＦｖ　ＶＬドメインの配列である

配列番号１２は、Ｅ０６　ｓｃＦｖ　ＶＨドメインの配列である

配列番号１３は、Ｅ０６　ｓｃＦｖ（ＨＩＳタグ無し）の配列である

配列番号１４は、リンカーＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳである

配列番号１５は、標的に向けられた融合タンパク質ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６（ペプチドシグナル無し、およびＨＩＳタグ無し）の配列である

配列番号１６は、標的に向けられた融合タンパク質ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６（ペプチドシグナル有り、しかしＨＩＳタグ無し）の配列である

配列番号１７は、標的に向けられた融合タンパク質ＩＬ－２Ｎ８８Ｒ－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６（ペプチドシグナル無し、およびＨＩＳタグ無し）の配列である
配列番号１８は、標的に向けられた融合タンパク質ＩＬ－２Ｎ８８Ｒ－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６（ペプチドシグナル有り、しかしＨＩＳタグ無し）の配列である
配列番号１９は、標的に向けられた融合タンパク質ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６（ペプチドシグナル有り、およびＨＩＳタグ有り）の配列である
配列番号２０は、標的に向けられた融合タンパク質ＩＬ－２Ｎ８８Ｒ－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６（ペプチドシグナル有り、およびＨＩＳタグ有り）の配列である

【００３５】

本発明のキメラコンストラクトは、（ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２部分と、ｉｉ）少なくとも１つのターゲティング部分とを含む。

【００３６】

ＩＬ－２部分

本明細書で使用される場合、インターロイキン－２（ＩＬ－２）は、哺乳動物の野生型インターロイキン－２およびその変異体を包含する。好ましくは、ＩＬ－２はヒトＩＬ－２、またはその変異体である。

【００３７】

ＩＬ－２の活性型変異体は文献に開示されてきた。天然のＩＬ－２の変異体は、その断片、そのアナログおよびその誘導体とすることができる。「断片」により、ポリペプチド配列の一部のみを含むポリペプチドが意図される。「アナログ」とは、１つ以上のアミノ酸置換、挿入または欠失を有する天然ポリペプチド配列を含むポリペプチドを示す。ムテインおよびシュードペプチドはアナログの具体的な例である。「誘導体」には、ＩＬ－２の特性（例えば安定性、特異性等）を改善するために、グリコシル化された、リン酸化された、別のポリペプチドもしくは分子へ融合された、重合化された等、または化学的もしくは酵素的改変もしくは付加を通すなどの、改変された任意の天然ＩＬ－２ポリペプチドまたはその断片もしくはそのアナログが含まれる。活性型変異体のＩＬ－２部分は、全体として、参照ＩＬ－２ポリペプチドの、例を挙げると成熟野生型ヒトＩＬ２のアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、好ましくは少なくとも８０％、８５％、より好ましくは少なくとも９０％、または少なくとも９５％のアミノ酸配列同一性を有する。

【００３８】

本明細書で使用される場合、「野生型ＩＬ－２」とは、天然であるか組換えであるかにかかわらず、天然ヒトＩＬ－２の通常に存在する１３３個のアミノ酸配列を含むＩＬ－２を意味し、これのアミノ酸配列はFujita, et. al., PNAS USA, 80,7437-7441 (1983)に記載されている。配列番号２（１３３個のアミノ酸）は、付加的な２０個のＮ末端アミノ酸から構成されるシグナルペプチドを減じた、ヒトＩＬ－２配列である。配列番号１（１５３個のアミノ酸）は、シグナルペプチドを含むヒトＩＬ－２配列である。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「ＩＬ－２ムテイン」とは、ヒト成熟インターロイキン－２タンパク質に対して特定のアミノ酸置換が為されてあるポリペプチドを意味する。アミノ酸のすべての付番は、別段の指示がない限り、配列番号２のヒト成熟インターロイキン－２タンパク質に対して行われる。

【００４０】

一部の実施形態では、１２５位のシステインを、セリン（Ｃ１２５Ｓ）、アラニン（Ｃ１２５Ａ）、スレオニン（Ｃ１２５Ｔ）またはバリン（Ｃ１２５Ｖ）などの中性アミノ酸で置き換える。

【００４１】

例えば、活性型変異体をＣＨＯ細胞またはＨＥＫ細胞などの哺乳動物細胞で発現させる場合、Ｏ－グリコシル化部位を除去することでより均質な生成物がもたらされる。

【００４２】

ある特定の実施形態では、活性型変異体は、ヒトＩＬ－２の残基３に対応する位置にて

のＩＬ－２のＯ－グリコシル化部位を除去するさらなるアミノ酸突然変異を含む。一実施形態では、ヒトＩＬ－２の残基３に対応する位置にてのＩＬ－２のＯ－グリコシル化部位を除去する前記さらなるアミノ酸突然変異は、アミノ酸置換である。例示的なアミノ酸置換としては、Ｔ３Ａ、Ｔ３Ｇ、Ｔ３Ｑ、Ｔ３Ｅ、Ｔ３Ｎ、Ｔ３Ｄ、Ｔ３Ｒ、Ｔ３Ｋ、およびＴ３Ｐが挙げられる。特定の実施形態では、前記さらなるアミノ酸突然変異はアミノ酸置換Ｔ３Ａである。

・　Ｔ－ｒｅｇ細胞の増殖、生存、活性化および／または機能を選択的に促進する活性型ＩＬ－２変異体は、炎症性障害および／または自己免疫性障害の治療に特に有用である。

【００４３】

「選択的に促進する」というのは、活性型変異体は、Ｔ－ｒｅｇ細胞において活性を促進するが、非制御性Ｔ細胞においては活性を促進する能力を制限していたかそれを欠く、ということである。本明細書ではさらに、Ｔ－ｒｅｇ細胞の増殖、生存、活性化および／または機能を選択的に促進する活性型変異体をスクリーニングするアッセイについて記載する。変異体ＩＬ－２ポリペプチドが活性であるかどうかを判定するための方法は、当技術分野で利用可能である。例えばＷＯ２０１６／０１４４２８を参照されたい。活性型変異体は、Ｔｒｅｇを刺激する能力を示す変異体として定義され、この変異体には、当該変異体はＴｒｅｇを刺激することを超えてＴｅｆｆを刺激しない限りにおいて、野生型ＩＬ－２またはアルデスロイキン（下に定義の）と比較した場合に、Ｔｒｅｇを刺激する能力が改善されているか、能力が同様であるかまたはさらには能力が減少している状態の変異体が含まれる。候補分子がＴ細胞、特にＴｒｅｇ、またはＮＫ細胞を刺激するかどうかを試験する方法はよく知られている。変異体は、エフェクターＴ細胞（ＣＤ８＋Ｔ細胞などの）、ＣＤ４＋Ｆｏｘｐ３＋Ｔｒｅｇ、またはＮＫ細胞を刺激するその能力について試験することができる。好ましい実施形態では、活性型変異体は、野生型ＩＬ２またはアルデスロイキンと比較して、ＮＫ細胞を刺激する能力の減少を示す。ＳＴＡＴ５リン酸化をモニタリングすることとは、Yu et al, Diabetes 2015;64:2172-2183に記載のように、Ｔｅｆｆを超えてＴｒｅｇを優先的に刺激する能力について変異体を評価する簡単な方法である。特定の実施形態では、用量がＴｅｆｆを含めて他の免疫細胞よりもＴｒｅｇに対しては１０分の１以下低いという条件で、ＳＴＡＴ５リン酸化に関する所定レベルが得られる場合に、変異体が特に有用である。

【００４４】

前記活性型変異体は、Ｔｒｅｇ細胞の生存、増殖、活性化および／または機能を優先的に誘導するシグナル伝達事象を誘導する。ある特定の実施形態では、ＩＬ－２変異体は、Ｔｒｅｇ細胞において、ＳＴＡＴ５リン酸化および／またはＩＬ－２Ｒの下流のシグナル伝達分子、例えば、ｐ３８、ＥＲＫ、ＳＹＫおよびＬＣＫのうちの１つ以上のリン酸化を刺激する能力を保持する。他の実施形態では、ＩＬ－２変異体は、Ｔ－ｒｅｇ細胞において、Ｔ－ｒｅｇ細胞の生存、増殖、活性化および／または機能にとって重要である、ＦＯＸＰ３、Ｂｃｌ－２、ＣＤ２５またはＩＬ－１０などの、遺伝子もしくはタンパク質の転写またはタンパク質発現を刺激する能力を保持する。他の実施形態では、ＩＬ－２変異体は、ＣＤ２５＋Ｔ細胞の表面上のＩＬ－２／ＩＬ－２Ｒ複合体のエンドサイトーシスを刺激する能力の減少を呈する。他の実施形態では、ＩＬ－２変異体によって実証されるところは、ＰＩ３－キナーゼシグナル伝達に関する刺激が非効率的であるか減少または欠如していること、例えば、ＡＫＴおよび／またはｍＴＯＲ（ラパマイシンの哺乳類標的）に関するリン酸化が非効率的であるか減少または欠如していること、である。さらに他の実施形態では、ＩＬ－２変異体は、Ｔ－ｒｅｇ細胞において、ＳＴＡＴ５リン酸化および／またはＩＬ－２Ｒの下流のシグナル伝達分子のうちの１つ以上のリン酸化を刺激する野生型ＩＬ－２の能力を保持し、さらに、ＩＬ－２変異体によって実証されるところは、ＦＯＸＰ３－ＣＤ４＋Ｔ細胞もしくはＦＯＸＰ３－ＣＤ８＋Ｔ細胞またはＮＫ細胞において、ＳＴＡＴ５、ＡＫＴ、および／もしくはｍＴＯＲまたはＩＬ－２Ｒの下流の他のシグナル伝達分子に関するリン酸化が非効率的であるか減少または欠如していること、である。他の

実施形態では、ＩＬ－２変異体は、ＦＯＸＰ３－ＣＤ４＋Ｔ細胞もしくはＦＯＸＰ３－ＣＤ８＋Ｔ細胞またはＮＫ細胞の生存、成長、活性化および／または機能を刺激することが非効率的であるかまたはそれらを刺激することができない。

【００４５】

いずれの場合も、こういった変異体は、その生物活性を決定するために広く使用できるＣＴＬＬ－２またはＨＴ－２などの細胞株を刺激する能力を有する。例を挙げると、ＩＬ－２の生物活性は、それらの増殖がＩＬ－２に依存するＨＴ－２細胞株（クローンＡ５Ｅ、ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－１８４１（商標））に対して実施される細胞ベースのアッセイによって決定することができる。多種多様な試験インターロイキン２生成物の存在下での細胞増殖を、ＩＬ－２国際標準［第２次ＷＨＯ　ＩＮＴＥＲＬＥＵＫＩＮ　２国際標品（ヒト、ｒＤＮＡ由来）ＮＩＢＳＣコード：８６／５００］で記録された増殖と比較する。［３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－５－（３－カルボキシメトキシフェニル）－２－（４－スルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム（分子内塩、ＭＴＳ）を添加し、活性の高い生細胞によりホルマザンへと変換した後に、細胞増殖を測定する。次いで、ホルマザン濃度を分光測光法により４９０ｎｍで測定する。

【００４６】

ＩＬ－２変異体の例は、例を挙げると、ＥＰ１０９７４８、ＥＰ１３６４８９、ＵＳ４，７５２，５８５；ＥＰ２００２８０、ＥＰ１１８６１７、ＷＯ９９／６０１２８、ＥＰ２２８８３７２、ＵＳ９，６１６，１０５、ＵＳ９，５８０，４８６、ＷＯ２０１０／０８５４９５、ＷＯ２０１６／１６４９３７に開示されている。

【００４７】

例を挙げると、ある特定の突然変異が、ＩＬ－２受容体（ＩＬ－２Ｒβ／ＣＤ１２２および／またはＩＬ－２Ｒγ／ＣＤ１３２）のシグナル伝達鎖に対する親和性の減少および／またはＩＬ－２受容体の一方もしくは両サブユニットからのシグナル伝達事象を誘導する能力の減少をもたらす場合がある。他の突然変異が、ＣＤ２５（ＩＬ－２Ｒα）に対してより高い親和性を与える場合もある。いずれの場合も、これらの突然変異は、Ｔｒｅｇの生存、増殖、活性化および／または機能を優先的に誘導する活性型変異体を定義する。この特性は、表面プラズモン共鳴を使用してモニタリングすることができる。

【００４８】

有用な変異体の特定の例としては、野生型ＩＬ－２に従って付番された、Ｄ２０、Ｎ３０、Ｙ３１、Ｋ３５、Ｖ６９、Ｑ７４、Ｎ８８、Ｖ９１またはＱ１２６の各位置に少なくとも１つのアミノ酸置換を示すＩＬ－２ムテインが挙げられ、このことは、選択されたアミノ酸は、配列番号２の野生型ＩＬ－２の成熟配列において当該アミノ酸が通常存在する位置を参照して特定されること、を意味する。

【００４９】

好ましいＩＬ－２ムテインは、Ｄ２０Ｈ、Ｄ２０Ｉ、Ｄ２０Ｙ、Ｎ３０Ｓ、Ｙ３１Ｈ、Ｋ３５Ｒ、Ｖ６９ＡＰ、Ｑ７４、Ｎ８８Ｒ、Ｎ８８Ｄ、Ｎ８８Ｇ、Ｎ８８Ｉ、Ｖ９１Ｋ、またはＱ１２６Ｌの各位置に少なくとも１つの置換を含む。

【００５０】

一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテイン分子はＶ９１Ｋ置換を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテイン分子はＮ８８Ｄ置換を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテイン分子はＮ８８Ｒ置換を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテイン分子は、Ｈ１６Ｅ、Ｄ８４Ｋ、Ｖ９１Ｎ、Ｎ８８Ｄ、Ｖ９１Ｋ、またはＶ９１Ｒの置換、それらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、これらのＩＬ－２ムテイン分子はまた、本明細書に記載のように１２５位にも置換を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテイン分子は：Ｔ３Ｎ、Ｔ３Ａ、Ｌ１２Ｇ、Ｌ１２Ｋ、Ｌ１２Ｑ、Ｌ　１２Ｓ、Ｑ１３Ｇ、Ｅ１５Ａ、Ｅ１５Ｇ、Ｅ１５Ｓ、Ｈ１６Ａ、Ｈ１６Ｄ、Ｈ１６Ｇ、Ｈ１６Ｋ、Ｈ１６Ｍ、Ｈ１６Ｎ、Ｈ１６Ｒ、Ｈ１６Ｓ、Ｈ１６Ｔ、Ｈ１６Ｖ、Ｈ１６Ｙ、Ｌ１９Ａ、Ｌ１９Ｄ、Ｌ１９Ｅ、Ｌ１９Ｇ、Ｌ１９Ｎ、Ｌ１９Ｒ、Ｌ１９Ｓ、Ｌ１９Ｔ、Ｌ１９Ｖ、Ｄ２０Ａ、Ｄ２０Ｅ、Ｄ２０Ｈ、Ｄ２０Ｉ、Ｄ２０Ｙ、Ｄ２０Ｆ、Ｄ２０Ｇ、Ｄ２０Ｔ、Ｄ２０Ｗ、Ｍ２３Ｒ、Ｒ８

１Ａ、Ｒ８１Ｇ、Ｒ８１　Ｓ、Ｒ８１Ｔ、Ｄ８４Ａ、Ｄ８４Ｅ、Ｄ８４Ｇ、Ｄ８４Ｉ、Ｄ８４Ｍ、Ｄ８４Ｑ　Ｄ８４Ｒ、Ｄ８４Ｓ、Ｄ８４Ｔ、Ｓ８７Ｒ、Ｎ８８Ａ、Ｎ８８Ｄ、Ｎ８８Ｅ、Ｎ８８Ｉ、Ｎ８８Ｆ、Ｎ８８Ｇ、Ｎ８８Ｍ、Ｎ８８Ｒ、Ｎ８８Ｓ、Ｎ８８Ｖ、Ｎ８８Ｗ、Ｖ９１Ｄ、Ｖ９１Ｅ、Ｖ９１Ｇ、Ｖ９１Ｓ、Ｉ９２Ｋ、Ｉ９２Ｒ、Ｅ９５Ｇ、およびＱ１２６からなる群から選択される、１つ以上の置換を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテイン分子のアミノ酸配列は、成熟ＩＬ－２配列に記載のアミノ酸配列とは異なり、Ｃ１２５Ａ置換またはＣ１２５Ｓ置換を有しならびにＴ３Ｎ、Ｔ３Ａ、Ｌ１２Ｇ、Ｌ１２Ｋ、Ｌ１２Ｑ　Ｌ１２Ｓ、Ｑ１３Ｇ、Ｅ１５Ａ、Ｅ１５Ｇ、Ｅ１５Ｓ、Ｈ１６Ａ、Ｈ１６Ｄ、Ｈ１６Ｇ、Ｈ１６Ｋ、Ｈ１６Ｍ、Ｈ１６Ｎ、Ｈ１６Ｒ、Ｈ１６Ｓ、Ｈ１６Ｔ、Ｈ１６Ｖ、Ｈ１６Ｙ、Ｌ１９Ａ、Ｌ１９Ｄ、Ｌ１９Ｅ、Ｌ１９Ｇ、Ｌ１９Ｎ、Ｌ１９Ｒ、Ｌ１９Ｓ、Ｌ１９Ｔ、Ｌ１９Ｖ、Ｄ２０Ａ、Ｄ２０Ｅ、Ｄ２０Ｆ、Ｄ２０Ｇ、Ｄ２０Ｔ、Ｄ２０Ｗ、Ｍ２３Ｒ、Ｒ８１Ａ、Ｒ８１Ｇ、Ｒ８１　Ｓ、Ｒ８１Ｔ、Ｄ８４Ａ、Ｄ８４Ｅ、Ｄ８４Ｇ、Ｄ８４Ｉ、Ｄ８４Ｍ、Ｄ８４Ｑ、Ｄ８４Ｒ、Ｄ８４Ｓ、Ｄ８４Ｔ、Ｓ８７Ｒ、Ｎ８８Ａ、Ｎ８８Ｄ、Ｎ８８Ｅ、Ｎ８８Ｆ、Ｎ８８Ｉ、Ｎ８８Ｇ、Ｎ８８Ｍ、Ｎ８８Ｒ、Ｎ８８Ｓ、Ｎ８８Ｖ、Ｎ８８Ｗ、Ｖ９１Ｄ、Ｖ９１Ｅ、Ｖ９１Ｇ、Ｖ９１　Ｓ、Ｉ９２Ｋ、Ｉ９２Ｒ、Ｅ９５Ｇ、Ｑ１２６Ｉ、Ｑ１２６Ｌ、およびＱ１２６Ｆから選択される１つの置換を有する。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテイン分子は、成熟ＩＬ－２配列に記載のアミノ酸配列とは異なり、Ｃ１２５Ａ置換またはＣ１２５Ｓ置換を有しならびにＤ２０Ｈ、Ｄ２０Ｉ、Ｄ２０Ｙ、Ｄ２０Ｅ、Ｄ２０Ｇ、Ｄ２０Ｗ、Ｄ８４Ａ、Ｄ８４Ｓ、Ｈ１６Ｄ、Ｈ１６Ｇ、Ｈ１６Ｋ、Ｈ１６Ｒ、Ｈ１６Ｔ、Ｈ１６Ｖ、Ｉ９２Ｋ、Ｉ９２Ｒ、Ｌ１２Ｋ、Ｌ１９Ｄ、Ｌ１９Ｎ、Ｌ１９Ｔ、Ｎ８８Ｄ、Ｎ８８Ｒ、Ｎ８８Ｓ、Ｖ９１Ｄ、Ｖ９１Ｇ、Ｖ９１Ｋ、およびＶ９１Ｓから選択される１つの置換を有する。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテインはＮ８８Ｒおよび／またはＤ２０Ｈの突然変異を含む。

【００５１】

これらの置換は、単独で使用しても、お互いに組み合わせて使用してもよい。一部の実施形態では、ムテインはこれらの置換のそれぞれを含む。一部の実施形態では、ムテインは、これらの突然変異のうちの１、２、３、４、５、６、７、または８つを含む。

【００５２】

一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、Ｎ８８Ｒ突然変異またはＮ８８Ｄ突然変異、好ましくはＮ８８Ｒを含む。一部の実施形態では、ＩＬ－２ムテインはＣ１２５Ａ突然変異またはＣ１２５Ｓ突然変異を含む。これらの置換は、単独で使用しても、お互いに組み合わせて使用してもよい。一部の実施形態では、ムテインは、これらの突然変異のうちの１、２、３、４、５、６、７、または８つを含む。一部の実施形態では、ムテインはこれらの置換のそれぞれを含む。

【００５３】

特定の実施形態では、ＩＬ－２部分はアルデスロイキンである。アルデスロイキンはＰｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標）の有効成分である。アルデスロイキンは、成熟ヒトＩＬ－２（配列番号２）の配列と比較して２つのアミノ酸改変：第１のアミノ酸（アラニン）の欠失およびセリンによる１２５位にてのシステインの置換を含む、成熟ヒトＩＬ－２の変異体である。ＩＬ－２の他の位置にての保存的改変および置換（すなわち、ムテインの二次または三次構造に最小限の影響を与えるもの）が包含される。このような保存的置換には、Dayhoff in The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978)により、およびArgos in EMBO J., 8: 779-785 (1989)により記載されるものが含まれる。例えば、以下のグループの一つに属するアミノ酸は保存的変化を表す：－ａｌａ、ｐｒｏ、ｇｌｙ、ｇｌｎ、ａｓｎ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；－ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｙｒ、ｔｈｒ；－ｖａｌ、ｉｌｅ、ｌｅｕ、ｍｅｔ、ａｌａ、ｐｈｅ；－ｌｙｓ、ａｒｇ、ｈｉｓ；－ｐｈｅ、ｔｙｒ、ｔｒｐ、ｈｉｓ；および－ａｓｐ、ｇｌｕ。

【００５４】

ＩＬ－２Ｒのαサブユニットへの結合を破壊する突然変異を有する変異体は、こういった突然変異型はＴｒｅｇを刺激する能力が減少している場合があるので、好ましくない。

・　Ｔｅｆｆ細胞の増殖、生存、活性化および／または機能を促進する活性型ＩＬ－２変異体は、がんを治療する上で有用とすることができる。

【００５５】

ＩＬ－２のこのような活性型変異体は、それぞれ野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２受容体（ＣＤ２５）のα－サブユニットへの突然変異型ＩＬ－２ポリペプチドの親和性を消失させるかまたは減少させ、かつ、中親和性ＩＬ－２受容体への突然変異型ＩＬ－２ポリペプチドの親和性を保つ、少なくとも１つのアミノ酸突然変異を含む。この特性は、表面プラズモン共鳴を使用してモニタリングすることができる。

【００５６】

好ましい活性型変異体には、Ｆ４２Ａ、Ｋ４３Ｎ、Ｙ４５Ａ、および／またはＥ６２Ａの各置換を含むＩＬ－２ムテインが含まれる。

【００５７】

ＣＤ２５への親和性が低下したヒトＩＬ－２（ｈＩＬ－２）の突然変異型などの活性型変異体は、例えば、アミノ酸３５、３８、４２、４３、４５、６２もしくは７２の各位置にてのアミノ酸置換またはそれらの組合せ（ヒトＩＬ－２配列番号２に対しての付番）によって生成することができる。例示的なアミノ酸置換としては、Ｋ３５Ｅ、Ｋ３５Ａ、Ｒ３８Ａ、Ｒ３８Ｅ、Ｒ３８Ｎ、Ｒ３８Ｆ、Ｒ３８Ｓ、Ｒ３８Ｌ、Ｒ３８Ｇ、Ｒ３８Ｙ、Ｒ３８Ｗ、Ｆ４２Ｌ、Ｆ４２Ａ、Ｆ４２Ｇ、Ｆ４２Ｓ、Ｆ４２Ｔ、Ｆ４２Ｑ、Ｆ４２Ｅ、Ｆ４２Ｎ、Ｆ４２Ｄ、Ｆ４２Ｒ、Ｆ４２Ｋ、Ｋ４３Ｅ、Ｙ４５Ａ、Ｙ４５Ｇ、Ｙ４５Ｓ、Ｙ４５Ｔ、Ｙ４５Ｑ、Ｙ４５Ｅ、Ｙ４５Ｎ、Ｙ４５Ｄ、Ｙ４５Ｒ、Ｙ４５Ｋ、Ｅ６２Ｇ、Ｅ６２Ａ、Ｅ６２Ｓ、Ｅ６２Ｔ、Ｅ６２Ｑ、Ｅ６２Ｅ、Ｅ６２Ｎ、Ｅ６２Ｄ、Ｅ６２Ｒ、Ｅ６２Ｋ、Ｌ７２Ｇ、Ｌ７２Ａ、Ｌ７２Ｓ、Ｌ７２Ｔ、Ｌ７２Ｑ、Ｌ７２Ｅ、Ｌ７２Ｎ、Ｌ７２Ｄ、Ｌ７２Ｒ、およびＬ７２Ｋが挙げられる。本発明のキメラコンストラクトにおいて有用な特定の活性型変異体は、ヒトＩＬ－２の残基４２、４５もしくは７２に対応するアミノ酸位置にまたはそれらの組合せにアミノ酸突然変異を含む。一実施形態では、前記アミノ酸突然変異は、Ｆ４２Ａ、Ｆ４２Ｇ、Ｆ４２Ｓ、Ｆ４２Ｔ、Ｆ４２Ｑ、Ｆ４２Ｅ、Ｆ４２Ｎ、Ｆ４２Ｄ、Ｆ４２Ｒ、Ｆ４２Ｋ、Ｙ４５Ａ、Ｙ４５Ｇ、Ｙ４５Ｓ、Ｙ４５Ｔ、Ｙ４５Ｑ、Ｙ４５Ｅ、Ｙ４５Ｎ、Ｙ４５Ｄ、Ｙ４５Ｒ、Ｙ４５Ｋ、Ｌ７２Ｇ、Ｌ７２Ａ、Ｌ７２Ｓ、Ｌ７２Ｔ、Ｌ７２Ｑ、Ｌ７２Ｅ、Ｌ７２ＮおよびＬ７２Ｋの群から選択されるアミノ酸置換、より具体的には、Ｆ４２Ａ、Ｙ４５ＡおよびＬ７２Ｇの群から選択されるアミノ酸置換である。これらの活性型変異体は、ＩＬ－２突然変異型の野生型と比較して、中親和性ＩＬ－２受容体に対して実質的に同様の結合親和性を呈し、かつ、ＩＬ－２受容体のαサブユニットおよび高親和性ＩＬ－２受容体（ＩＬ２Ｒαβγ）に対して実質的に減少した親和性を有する。

【００５８】

有用な活性型変異体の他の特徴としては以下が挙げられる：ＩＬ－２受容体担持のＴ細胞および／またはＮＫ細胞の増殖を誘導する能力、ＩＬ－２受容体担持のＴ細胞および／またはＮＫ細胞においてＩＬ－２シグナル伝達を誘導する能力、ＮＫ細胞による二次サイトカインとしてのインターフェロン（ＩＦＮ）－ｙを産生する能力、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）による二次サイトカイン、特にＩＬ－１０およびＴＮＦ－ａの合成を誘導する能力の減少、制御性Ｔ細胞を活性化する能力の減少、Ｔ細胞においてアポトーシスを誘導する能力の減少、およびインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）での毒性プロファイルの減少。

【００５９】

特定の活性型変異体は、ＩＬ－２受容体のα－サブユニットへの活性型変異体の親和性を消失させるかまたは減少させるが、中親和性ＩＬ－２受容体への活性型変異体の親和性を保つ３つのアミノ酸突然変異、を含む。一実施形態では、前記３つのアミノ酸突然変異は、ヒトＩＬ－２の残基４２、４５および７２に対応する位置にある。一実施形態では、前記３つのアミノ酸突然変異はアミノ酸置換である。一実施形態では、前記３つのアミノ酸突然変異は、Ｆ４２Ａ、Ｆ４２Ｇ、Ｆ４２Ｓ、Ｆ４２Ｔ、Ｆ４２Ｑ、Ｆ４２Ｅ、Ｆ４２Ｎ、Ｆ４２Ｄ、Ｆ４２Ｒ、Ｆ４２Ｋ、Ｙ４５Ａ、Ｙ４５Ｇ、Ｙ４５Ｓ、Ｙ４５Ｔ、Ｙ４５

Ｑ、Ｙ４５Ｅ、Ｙ４５Ｎ、Ｙ４５Ｄ、Ｙ４５Ｒ、Ｙ４５Ｋ、Ｌ７２Ｇ、Ｌ７２Ａ、Ｌ７２Ｓ、Ｌ７２Ｔ、Ｌ７２Ｑ、Ｌ７２Ｅ、Ｌ７２Ｎ、Ｌ７２Ｄ、Ｌ７２ＲおよびＬ７２Ｋの群から選択されるアミノ酸置換である。特定の実施形態では、前記３つのアミノ酸突然変異は、アミノ酸置換Ｆ４２Ａ、Ｙ４５ＡおよびＬ７２Ｇである（配列番号２のヒトＩＬ－２配列に対しての付番）。

【００６０】

特定の実施形態では、前記アミノ酸突然変異は、ＩＬ－２受容体のαサブユニットへの突然変異型ＩＬ－２ポリペプチドの親和性を少なくとも１／５、具体的には少なくとも１／１０、より具体的には少なくとも１／２５減少させる。ＩＬ－２受容体のαサブユニットへの活性型変異体の親和性を減少させる２つ以上のアミノ酸突然変異が存在する実施形態では、これらのアミノ酸突然変異の組合せにより、ＩＬ－２受容体のαサブユニットへの活性型変異体の親和性を、少なくとも１／３０、少なくとも１／５０、またはさらに少なくとも１／１００減少させることができる。一実施形態では、前記アミノ酸突然変異またはアミノ酸突然変異の組合せは、ＩＬ－２受容体のαサブユニットへの活性型変異体の親和性を消失させ、その結果、表面プラズモン共鳴によって結合が検出不可である。

【００６１】

中親和性受容体への実質的に同様の結合、すなわち前記受容体への突然変異型ＩＬ－２ポリペプチドの親和性の維持は、活性型変異体が、中親和性ＩＬ－２受容体に対するＩＬ－２突然変異型の野生型が有する親和性の約７０パーセント超を呈する場合に、得られる。本発明において有用な活性型変異体は、そのような親和性の約８０パーセント超、さらには約９０パーセント超を呈することができる。

【００６２】

ＩＬ－２のＯ－グリコシル化の脱離と組み合わせたＩＬ－２受容体のα－サブユニットに対するＩＬ－２の親和性の減少により、改善した特性を備えるＩＬ－２タンパク質がもたらされる。特定の実施形態では、活性型変異体は、以下からなる群から選択される１つ以上の細胞性応答を誘発することができる：活性化Ｔリンパ球細胞における増殖、活性化Ｔリンパ球細胞における分化、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）活性、活性化Ｂ細胞における増殖、活性化Ｂ細胞における分化、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞における増殖、ＮＫ細胞における細胞傷害性活性、ＮＫ細胞における分化、活性化Ｔ細胞またはＮＫ細胞によるサイトカイン分泌、およびＮＫ／リンパ球活性化キラー（ＬＡＫ）抗腫瘍細胞傷害性。

【００６３】

一部の実施形態では、これらの活性型変異体は、本明細書に記載されるように１２５位に置換を同様に含む。

【００６４】

ターゲティング部分

キメラコンストラクトは、ＩＬ－２を標的である炎症性組織に向かわせることができるターゲティング部分をさらに含む。

【００６５】

特に、ターゲティング部分は酸化タンパク質または酸化脂質に結合する。本発明の文脈において、酸化タンパク質または酸化脂質は炎症性組織で見出される。特定の実施形態では、ターゲティング部分は、炎症の一因となるかまたは炎症応答に関与する、酸化タンパク質または酸化脂質に結合する。特定の実施形態では、ターゲティング部分は、酸化損傷および炎症によって誘導されるおよび／またはそれらの一因となる、酸化タンパク質または酸化脂質に結合する。

【００６６】

特定の実施形態では、ターゲティング部分は、炎症誘発性の酸化タンパク質または酸化脂質に結合する。「炎症誘発性」というのは、炎症の積極的なメディエーターである酸化タンパク質または酸化脂質のことである。例えば、炎症誘発性のタンパク質または脂質は、炎症性サイトカインの分泌および／または単球もしくはマクロファージなどのエフェクター細胞の動員を誘導することができる。炎症性サイトカインとは、ヘルパーＴ細胞（Ｔ

ｈ）およびマクロファージのような免疫細胞、ならびに炎症を促進するある特定の他の細胞タイプから分泌されるシグナル伝達分子の一タイプである。これらには、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦ－α）、インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）、または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）が含まれる。

【００６７】

特定の実施形態では、酸化タンパク質または酸化脂質は無菌性炎症に関与するかまたはこれのトリガーを引く。「無菌性炎症」とは、いっさい微生物が存在しない状態で発生する炎症であり、組織損傷に応答して局所的に放出されるダメージ関連分子パターン（ＤＡＭＰ）に応答して誘発される。ＤＡＭＰは細胞内および細胞外の宿主由来分子であり、これらの分子は、免疫系によって普通には感知されないが、組織損傷時に放出されるかまたは変性自己分子へと改変されることになる。病原体誘導性炎症に類似して、無菌性炎症は、パターン認識受容体（ＰＲＲ）によるＤＡＭＰの認識をとおした自然免疫応答の活性化によってトリガーを引かれ、その結果、サイトカインとケモカインの分泌亢進がもたらされる。トール様受容体（ＴＬＲ）などの膜結合型ＰＲＲ、およびインフラマソームなどの細胞内ＰＲＲは、無菌性炎症のキーとなるメディエーターである。インターロイキン－１（ＩＬ－１）ファミリーに属するサイトカインは、無菌性炎症の重要なドライバーであると提唱されてきた。初期損傷の部位にてのサイトカインおよびケモカインの分泌増加は、好中球およびマクロファージなどの免疫細胞の動員亢進を最終的にもたらす。無菌性炎症の消散によって、組織の修復および恒常性の再確立がもたらされるはずである。未消散の無菌性炎症は、自己免疫性疾患、痛風、アルツハイマー病およびアテローム性動脈硬化症など、いくつかの病状の発生に関係づけられる。

【００６８】

特定の実施形態では、ターゲティング部分は「酸化特異的エピトープ」（ＯＳＥ）に結合する。前記酸化特異的エピトープ（ＯＳＥ）は、上で定義のように、酸化タンパク質または酸化脂質上に存在する。

【００６９】

細胞は反応性酸素種（ＲＯＳ）を生成するが、これの生物学的影響は生成量に左右される。低濃度では、ＲＯＳは、増殖、分化および細胞代謝に関与するが、一方、高濃度では、微生物除去を促進する好中球細胞外トラップ（ＮＥＴ）の形成に関与する。炎症などのある特定の外因性および内因性刺激に応答して、このバランスが崩壊する可能性があり、このバランスによって、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質および脂質の不可逆的な変化を引き起こす酸化ストレスに関与するＲＯＳの蓄積がもたらされる可能性がある。酸化ストレスの主たる帰結は脂質過酸化であり、これによりいくつかの高度に反応性である分解生成物が生成され、この分解生成物が脂質、アポタンパク質およびタンパク質と反応し、それによって、安定した共有結合付加体が形成されかつ「酸化特異的エピトープ」（ＯＳＥ）が創り出される。ＯＳＥは、単離された脂質として認めることができる場合もあり、またはタンパク質と共有結合で会合している場合もある。ＯＳＥの例としては、酸化リン脂質（ＯｘＰＬ）が挙げられる。レビューおよび例については、例えば、Binder et al, (2016) Nat Rev Immunol,16(8):485-97を参照されたい。ＯＳＥは、酸化ホスファチジルコリン、酸化カルジオリピン（ＯｘＣＬ）、酸化ホスファチジルセリン（ＯｘＰＳ）および酸化ホスファチジルエタノールアミン（ＯｘＰＥ）などの切断型リン脂質によるタンパク質の改変によって生成される場合がある。ＯＳＥの他の例としては、マロンジアルデヒド（ＭＤＡ）エピトープ、２－（ω－カルボキシエチル）ピロール（ＣＥＰ）エピトープおよび４－ヒドロキシノネナール（４－ＨＮＥ）エピトープが挙げられる。

【００７０】

ＯＳＥは、酸化リポタンパク質内でおよび瀕死の細胞の表面上でおよび循環微粒子上で記録され、強固な炎症誘発性応答のトリガーを引くその能力が実証されてきた［Tsiantoulas et al. (2015). Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies1. J. Lipid Res. 5

6, 440-448]。特に、ＰＡＭＰ（「病原体関連分子パターン」）とされるＯＳＥのＰＲＲ（「パターン認識受容体」）による認識は、炎症誘発性サイトカインの発現および、単球およびマクロファージなどの細胞エフェクターの活性化を誘導することになる［Miller et al. (2011). Oxidation-Specific Epitopes are Danger Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. Circ. Res. 108, 235-248.］。

【００７１】

炎症状態ではＯＳＥ改変タンパク質または脂質が蓄積するので、これらを、ＩＬ－２部分を標的である炎症性組織に向かわせるための、標的として使用することができる。

【００７２】

特定の実施形態では、ターゲティング部分はＯＳＥに結合するが、この場合、ＯＳＥは以下のものである：マロンジアルデヒド（ＭＤＡ）エピトープ；２－（ω－カルボキシエチル）ピロール（ＣＥＰ）エピトープ；４－ヒドロキシノネナール（４－ＨＮＥ）エピトープ、酸化リン脂質（ＯｘＰＬ）、ホスホコリン含有酸化リン脂質（ＰＣ－ＯｘＰＬ）、酸化ホスファチジルエタノールアミン（ＯｘＰＥ）、酸化ホスファチジルセリン（ＯｘＰＳ）または酸化カルジオリピン（ＯｘＣＬ）。

【００７３】

好ましい実施形態では、ターゲティング部分は酸化リン脂質（ＯｘＰＬ）に結合する。

【００７４】

好ましくは、ターゲティング部分は、ホスホコリン含有酸化リン脂質（ＰＣ－ＯｘＰＬ）に結合する。ホスホコリン頭部基を含む酸化リン脂質は、高度に炎症誘発性およびアテローム生成促進性であることが示されていたが、酸化損傷および炎症によって誘導されるとともにそれらを伝播する。上記酸化リン脂質は、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病性腎症、多発性硬化症を始めとするＣＮＳ疾患、ならびに一連の急性および慢性肺疾患を含めて、広範囲の炎症性疾患において存在する。

【００７５】

特定の実施形態では、ターゲティング部分は、抗体または抗体断片、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖまたはｓｃＦｖの各断片である。

【００７６】

好ましい実施形態では、ターゲティング部分はｓｃＦｖ断片である。実際、ｓｃＦｖ断片はＦｃドメインを欠如しており、したがって沈黙したエフェクター機能を有する。

【００７７】

特定の実施形態では、ターゲティング部分は：Ｅ０６抗体またはＥ０６　ｓｃＦｖなどのＥ０６抗体断片；ＬＲ０４抗体またはＬＲ０４　ｓｃＦｖなどのＬＲ０４抗体断片；ＮＡ１７抗体またはＮＡ１７　ｓｃＦｖなどのＮＡ１７抗体断片；Ｅ０１４抗体またはＥ０１４　ｓｃＦｖなどのＥ０１４抗体断片；ＭＤＡ２抗体またはＭＤＡ２　ｓｃＦｖなどのＭＤＡ２抗体断片；ＩＫ１７抗体またはＩＫ１７　ｓｃＦｖなどのＩＫ１７抗体断片；ＬＲ０１抗体またはＬＲ０１　ｓｃＦｖなどのＬＲ０１抗体断片、からなる群から選択される。

【００７８】

好ましい実施形態では、ターゲティング部分は、Ｅ０６抗体もしくはＥ０６抗体断片、例えばＥ０６抗体のＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖもしくはｓｃＦｖの各断片、またはそれらの機能性変異体である。Ｅ０６は、アポリポタンパク質Ｅ欠損マウス（ａｐｏＥ－／－）からクローニングされた天然ＩｇＭ自己抗体であり、これは、酸化リン脂質のホスホコリン（ＰＣ）頭部基に結合するが正常リン脂質のホスホコリン（ＰＣ）頭部基に結合しない［Friedman et al. (2001) Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids: Importance of Schiff base formation and Aldol condensation. J Biol Chem.;277:7010-7020］。興味深いことに、Ｅ０６は、古典的な「天然」のマウスＴ１５抗ＰＣ抗体と構造的かつ機能的に同一であり、この抗体はＢ１細胞起源のものである

とともに病原性肺炎球菌感染からの最適な保護をもたらすと報告されている。

【００７９】

特定の実施形態では、ターゲティング部分はＥ０６　ｓｃＦｖまたはその機能性変異体である。

【００８０】

「機能性変異体」または「誘導体」という用語は、抗体またはその断片の機能に実質的に影響を与えることなく、１個または数個のアミノ酸の欠失、置換または挿入によってそれが指す親配列とは異なる配列を表す。好ましくは、機能性変異体は、天然配列と７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または少なくとも９９％の同一性を示す。抗体またはその断片の機能性変異体は、参照抗体と比べて同様の抗原結合親和性を保有する（例えば、１×１０－７Ｍ、１０－８Ｍ未満の、好ましくは１×１０－９Ｍ未満もしくは１×１０－１０Ｍ未満のＫＤを有する）。結合の親和性は、ｋａ（会合速度定数）、ｋｄ（解離速度定数）、またはＫＤ（平衡解離）という用語によって定義される。通常には、抗体に対して使用される場合、特異的に結合することとは、１０－７Ｍ未満、好ましくは１０－８Ｍ未満、例えば１０－９Ｍ未満もしくは１０－１０Ｍ未満の親和性（ＫＤ）値でその標的に特異的に結合する（「認識する」）抗体を指す。より低いＫＤ値は、より高い結合親和性（すなわち、より強い結合）を表し、その結果、１０－９のＫＤ値は、１０－８のＫＤ値よりも高い結合親和性を示す。

【００８１】

特定の実施形態では、Ｅ０６　ｓｃＦｖは：

－　配列番号１２に示されるアミノ酸配列、または配列番号１２と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなる可変重鎖（ＶＨ）ドメイン；および

－　配列番号１１に示されるアミノ酸配列、または配列番号１１と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなる可変軽鎖（ＶＬ）ドメインを含む。

【００８２】

特定の実施形態では、Ｅ０６　ｓｃＦｖのＶＨドメインとＶＬドメインは、アミノ酸リンカーを介して融合されている。「リンカー」という用語は、５～８０個のアミノ酸、好ましくは５～３０個、さらに好ましくは１０～２０個のアミノ酸を含む（ポリ）ペプチドを指す。適切なリンカーは当技術分野で知られている。一部の実施形態では、リンカーはＧＧＧＧＳ（配列番号８）反復配列を含む。小型非極性（例えばＧｌｙ）アミノ酸または極性（例えばＳｅｒまたはＴｈｒ）アミノ酸から構成されるリンカーは柔軟性をもたらし、接続する機能ドメインの易動性を可能にする。好ましい実施形態では、リンカーは、配列番号１４のリンカーであるか、または配列番号１４と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有するリンカーである。

【００８３】

特定の実施形態では、Ｅ０６　ｓｃＦｖ断片は、配列番号１３に示されるアミノ酸配列または配列番号１３と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなる。

【００８４】

別の特定の実施形態では、ターゲティング部分は、ＬＲ０４抗体もしくはＬＲ０４抗体断片、例えばＬＲ０４抗体のＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖもしくはｓｃＦｖの各断片、またはそれらの機能性変異体である。ＬＲ０４とは、アテローム性食習慣を受けているマウスＬｄｌｒ－／－脾臓からクローニングされたＭＤＡエピトープに対するモノクローナルＩｇＭ抗体である（Amir et al. Peptide mimotopes of malondialdeh

yde epitopes for clinical applications in cardiovascular disease. J Lipid Res. 2012;53:1316-1326）。

【００８５】

別の特定の実施形態では、ターゲティング部分は、ＮＡ１７抗体もしくはＮＡ１７抗体断片、例えばＮＡ１７抗体のＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖもしくはｓｃＦｖの各断片、またはそれらの機能性変異体である。ＮＡ１７とは、Ｂ１細胞再構成Ｒａｇ１－／－マウスの脾臓からクローニングされたＭＤＡ－特異的天然ｍＡｂである［Chou et al. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. J Clin Invest. 2009;119(5):1335-1349］。

【００８６】

別の特定の実施形態では、ターゲティング部分は、Ｅ０１４抗体もしくはＥ０１４抗体断片、例えばＥ０１４抗体のＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖもしくはｓｃＦｖの各断片、またはそれらの機能性変異体である。Ｅ０１４とは、アテローム性動脈硬化症Ａｐｏｅ－／－マウスの脾臓からクローニングされたモノクローナルＩｇＭ　ＮＡｂであり、これはＭＤＡエピトープに結合することが示されてきた［Palinski et al. (1996). Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. J. Clin. Invest. 98, 800-814］。

【００８７】

別の特定の実施形態では、ターゲティング部分は、ＭＤＡ２抗体もしくはＭＤＡ２抗体断片、例えばＭＤＡ２抗体のＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖもしくはｓｃＦｖの各断片、またはそれらの機能性変異体である。ＭＤＡ２とは、ＭＤＡ－リジンエピトープに特異的なマウスモノクローナルＩｇＧ型抗体である。ＭＤＡ２は、ＭＤＡ－ＬＤＬおよびその他のＭＤＡ改変タンパク質を特異的に結合する［Rosenfeld et al (1990). Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. Arteriosclerosis.;10:336-349］。

【００８８】

別の特定の実施形態では、ターゲティング部分は、ＩＫ１７抗体もしくはＩＫ１７抗体断片、例えばＩＫ１７抗体のＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖもしくはｓｃＦｖの各断片、またはそれらの機能性変異体である。ＩＫ１７とは、ＭＤＡ－ＬＤＬおよび銅ＯｘＬＤＬに結合するヒトモノクローナルＩｇＧ抗体断片である［Shaw et al. (2001) Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol.;21:1333-1339］。ＩＫ１７とは、ＭＤＡ－ＬＤＬに対する血漿自己抗体力価が高い冠動脈疾患の患者由来のファージディスプレイライブラリーから単離されたものである。ＩＫ１７は、ヒト自己抗体であるので、薬物動態の改善および免疫反応の減少を含めて、ネズミ抗体に勝って潜在的な利点を有する。

【００８９】

別の特定の実施形態では、ターゲティング部分は、ＬＲ０１抗体もしくはＬＲ０１抗体断片、例えばＬＲ０１抗体のＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｖもしくはｓｃＦｖの各断片、またはそれらの機能性変異体である。ＬＲ０１とは、アテローム性動脈硬化症Ｌｄｌｒ－／－マウスの脾臓から単離された生殖細胞系列にコードされたＮＡｂである。ＬＲ０１は、酸化されているカルジオリピンに対して向けられているが、天然のカルジオリピンに対して向けられてはいないことが見出された［Tuominen et al. (2006). A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 2096-210］。

【００９０】

二量体化特性を有する適宜の部分

ＩＬ－２部分とターゲティング部分とを含む本発明のキメラコンストラクトは、多量体化特性を有する部分、すなわち多量体タンパク質を形成することができる断片または部分を適宜含むことができる。

【００９１】

好ましくは、ＩＬ－２部分とターゲティング部分とを含む本発明のキメラコンストラクトは、二量体化特性を有する部分、すなわち二量体タンパク質を形成できる断片または部分を適宜含むことができる。

【００９２】

例えば、キメラコンストラクトは、ＩｇＧのＦｃ断片またはそれの機能性変異体をさらに含むことができるが、これは、少なくとも１つの二量体、例えばホモ二量体もしくはヘテロ二量体、三量体、四量体もしくは異なる数のキメラコンストラクトを含有する任意の多量体を形成する能力を有する。

【００９３】

特定の実施形態では、ＩＬ－２部分とターゲティング部分とを含む本発明のキメラコンストラクトは、二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）、または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体を適宜含むことができる。

【００９４】

ＣＣ４ＢＰβまたはＣ４ＢＰβ断片

Ｃ４ＢＰタンパク質は、凝固および補体系に関与する。Ｃ４ＢＰの主たる形態は、同一の７つの７５ｋＤアルファ鎖と１つの４５ｋＤベータ鎖から構成される。アルファ鎖およびベータ鎖はそれぞれ８つおよび３つのＳＣＲ（ショートコンセンサス反復配列）ドメインを含有し、これらのモチーフは多くの補体制御タンパク質に見出され、ベータシートに組織化された５０～７０個のアミノ酸によって構成される。ヒトＣ４ＢＰのベータ鎖のアミノ酸配列を配列番号３として示す。

【００９５】

このポリペプチド配列に対応する核酸配列はまた、Hillarp and Dahlback (1990, PNAS, vol 87, pp 1183-1187)によっても記載されている。Ｃ４ＢＰタンパク質を重合する際のアルファ鎖の役割については、Kask et al (Biochemistry 2002, 41, 9349-9357)によって研究されている。これら著者らが示したところは、アルファ鎖が異種系で発現される場合、アルファ鎖のＣ末端部分が、特にそのらせん構造および２個のシステインの存在が、Ｃ４ＢＰタンパク質の重合にとって必要であること、である。

【００９６】

欧州特許出願第２２２７０３０号には、目的のポリペプチドとの融合の際にＣ４ＢＰタンパク質のアルファ鎖およびベータ鎖のＣ末端断片を使用することによるヘテロ多量体組換えタンパク質の生成が記載されている。米国特許第７，８８４，１９０号には、二量体タンパク質の生成に向けてＣ４ＢＰタンパク質のアルファ鎖と共同でＣ４ＢＰタンパク質のベータ鎖を使用することに依存せずに、Ｃ４ＢＰタンパク質のベータ鎖を使用することが記載されている。

【００９７】

本発明を実施するのに使用されるＣ４ＢＰタンパク質は、有利にはヒトＣ４ＢＰタンパク質である。好ましい実施形態では、キメラコンストラクトは、少なくともアミノ酸１９４～２５２（配列番号４）を含むかまたはそれからなるＣ４ＢＰβ鎖の断片を含む。

【００９８】

ベータ鎖のより長い断片、またはベータ鎖全体をコードする配列も使用することができる。ある特定の適用では、凝固に関与するＳタンパク質を結合することができるベータ鎖をコードする配列を使用することを避けることが好ましい。選択された配列がベータ鎖の最初の２つのＳＣＲモチーフを含有する断片をコードする場合、これらは、Ｓタンパク質との相互作用の可能性を切り出すようにアミノ酸の付加、欠失または置換によって突然変

異されたバージョンであることが好ましいであろう。ＳＣＲモチーフおよび／または［ＧＳ］ドメインを、得られる融合ポリペプチドの柔軟性を改変する、例えば向上させる目的で、またはキメラタンパク質が多量体、特に二量体を形成するのに適した立体構造を取ることを可能とする目的で、付加することができる。

【００９９】

Ｎ末端で最大アミノ酸１３５まで及ぶＣ４ＢＰβのより長い断片を使用することができる。

【０１００】

特定の実施形態では、Ｃ４ＢＰβ鎖の断片は、少なくともアミノ酸１８５～２５２、１８０～２５２、１７５～２５２、１７０～２５２、１６５～２５２、１６０～２５２、１５５～２５２、１５０～２５２、１４５～２５２、１４０～２５２、または１３５～２５２（配列番号３に対して）を含むかまたはそれらからなることができる。

【０１０１】

特定の実施形態では、Ｃ４ＢＰβ鎖の断片は、少なくともアミノ酸１３７～２５２（配列番号５）を含むかまたはそれらからなる。

【０１０２】

Ｃ４ＢＰβの機能性変異体を使用することができる。上記機能性変異体は、少なくとも１つの二量体、例えばホモ二量体もしくはヘテロ二量体、三量体、四量体もしくは異なる数のキメラコンストラクトを含有する任意の多量体を形成する能力が維持されてある。

【０１０３】

本発明の文脈内では、「Ｃ４ＢＰβ鎖の断片の機能性変異体」という用語は、１つ以上のアミノ酸の欠失、置換または付加によってベータ鎖の断片の配列に対して改変されたポリペプチド配列を意味するが、前記改変された配列は本発明の方法を使用して少なくとも二量体タンパク質を形成する能力を保持する。より正確には、断片の機能性変異体をコードする配列を使用した二量体タンパク質の生成は、同一の発現系において、断片（配列番号３またはその断片）をコードする天然配列を用いて得られるものと少なくとも８０％、好ましくは少なくとも９０％、さらに好ましくは９５％均等とすることができる。好ましくは、変異体は、これが含有する融合ポリペプチドの８０％超が、本発明による真核生物発現系において二量体の形態で生成されるものである。

【０１０４】

特定の実施形態では、ベータ鎖の断片の変異体は、Hillarp and Dahlback (1990, PNAS, Vol. 87, pp 1183-1187)により記載の、断片をコードする野生型配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる核酸によってコードされる。「ストリンジェントな条件」という用語は、約６５℃で、例えば、６＊ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ、５＊デンハルト溶液および非特異的ＤＮＡ　１００μｇの溶液中でまたは均等のイオン強度を有する他の任意の溶液中で、そして、例えば、最高で０．２＊ＳＳＣおよび０．１％のＳＤＳ溶液もしくは均等なイオン強度を有する他の任意の溶液中で、６５℃で洗浄した後に、２つの単鎖ＤＮＡ配列の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。

【０１０５】

好ましくは、前記野生型断片の機能性変異体をコードし、ストリンジェントな条件下で前記断片をコードする配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列は、そのハイブリダイゼーション部分において、断片をコードする配列の長さの少なくとも５０％、好ましくは少なくとも８０％の長さを有する。特定の実装形態では、前記断片の機能性変異体をコードし、ストリンジェントな条件下で前記断片をコードする配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列は、そのハイブリダイゼーション部分において、前記断片をコードする配列と実質的に同じ長さを有する。

【０１０６】

さらなる実装形態では、機能性変異体は、二量体化機能に必須ではない１個以上のアミノ酸が除去されてあるかもしくは置換されてある野生型断片の改変配列、および／または

、二量体化に必須の１個以上のアミノ酸が均等の官能基を持つアミノ酸により置き換えられてある（保存的置換）野生型断片の改変配列である。２０１位および２１５位に位置する２個のシステインならびにこれらのシステインの周囲のペプチド構造を保存して、例えば、それぞれのシステインの上流および下流で少なくとも３個のアミノ酸の保存によって、二量体化に必要であるジスルフィド架橋の形成を可能にすることが、特に推奨される。特に、機能性変異体はまた、ベータ鎖の異種性配列、特にＣ４ＢＰのアルファ鎖のドメインを二量体化を担うシステインの間に挿入することによっても、または対照的に、当該の同じシステインの間に存在するある特定のアミノ酸を排除することによっても、得ることができる。代替的に、機能性変異体はある特定のアミノ酸の点改変によって生成することができ、特に、二量体化プロセスにおける関与に関して中性アミノ酸による二量体化を担うシステインの置換（例えば、アミノ酸Ａ、Ｖ、Ｆ、Ｐ、Ｍ、Ｉ、ＬおよびＷ）によって、ならびに、システインの間に鎖内および／または鎖間ジスルフィド架橋を形成する能力を同時に保存するように別のアミノ酸をシステインにより置換することによって、生成することができる。したがって、こういった改変によって、多量体化プロセス、特に二量体化に関与する様々なシステイン同士の間に距離の変化がもたらされる。

【０１０７】

好ましくは、１９４～２５２の断片のアミノ酸の５０％未満が、好ましくは２５％未満またはさらに１０％未満（例えば５個以下のアミノ酸）または５％未満（例えば１または２個のアミノ酸）が排除されるかまたは置き換えられる。

【０１０８】

特定の実施形態では、機能性変異体は、以下を含むかまたはそれらからなる：

ａ）Ｃ４ＢＰβの断片（好ましくは１９４～２５２の断片）のアミノ酸の２５パーセント未満、好ましくは１０パーセント未満が切除されてあるかまたは置き換えられてあり、２０２位および２１６位（配列番号３に対して付番）に位置するシステインならびに各システインの上流および下流で少なくとも３個のアミノ酸が保存されてある、Ｃ４ＢＰβの断片（好ましくは１９４～２５２の断片）の改変配列；または

ｂ）二量体化を担うシステインが、好ましくはアラニン、バリン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシンおよびトリプトファンから選択されるアミノ酸で置換されており、Ｃ４ＢＰβの断片の別のアミノ酸がシステインで置換されている、Ｃ４ＢＰβの断片（好ましくは１９４～２５２の断片）の改変配列；または

ｃ）二量体化を担うシステインの間へのベータ鎖に対して異種性である配列の挿入によって改変されたＣ４ＢＰβの断片（好ましくは１９４～２５２の断片）の配列；または

ｄ）二量体化を担うシステインの間のアミノ酸を切除することによって改変されたＣ４ＢＰβの断片（好ましくは１９４～２５２の断片）の配列。

【０１０９】

キメラコンストラクト

好ましくは、キメラコンストラクトのＩＬ２部分とターゲティング部分とは互いに融合されている。ＩＬ２部分は、ターゲティング部分のＮ末端に融合されてもＣ末端に融合されてもよい。好ましい実施形態では、ＩＬ－２部分はターゲティング部分のＮ末端に融合されている。好ましくは、ＩＬ－２部分のＣ末端はターゲティング部分のＮ末端に融合されている。

【０１１０】

ＩＬ２部分とターゲティング部分とは、インフレームで（直接に）、またはアミノ酸リンカー、好ましくはポリＧリンカーを介して融合されている。本発明の文脈において、「リンカー」という用語は、５～８０個のアミノ酸、好ましくは５～３０個、さらに好ましくは１０～２０個のアミノ酸を含む（ポリ）ペプチドを指す。適切なリンカーは当技術分野で知られている。一部の実施形態では、リンカーはＧＧＧＧＳ（配列番号８）反復配列を含むが、当業者であれば、一般推奨事項［Argos, 1990, J Mol Biol. 20;211(4):943-58; George R, Heringa J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. Protein Eng. 2002;15:871-

879］に従って他の配列も使用することができることを理解するであろう。小型非極性（例えばＧｌｙ）アミノ酸または極性（例えばＳｅｒまたはＴｈｒ）アミノ酸から構成されるリンカーは柔軟性をもたらし、接続する機能ドメインの易動性を可能にする。好ましい実施形態では、ＩＬ２部分とターゲティング部分とは、配列番号１４のリンカー、または配列番号１４と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有するリンカーを介して連結される。

【０１１１】

特定の実施形態では、キメラコンストラクトは、上記のように、Ｃ４ＢＰβまたはその機能性断片などの二量体化特性を有する部分をさらに含む。このようなキメラコンストラクトは、ホモ二量体を形成することが好ましいが、または、下記のようにヘテロ二量体を生成するために使用してもよい。特定の実施形態では、（ｉ）ＩＬ２部分と、（ｉｉ）ターゲティング部分と（ｉｉｉ）二量体化特性を有する部分とは、フレーム内で（直接に）またはアミノ酸リンカーを介して互いに融合されている。

【０１１２】

好ましい実施形態では、ＩＬ－２部分は、Ｃ４ＢＰβまたはその前記機能性断片のＮ末端で融合されている。好ましくは、ＩＬ－２部分は、アミノ酸リンカー、好ましくはポリＧリンカーを介して、Ｃ４ＢＰβまたはその前記機能性断片のＮ末端で融合されている。一部の実施形態では、ＩＬ－２部分は、ＧＧＧＧＳ（配列番号８）反復配列を含むリンカーを介して、好ましくは、配列番号１４のリンカー、または配列番号１４と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有するリンカーを介して、Ｃ４ＢＰβ部分に融合されている。

【０１１３】

特定の実施形態では、Ｃ４ＢＰβ部分に融合されたＩＬ－２部分（「ＩＬ２－Ｃ４ＢＰβ」）に相当するアミノ酸配列は、配列番号９または配列番号１０を含むかまたはそれらからなる。

【０１１４】

好ましい実施形態では、ＩＬ－２部分のＣ末端は、Ｃ４ＢＰβまたはその前記機能性断片のＮ末端で融合されており、この場合、Ｃ４ＢＰβまたはその前記断片のＣ末端は、ターゲティング部分のＮ末端に連結されている。

【０１１５】

特定の実施形態では、キメラコンストラクトは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、

－　ＩＬ－２部分と、
－　適宜リンカーと、
－　ターゲティング部分と

を含む。

【０１１６】

好ましい実施形態では、キメラコンストラクトは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、

－　ＩＬ－２部分と、
－　適宜リンカーと、
－　Ｃ４ＢＰβまたはその機能性断片などの二量体化特性を有する部分と、
－　適宜リンカーと、
－　ターゲティング部分と

を含む。

【０１１７】

好ましい実施形態では、キメラコンストラクトは、配列番号１５～２０のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなるか、または、配列番号１５～２０と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる。好ましい実施形態では、

キメラコンストラクトは、配列番号１５もしくは配列番号１７のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなるか、または、配列番号１５もしくは配列番号１７と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる。

【０１１８】

別の特定の実施形態では、キメラコンストラクトは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、

－ ターゲティング部分と、

－ 適宜リンカーと、

－ ＩＬ－２部分と

を含む。

【０１１９】

好ましい実施形態では、キメラコンストラクトは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、

－ ターゲティング部分と、

－ 適宜リンカーと、

－ Ｃ４ＢＰβまたはその機能性断片などの二量体化特性を有する部分と、

－ 適宜リンカーと、

－ ＩＬ－２部分と

を含む。

【０１２０】

ホモ二量体およびヘテロ二量体のコンストラクト

本明細書では、組換え二量体タンパク質を生成する方法であって：

ａ）宿主細胞を、ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２（ＩＬ２）部分、ｉｉ）二量体タンパク質、例えばＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）、または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体を形成することができる部分、および

ｉｉｉ）上記の少なくとも１つのターゲティング部分を含む融合ポリペプチドであるキメラコンストラクトをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にするベクターでトランスフェクトすること；

ｂ）インビボで融合ポリペプチドおよび２つの融合ポリペプチドの共有結合による会合をコードするヌクレオチド配列を発現させるのに適切である条件下でトランスフェクトされた細胞を培養して、二量体タンパク質を形成させること；

ｃ）形成された二量体タンパク質を回収すること、および好ましくは精製すること、

を含む方法が記載される。

【０１２１】

トランスフェクトされた細胞は、Ｃ４ＢＰタンパク質の重合に関与するＣ４ＢＰタンパク質のアルファ鎖のＣ末端断片をコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする核酸をまったく含有しないことが好ましい。

【０１２２】

特定の実施形態では、ヘテロ二量体を生成する方法が本明細書に記載されており、前記方法は：

ａ．宿主細胞を１つ以上のベクターでトランスフェクトして：

ｉ．第１の融合ポリペプチドであって、ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２（ＩＬ２）部分、およびｉｉ）二量体タンパク質、例えばＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）、または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体を形成することができる部分を含む第１の融合ポリペプチドと；

ｉｉ．第２の融合ポリペプチドであって、ｉ）Ｅ０６　ｓｃＦｖまたはその機能性変異体などの上記の少なくとも１つのターゲティング部分、およびｉｉ）二量体タンパク質、例えばＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）、または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体を形成することができる部分を含む第２の融合ポリペプチドとをコードする１つ以上のヌクレオチド配列の発現を可能にすること：

ｂ．インビボで、第１および第２の融合ポリペプチドならびに２つの融合ポリペプチドの

会合をコードするヌクレオチドの配列もしくは複数の配列を発現させるのに適度である条件下でトランスフェクトされた細胞を培養して、ヘテロ二量体タンパク質を形成させること；
ｃ．形成されたヘテロ二量体タンパク質を回収すること、および好ましくは精製すること、
を含む。
【０１２３】
特定の実施形態では、ヘテロ二量体を生成する方法が本明細書に記載されており、前記方法は：
ａ．宿主細胞を１つ以上のベクターでトランスフェクトして：
ｉ．第１の融合ポリペプチドであって、ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２（ＩＬ２）部分、ｉｉ）二量体タンパク質、例えばＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）、または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体を形成することができる部分、およびｉｉｉ）Ｅ０６　ｓｃＦｖまたはその機能性変異体などの上記の少なくとも１つのターゲティング部分を含む第１の融合ポリペプチドと；
ｉｉ．第２の融合ポリペプチドであって、ｉ）第１の融合ポリペプチドのインターロイキン２（部分）とは異なると定義される少なくとも１つの異種性ポリペプチド、ｉｉ）二量体タンパク質、例えばＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）、または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体を形成することができる部分、およびｉｉｉ）適宜、Ｅ０６　ｓｃＦｖまたはそれらの機能性変異体などの上記の少なくとも１つのターゲティング部分を含む第２の融合ポリペプチドと
をコードする１つ以上のヌクレオチドの発現を可能にすること；
ｂ．インビボで、第１および第２の融合ポリペプチドならびに２つの融合ポリペプチドの会合をコードするヌクレオチドの配列もしくは複数の配列を発現させるのに適度である条件下でトランスフェクトされた細胞を培養して、ヘテロ二量体タンパク質を形成させること；
ｃ．形成されたヘテロ二量体タンパク質を回収すること、および好ましくは精製すること、
を含む。
【０１２４】
好ましくは、第２の融合ポリペプチドにおいて、Ｃ４ＢＰβまたは前記断片は、上記異種性ポリペプチドのＣ末端に融合されている。
【０１２５】
異種性ポリペプチドに言及する場合に、「異なる」という用語は、第１の融合ポリペプチドのインターロイキン２（部分）の一次配列とは少なくとも１個のアミノ酸異なる当該一次アミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。代替的に、「異なる」という用語はまた、同じ一次配列を有するが、例えば、アセチル化、アミド化、ビオチン化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、メチル化、リン酸化もしくは硫酸化の観点で、または脂質（イソプレニル化、パルミトイル化およびミリストイル化）、糖質（グリコシル化）もしくはポリペプチド（ユビキチン化）を付加することによる、様々な翻訳後修飾を有する異種性ポリペプチドもカバーする。
【０１２６】
好ましい実施形態では、上記異種性ポリペプチドはＩＬ２ではない。
【０１２７】
このようなヘテロ二量体タンパク質も本発明の一部である。
【０１２８】
特定の実施形態では、宿主細胞は、２つの融合ポリペプチド、すなわち、第１の融合ポリペプチドＡであって、ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２（ＩＬ２）部分、ｉｉ）二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体、およびｉｉｉ）Ｅ０６

ｓｃＦｖまたはその機能性変異体などの上記の少なくとも１つのターゲティング部分を含む第１の融合ポリペプチドＡと；第２の融合ポリペプチドＡであって、ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２（ＩＬ２）部分、ｉｉ）二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体、およびｉｉｉ）Ｅ０６　ｓｃＦｖまたはその機能性変異体などの上記の少なくとも１つのターゲティング部分、を含む第２の融合ポリペプチドＡとの共発現を可能にする。本特定の実施形態では、２つの融合ポリペプチドの共発現により、ホモ二量体Ａ－Ａの生成も可能とすることができる。

【０１２９】

特定の実施形態では、宿主細胞は、２つの融合ポリペプチド、すなわち、第１の融合ポリペプチドＡであって、ｉ）少なくとも１つのインターロイキン２（ＩＬ２）部分、ｉｉ）二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体、およびｉｉｉ）Ｅ０６　ｓｃＦｖまたはその機能性変異体などの上記の少なくとも１つのターゲティング部分、を含む第１の融合ポリペプチドＡと；第２の融合ポリペプチドＢであって、ｉ）少なくとも１つの異種性ポリペプチド、ｉｉ）二量体タンパク質を形成することができるＣ４ｂ結合タンパク質のベータ鎖（Ｃ４ＢＰβ）または少なくとも１つのその断片もしくはその機能性変異体、およびｉｉｉ）Ｅ０６　ｓｃＦｖまたはそれらの機能性変異体などの上記の少なくとも１つのターゲティング部分を含み；ここで、上記異種性ポリペプチドは第１の融合ポリペプチドのインターロイキン２（部分）とは異なると定義される、第２の融合ポリペプチドＢとの共発現を可能にする。本特定の実施形態では、２つの融合ポリペプチドの共発現により、ホモ二量体Ａ－ＡおよびＢ－Ｂの生成ならびにヘテロ二量体Ａ－Ｂの生成も可能とすることができる。

【０１３０】

また、上で定義の二量体タンパク質またはヘテロ二量体タンパク質の合成を可能にし、上で定義の生成方法の工程ａ）を実施することによって取得可能な組換え真核細胞も提供される。宿主細胞における生成について詳細を下に記載する。

【０１３１】

生成方法

融合タンパク質の形態にあるキメラコンストラクト、およびそのホモ二量体またはヘテロ二量体は、適切な発現ベクターにおけるＤＮＡ組換え技法によって、またはＲＮＡ分子によって生成することができる。

【０１３２】

発現ベクターは、コンストラクトが導入される宿主細胞に応じて選択される。好ましくは、発現ベクターは、真核細胞における発現を可能にするベクターから、とりわけ染色体ベクターまたはエピソームベクターまたはウイルス派生物から、特にプラスミド、酵母染色体に由来するベクターから、もしくはバキュロウイルス、パポウイルスもしくはＳＶ４０、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスから、もしくはそれらの組合せに由来するベクター、特にファージミドおよびコスミドから、選択される。特定の実施形態では、発現ベクターは、昆虫細胞に感染することができるバキュロウイルスの発現を可能にするベクターである。

【０１３３】

必要に応じて、融合ポリペプチドをコードする配列はまた、好ましくはその５’部分に、融合ポリペプチドの分泌のためのシグナルペプチドをコードする配列も含む。従来、シグナルペプチドの配列は、疎水性アミノ酸（Ｐｈｅ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、ＭｅｔおよびＶａｌ）に富んだ１５～２０個のアミノ酸の配列である。

【０１３４】

ベクターは、融合ポリペプチドをコードする配列の発現に必要な配列のすべてを含む。特に、ベクターは、コンストラクトが導入される宿主細胞に応じて選択される適切なプロモーターを含む。

【０１３５】
本発明の文脈において、「宿主細胞」という用語は、細胞にとって異種であるとともにトランスフェクション法によって当該細胞のゲノムに導入されてある核酸によって担持される遺伝子を発現することができる細胞を意味する。
【０１３６】
好ましくは、宿主細胞は真核細胞である。真核宿主細胞は、Ｓ．セレビシエ（Ｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの酵母細胞、アスペルギルス種（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｓｐ）などの糸状菌細胞、ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）のＳ２細胞またはスポドプテラ属（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ）のｓｆ９などの昆虫細胞、哺乳動物細胞および植物細胞から特に選択される。特に引用することができる哺乳動物細胞は、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＨｅＬａ、Ｃ１２７、３Ｔ３、ＨｅｐＧ２またはＬ（ＴＫ－）の各細胞などの哺乳動物細胞株である。好ましい実装形態では、前記宿主細胞は、真核細胞株、好ましくはＳｆ９昆虫細胞から選択される。ｓｆ９昆虫細胞において組換え二量体タンパク質を調製する方法は、米国特許第７，８８４，１９０号に記載されている。異種核酸を発現する細胞の作出については当業者であれば既知である任意のトランスフェクション方法を使用して、本発明の方法の工程ａ）を実施することができる。トランスフェクション方法は、例えば、Sambrook et al, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。
【０１３７】
代替的に、キメラコンストラクトは、化学ペプチド合成によって生成することもできる。例を挙げると、本発明のタンパク質はより短いペプチドの並行合成によって生成することができるが、このより短いペプチドは次いで、正確なジスルフィド架橋を備えるタンパク質の完全な配列が得られるように組み立てられる。ＩＬ－２の合成については、例を挙げると、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、Asahina et al., Angewandte Chemie International Edition, 2015, Vol.54, Issue 28, 8226-8230に例示されている。
【０１３８】
別の実施形態では、キメラタンパク質は、前記キメラタンパク質をコードする核酸を対象に投与した後に、インビボで発現させることができる。好ましい実施形態では、核酸は、ＲＮＡまたはアデノウイルス関連ウイルス（ＡＡＶ）などのウイルスベクターによって担持される。
【０１３９】
製剤および投与経路
また、本明細書に記載のキメラコンストラクト、核酸、ベクターまたはタンパク質を、好ましくは薬学的に許容される媒体、担体または賦形剤を伴って（例えば、溶液、懸濁液または混合物中で）含む医薬組成物も提供される。
【０１４０】
適切な賦形剤には、任意の等張溶液、生理食塩水、緩衝溶液、徐放性製剤等が含まれる。液体、凍結乾燥または噴霧乾燥の組成物は当技術分野で知られており、水性または非水性の溶液または懸濁液として調製することができる。好ましくは、医薬組成物は、適正な安定化剤、緩衝剤、増量剤、または組合せを含む。
【０１４１】
医薬組成物は、別の有効成分をさらに含有してもよく、または他の有効成分と組み合わせて投与してもよい。
【０１４２】
医薬組成物は、非経口経路、例えば皮内経路、皮下経路または鼻腔内経路を含めて、好都合な任意の経路を使用して投与することができる。皮下経路が好ましい。経口、舌下または口腔の各投与も包含される。
【０１４３】

皮下注射に適した製剤の例は、国際特許出願ＷＯ２０１７／０６８０３１に記載されている。

【０１４４】

自己免疫性障害および／または炎症性障害の治療

本明細書に記載の医薬組成物は、以下のような、自己免疫性障害および／または炎症性障害を治療するための方法において有用である：全身性エリトマトーデス、Ｉ型糖尿病、ＨＣＶ関連性血管炎、ブドウ膜炎、筋炎、全身性血管炎、乾癬、アレルギー、喘息、クローン病、多発性硬化症、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性甲状腺疾患、自己炎症性疾患、アルツハイマー病および筋萎縮性側索硬化症を含めて神経変性疾患、急性および慢性対宿主移植片疾患、自然流産および同種移植拒絶反応；固形臓器移植の拒絶反応、血管炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、およびアレルギー性喘息；脊椎関節炎または強直性脊椎炎；シェーグレン症候群、全身性硬化症、気性脱毛症、または潰瘍性大腸炎。

【０１４５】

本明細書に記載の医薬組成物はまた、筋肉疾患、神経変性、心臓または他の組織の梗塞などの、Ｔｒｅｇ組織再生特性の活性化が望まれる状態においても適している。

【０１４６】

好ましい実施形態では、本明細書では、自己免疫性障害および／または炎症性障害の治療方法が記載されており、方法は、組成物を週に１回もしくは２回、またはさらには月に１回もしくは２回、好ましくは皮下経路によって投与することを含む。一実施形態では、３０ＭＩＵ／日未満、好ましくは２０ＭＩＵ／日未満の投薬量が好ましく、有利には１０ＭＩＵ／日未満、または１ＭＩＵ／日から８ＭＩＵ／日の間である。別の特定の実施形態では、１から５ＭＩＵ／日の間の、好ましくは０．１から３．５ＭＩＵ／日までの用量が使用される。

【０１４７】

一般的に言えば、Ｔｒｅｇ数の１．２、１．５、２、３、４または５倍の向上を可能にする用量が好ましい。ＩＬ－２の量の標準測定単位は国際単位（ＩＵ）であるが、これは、技術的には不定重量であるが、世界保健機関（ＷＨＯ）によって決定されたように、特定の細胞増殖アッセイにおいて一定の生物学的効果を生み出す量である。その理由とは、ｉ）重量は分子の正確な配列およびそのグリコシル化プロファイルに応じて変動すること、およびｉｉ）重要なのは分子の重量ではなく活性であること、である。

【０１４８】

国際単位の原則は、任意のＩＬ－２分子を比較することができる標準を精密に提供することである（ＩＬ－２のソース、または野生型配列もしくは活性変異体配列を含めてＩＬ－２の配列には関係なく）。

【０１４９】

実際には、ＷＨＯは、ＩＬ－２分子を含有するアンプルを提供しており、このＩＬ－２分子は較正されてあり、かつ、その効力によって定義されるＩＬ－２（ここでも、前記ＩＬ－２のソースまたは配列には関係なく）の所与の調製物の投薬量を決定するための基準として利用する。例を挙げると、ＩＬ－２の所与の調製物の投薬量を決定するために、ＣＴＬＬ－２などのＩＬ－２依存性細胞株を使用した標準細胞増殖アッセイにおいて候補ＩＬ－２調製物の生物活性を測定し、標品の生物活性と比較する。細胞を、様々な用量の標品の存在下で増殖させる。ＩＬ－２の用量反応効果が確立されており、この場合、ＩＬ－２の用量をＩＵとしてＸ軸上にプロットし、増殖（ｐｒ）の測定値をＹ軸上にプロットする。活性が未知の任意のＩＬ－２生成物の活性を決定したい場合、当該生成物を使用してＩＬ－２依存性細胞を増殖させ、増殖を測定する。次いで、ｐｒ値をＹ軸上にプロットして、その値からＸ軸に平行な線を引く。用量反応線とのこの線の交点から、次いで、Ｙ軸に平行な線を引く。Ｘ軸とのその交差によって、ＩＵ表示での候補ＩＬ－２生成物の活性が得られる。

【０１５０】

ＷＨＯの標品アンプルのいかなる変更も、ＩＬ－２調製物の国際単位にもそれの投薬量

の決定にも両方にまったく影響を与えない。

【０１５１】

第１の標品（ＷＨＯ国際標準コード８６／５０４、１９８７年の日付）は、ジャーカット細胞に由来する精製グリコシル化ＩＬ－２を含有し、それに１００ＩＵ／アンプルの効力を任意に割り当てた。第１の国際標品（ＩＳ）の在庫が残り少なくなってきたので、ＷＨＯはこれを補充する必要があった。ＷＨＯは、このときには大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）を使用して作製された別の較正済みＩＬ－２アンプルを提供した。第２の標品アンプルは、アンプルあたり２１０ＩＵの生物活性を含有した。標品アンプルの変化は、ＩＵが変化することを意味するものではない。したがって、試験ＩＬ－２調製物の投薬量を決定することは、基準として第１の標品アンプルを使用するか、第２の標品アンプルを使用するか、その後の標品アンプルを使用するかにかかわらず、変化することはない。

【０１５２】

一実施形態では、長期投与が実装されるが、これは、例えば３日毎に１回～３か月毎に１回で投与することを含む。このような投与の連続を、必要に応じて繰り返すことができる。

【０１５３】

別の実施形態では、ＩＬ－２は、３日から３か月まで、好ましくは１から４週間まで続けてもよい投与の中断の後に、繰り返すことができるサイクルで、１～２週間隔日で与えられる。

【０１５４】

別の実施形態では、治療は、導入コースとも呼ばれる第１のコース、および、維持コースである第２のコースを含むことができる。

【０１５５】

特定の実施形態では、治療は、医薬組成物が少なくとも連続約２または３日の間、好ましくは３～７日の間、さらに好ましくは連続４～５日の間１日１回投与される少なくとも第１のコースを含み、好ましくはこれに続いて、例えば約６日後、または約１～約４週間後に維持用量を含むのがよい。

【０１５６】

維持用量は典型的には、少なくとも１か月、好ましくは少なくとも約３か月、さらに好ましくは少なくとも約６か月の間投与するのがよい。好ましい実施形態では、維持用量は約３か月から約１２か月の間、好ましくは約６か月から約１２か月の間投与される。

【０１５７】

好ましい実施形態では、維持治療は、週に、もしくは毎週もしくは毎２週に１回または２回、または月に１回の医薬組成物の投与からなる。

【０１５８】

好ましい実施形態では、維持治療は、少なくとも１か月、好ましくは約３か月から約１２か月までの期間の間、週に、毎週もしくは毎２週に１回または２回、または月に１回のインターロイキン－２の投与からなる。

【０１５９】

好ましくは、維持投薬量は、第１のコースの投薬量と実質的に同じであるか、またはより低い用量であってもより高い用量であってもよい。

【０１６０】

がんの治療

本明細書に記載の医薬組成物は、がんを治療する方法において有用である。一部の実施形態では、対象は局所進行性または転移性がんに罹患している。一部の実施形態では、がんは固形腫瘍である。一部の実施形態では、がんは、結腸がん、肺がん、卵巣がん、胃がん、膀胱がん、膵臓がん、子宮内膜がん、乳がん、腎臓がん、食道がん、または前立腺がんである。一実施形態では、３０ＭＩＵ／日未満、好ましくは２０ＭＩＵ／日未満の投薬量が好ましく、有利には１０ＭＩＵ／日未満、または３ＭＩＵ／日から５ＭＩＵ／日の間である。他の実施形態では、４００，０００～７５０，０００ＩＵ／ｋｇまたは５５０，

０００～７５０，０００ＩＵ／ｋｇ、好ましくは６００，０００～７００，０００ＩＵ／ｋｇのＩＬ２が投与される。投薬量は、ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（登録商標）に処方される投薬量と同様であってもよいが、それよりも少ないことが予想される。

【０１６１】

組成物は、１日あたり１回以上から１週間あたり１回以上まで、１回で投与してもよい；隔日に１回を含む。当業者であれば、それらに限定されないが、疾患の重症度、以前の治療、対象の全体的な健康状態および／または年齢、ならびに存在する他の疾患を含めて、ある特定の要因が、対象を効果的に治療するのに必要な投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するであろう。さらに、対象の治療には、単一の治療が含まれてもよく、一連の治療が含まれてもよい。

【０１６２】

自己免疫性障害および／または炎症性障害に関連した上記のプロトコルの例は、がんを治療する上で使用するために同一または同様に適用することができる。代替的に、別の例では、組成物を５日間８時間毎に投与し、これに続いて２～１４日、例えば９日間の休止期間、これに続いてさらなる５日間の８時間毎投与を行うことができる。一部の実施形態では、投与は、４日毎に３用量投与される。

【実施例】

【０１６３】

［実施例１］インビトロおよびインビボのターゲティング

材料および方法

融合タンパク質

レンチウイルスベクターを、ＩＬ－２融合タンパク質および標的に向けられたタンパク質の生成に使用した。簡潔に説明すると、ホスホコリン酸化脂質に結合することができるｓｃＦｖＥ０６に融合されたヒトＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ（ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６またはＩＬ－２Ｎ８８Ｒ－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６）を、脾限局巣形成ウイルス（ＳＦＦＶ）プロモーター下のレンチウイルスプラスミドに統合した。「ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６」（配列番号１９）は、Ｃ４ＢＰβのＮ末端に融合されたヒトＩＬ－２であり、Ｃ４ＢＰβはｓｃＦＶＥ０６のＮ末端に融合されている。「ＩＬ－２Ｎ８８Ｒ－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６」（配列番号２０）は、Ｃ４ＢＰβのＮ末端に融合された突然変異型ＩＬ－２であり、Ｃ４ＢＰβはｓｃＦＶＥ０６のＮ末端領域に融合されている。

【０１６４】

ＨＥＫ　２９３Ｔ細胞に、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を使用してレンチウイルスプラスミドを７０％コンフルエンスでトランスフェクトし、無血清培地で２４～３０時間培養した。次いで、上清を濾過し、超遠心分離によって濃縮し、適正な緩衝剤に再懸濁し、その後に－８０℃で保存した。安定したトランスフェクト細胞を得るために、ＨＥＫ　２９３Ｔ細胞に様々な感染多重度（ＭＯＩ）でレンチウイルスを感染させ、その後にＧＦＰ＋細胞の細胞をソーティングして、１００％の細胞がＩＬ－２融合タンパク質を産生することを確実にした。安定した細胞株を無血清培地で４８時間培養し、上清を収集し、効果的な固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）精製を可能にするＨｉｓＰｕｒ　Ｎｉ－ＮＴＡ　Ｒｅｓｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）を使用して精製し、その後に濃縮、緩衝剤交換およびＳＤＳ－ＰＡＧＥによる検証を行った。

【０１６５】

ヒトのｐＳＴＡＴ５解析

健康なボランティア由来のヒト血液試料を、フランス、パリのＳａｉｎｔ　Ａｎｔｏｉｎｅ　ＨｏｓｐｉｔａｌのＥｔａｂｌｉｓｓｅｍｅｎｔ　Ｆｒａｎｃａｉｓ　ｄｕ　Ｓａｎｇ（ＥＦＳ）から得た。各ボランティアからインフォームドコンセントを得た。ＳＴＡＴ５リン酸化（ｐＳＴＡＴ５）の誘導に対するヒトＩＬ－２、融合タンパク質および標的に向けられたタンパク質の効果を、フローサイトメトリーを使用して、ヒトＣＤ４＋制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ；ＣＤ４＋Ｆｏｘｐ３＋ＣＤ１２７ｌｏ／－）、ＣＤ４＋通常型Ｔ細胞（Ｔｃｏｎｖ；ＣＤ４＋Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ８＋Ｔ細胞およびナチュラルキラー細胞

（ＣＤ３－ＣＤ５６＋）において評価した。全血１００μｌと３７℃で１５分間混合したヒトＩＬ－２、融合タンパク質および標的に向けられたタンパク質の１０倍希釈を、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｅｐｉｔｏｐｅｓ ｅｘｐｏｓｕｒｅキット（ＰＥＲＦＩＸ ＥＸＰＯＳＥキット、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用してｐＳＴＡＴ５染色の前に行った。細胞内ｐＳＴＡＴ５シグナルと併せて、表面マーカによって、異なるリンパ球細胞集団に対する活性の比較および半数効果濃度（ＥＣ$_{50}$）値の算出が可能になった。

【０１６６】

ＥＬＩＳＡ

標的に向けられたタンパク質の検出の場合、捕捉抗ＩＬ－２モノクローナル抗体（ＭＱ１－１７ｈ１２）またはホスホコリン－ＢＳＡ（ＬＧＣ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を１μｇ／ｍＬでコーティングしたことおよび１μｇ／ｍＬで抗Ｈｉｓ抗体（１：１０００；Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）を使用して検出を実施したこと、その後に超高感度ストレプトアビジン－ＨＲＰ（１：２０００；Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を用いて顕色させたことを別にすれば、血漿レベルおよびタンパク質レベルは上に本明細書に記載のものと同じプロトコルに従って測定した。

【０１６７】

フローサイトメトリーおよび抗体

全血：

マウスの血液溶血の後、単離した免疫細胞を、所定の最適希釈率にての以下の抗体で４℃で２０分間染色した：ＣＤ３－ＰＥｆｌｕｏｒ６１０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＣＤ４Ｖ５００（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ８ＡＦ７００（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ２５ＰｅＣｙ７（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＮＫｐ４６ｅＦ６６０（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、およびＣＤ１９ｅＦ７８０（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）。Ｆｏｘｐ３－ＦＩＴＣ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）の細胞内検出を、ＦｏｘＰ３染色緩衝剤キット（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＦｏｘＰ３／Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ）を使用して、固定および透過処理された細胞に対して実施した。細胞をｃｙｔｏｆｌｅｘ Ｓ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）で取得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアで解析した。死細胞は前方／側方散乱ゲーティングによって除外した。ＣＤ４＋ ＴｒｅｇをＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３＋細胞として、ＣＤ４＋ ＴｅｆｆをＴｃｏｎｖ ＣＤ４＋ＣＤ２５＋とも呼ばれるＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３－細胞として定義し、ＣＤ８＋ ＴｒｅｇをＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３＋細胞として、Ｔｃｏｎｖ ＣＤ８＋ＣＤ２５＋とも呼ばれるＣＤ８＋ ＴｅｆｆをＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｆｏｘｐ３＋細胞として、ナチュラルキラー細胞をＮｋｐ４６＋細胞としておよびＢ細胞をＣＤ１９＋細胞として定義した。

【０１６８】

ＳＴＡＴ５アッセイの場合、ヒト全血を膜タンパク質に対する以下の抗体とともに１５分間インキュベートした：ＣＤ３－ＦＩＴＣ、ＣＤ１２７－ＰＣ７、ＣＤ４－ＰＢおよびＣＤ８－ＫＯ、ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００およびＣＤ５６－ＡＰＣ－ｅＦｌｕｏｒ７８０。固定および透過処理の後、細胞を細胞内ｐ－ＳＴＡＴ５－ＰＥ抗体およびＦｏｘｐ３－ＡＰＣ抗体で染色した。

【０１６９】

大腸炎炎症実験モデル

Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、飲料水に含まれる２．５％デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ；Ｓｉｇｍａ）を６日間経口投与することによって免疫した。マウスを体重、硬さ、およびその便中の血液の存在について１０日間毎日モニタリングした。重症度を評価するために以下のスコアリングシステムを使用してきた：

－ 体重減少 ０～５％の間：１ ／ ５～１０％の間：２ ／ １０～１５％の間：３／および１５％超：４。

－ 便形：正常便：０ ／ 有形であるが柔らかい便：１ ／ 軟便：２ ／ 軽度の下痢：３ ／ 水様下痢：４。

－ 肉眼的出血：なし：０ ／ 存在：２ ／ 肉眼的出血：４。

【０１７０】
結果
標的に向けられた融合タンパク質がその標的を認識し、二量体化し、インビトロでのその生物活性を維持する能力
ＩＬ－２コンストラクトを、その機能を変更することなく炎症性組織を標的とするように組織選択的部分と結合させた。詳細には、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβまたは$IL\text{-}2_{N88R}$－Ｃ４ｂｐβを、Ｃ４ｂｐβの末端部分で、ホスホコリン（ＰＣ）などの酸化リン脂質に特異的であることが知られているｓｃＦｖＥ０６に融合させた（図１．Ａ）。
【０１７１】
標的に向けられたタンパク質のインビトロ結合を決定するために、ＰＣ－ＢＳＡ、抗ｈＩＬ－２抗体またはＢＳＡをコーティングし、その後に、標的に向けられたタンパク質またはｓｃＦｖＥ０６上清のいずれかを添加し、抗Ｈｉｓ－タグ抗体を使用して顕色行った（図１Ｂ）。ＰＣ－ＢＳＡコーティングの後、３つのコンストラクトが検出されたが、このことは、タンパク質がＰＣ－ＢＳＡに結合することができることを意味する。加えて、ｈＩＬ－２コーティングの後、標的に向けられた融合タンパク質のみが検出され、このことにより、抗ＩＬ－２および抗Ｈｉｓ抗体によって認識される標的に向けられたタンパク質の良好な立体構造が強調された。最終的に、ＢＳＡコーティング後に標的に向けられたタンパク質の検出は観察されず、このことにより、非特異的結合がないことおよびｓｃＦｖＥ０６がＰＣに特異的であること、が確認された。
【０１７２】
濾過、精製および濃縮の後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥこれに続くクマシーブルー染色およびウェスタンブロットを行った後に、組換え標的に向けられたタンパク質を同様に特徴付けした（図１Ｃ）。９８ｋＤａ周辺の各タンパク質についてのクマシー染色後にユニークなシグナルが検出されるが、このことは、非還元条件下で試料中に主要なタンパク質が１つだけ存在することを意味する（図１Ｃ）。組換え標的に向けられたタンパク質が一次抗ヒトＩＬ－２抗体または一次抗ヒスチジン抗体によって明らかとされるかどうかに関わりなく、加熱および還元の条件下では、その単量体（５０ｋＤａ）および二量体（１００ｋＤａ）の形態にあるタンパク質に特徴的なＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６および$IL\text{-}2_{N88R}$－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６についてバンドが観察される。加えて、条件とは別に、ｓｃＦｖＥ０６に特徴的な一次抗ヒスチジン抗体顕色後に各タンパク質について２５ｋＤａに単一のバンドが同様に観察される。比較すると、天然ヒトＩＬ－２は、一次抗ヒトＩＬ－２抗体のみを使用して明らかとなるが、この場合、１７ｋＤａでバンドが観察される。
【０１７３】
再び、ＳＴＡＴ５リン酸化を測定するヒト全血アッセイを実施して、ＩＬ－２受容体を発現する様々な細胞タイプに対する標的に向けられた融合タンパク質の効果を決定した。制御性Ｔ細胞EC_{50}は、天然ｈＩＬ－２については約５ｎｇ／ｍＬ、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６については１３ｎｇ／ｍＬおよび$IL\text{-}2_{N88R}$－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６については６５０ｎｇ／ｍＬであったが、このことは、３倍超のＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６および１３０倍超の$IL\text{-}2_{N88R}$－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６がＴｒｅｇ細胞上で均等のｐＳＴＡＴ５応答を得るのに必要であったことを意味する（図１Ｄ）。ｐＳＴＡＴ５プロファイルの違いが、Ｔｃｏｎｖ、ＣＤ８＋細胞およびＮＫ細胞の各集団でも観察された。
【０１７４】
実際、少なくとも１０００ｎｇ／ｍＬまでの用量にての標的に向けられた融合タンパク質を用いてｐＳＴＡＴ５応答の減少が観察されるが、一方、これらのエフェクターコンパートメント上の天然ｈＩＬ－２を用いて用量１００ｎｇ／ｍＬから応答が得られる。例えば、Ｔｃｏｎｖ細胞、ＣＤ８＋細胞およびＮＫ細胞の２０％未満が、$IL\text{-}2_{N88R}$－Ｃ４ｂｐβ－Ｅ０６の概１００００ｎｇ／ｍＬに応答して活性化される。このような結果によって強調されるところは、二量体受容体への結合親和性の減少に起因する、標的に向けられた融合タンパク質のＴｒｅｇ選択性、である。

【０１７５】
大腸炎炎症実験モデルにおける標的に向けられた融合タンパク質の有効性の証明
標的に向けられた融合タンパク質を、大腸炎炎症実験モデルにおいて疾患の重症度を制御するそれらの能力について評価した（図２．Ａ）。Ｔｒｅｇの同様の増殖を得るために、ｒＡＡＶ用量を、ＩＬ－２治療群の５．１０^{10}ｒＡＡＶ　ｖｇから、ｓｃＦｖＥ０６、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６およびＩＬ－２$_{Ｎ８８Ｒ}$－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６治療群に対する５．１０^{11}　ｒＡＡＶ　ｖｇまで適用した。
【０１７６】
注射の７日後、Ｔｒｅｇ細胞は、ＣＤ２５　ＭＦＩに関しては３～４倍の上昇であったことから見て、ｒｈＩＬ－２または標的に向けられた融合タンパク質で治療した群では倍率２．５～３倍だけ増殖し活性化された（図２．Ｂ）。突然変異タンパク質はエフェクター集団を増殖させることはなかったが、一方、ｈＩＬ－２およびＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６治療によって倍率３倍だけエフェクター集団の増殖がもたらされる。加えて、たとえ用量が１０分の１であったとしても、ＮＫ細胞はｈＩＬ－２で治療されたマウスにおいてのみ増殖した。
【０１７７】
予想通り、５．１０^{11}　ｒＡＡＶ　ｖｇ　ｓｃＦｖＥ０６注射の後、これら４つのパラメーターに対して有意な変化はまったく観察されなかった。
【０１７８】
ＤＳＳ投与の６日間後、未治療のマウスは重要な臨床症状を発生したが、この場合、軽度の下痢（便スコア３．５）に伴うその初期体重のおよそ１０％の有意な減少および重度の結腸炎症によって説明される便中の血液の存在という状態であった（図２Ｃ、Ｄ、Ｅ）。
【０１７９】
こういった症状の付加に対応する疾患活動性指数（ＤＡＩ）は、３日目から１０日目まで上昇し、１２のうち８のスコアに到達し、その後に、１４日目まで低下した（図２．Ｆ）。比較すると、ｓｃＦｖＥ０６で治療したマウスは同様の体重減少および便形を有したが、出血はほとんどなく、このことによって、未治療マウスと比較して経時的ＤＡＩの軽微な低下が説明された。ｈＩＬ－２による治療は臨床症状を部分的に制御し、体重減少、非常に柔らかいが水っぽくなく、出血がほとんどないという状態であることから、最初のＤＳＳ投与の１０日後に最大ＤＡＩスコアが５であることが説明される。興味深いことに、標的に向けられた融合タンパク質で治療したマウスは、有形であり部分的に柔らかい便（最大スコア２）かつ出血はほとんどないという状態をもってして、腸の臨床症状が著しく減少していた。最終的に、ＤＡＩは、標的に向けられた融合群それぞれにおいてスコア４を超えることはなく、このことにより、大腸炎の治療におけるこれら２つのタンパク質の治療効果が確認された。
【０１８０】
興味深いことに、上腕リンパ節および大動脈傍リンパ節では、腸関門を通過するのに必要なインテグリンα４β７を発現するＴｒｅｇが、天然のＩＬ－２よりも、標的に向けられた融合タンパク質を用いる治療後に良好な割合で存在する。こういった観察によって、炎症部位に動員されるＴｒｅｇの数が標的に向けられたタンパク質群において向上していること、および間接的には、これらの標的に向けられたタンパク質で治療されたマウスの腸内のＩＬ－２の量がより高いことが示唆されており、したがって、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６およびＩＬ－２$_{Ｎ８８Ｒ}$－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６の標的能力が強調されている。同様に、これらの２つの群では、天然のＩＬ－２と比較して、より多くのＴｒｅｇがＫｉ６７を発現しており、このことは、これらＴｒｅｇがこれら２つの群においてより多く増殖することを意味する。
【０１８１】
［実施例２］インビボでの薬物動態
方法

ＰＫ解析
７週齢の雌性Ｃ５７Ｂ１／６マウスに、ヒトＩＬ－２またはＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６　５０ＫＩＵの１００μｌを皮下注射した。血液１００μｌを、ＥＬＩＳＡによるｈＩＬ－２投薬量について様々な時点：ベースライン、１時間、２時間、４時間、６時間、８時間、１０時間、２４時間および４８時間で採取した。血漿試料を適正な緩衝剤で１／１０００まで１０倍連続希釈した。Ｅｌｉｓａを供給業者の推奨を使用して実施し、プレートを４５０ｎｍで読み取った。両群のｈＩＬ－２濃度を、適正な標準曲線を使用して算出した。
【０１８２】
ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６のインビボでの結合
乾癬モデル
マウスの乾癬モデルを、マウスの耳に５％イミキモドクリームを６日間毎日適用することによって誘導した。内部対照として、各マウスの反対側の耳に、同じスケジュールに従ってワセリンを適用した。乾癬誘導の１０日前に、８週齢の雌性Ｂａｌｂ／ｃマウスに、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６をコードする５．１０^{11}　ｖｇ　ＡＡＶをＩＰ注射した。乾癬の対照マウスについては治療しなかった。最初の適用から６日後、実験終了時に、マウスを安楽死させ、耳を取り出し、即座にＯＣＴで凍結した。次いで、クライオスタットを使用して耳の８μｍの横断切片を作製し、その後に、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６検出に向けて固定、透過処理およびＤＡＰＩ（核染色）および抗６Ｘ－ＨｉｓＴａｇ－Ｃｙ５を用いる染色を行った。切片は蛍光顕微鏡を使用して解析した。
【０１８３】
ＤＳＳ誘導性大腸炎モデル
マウスにおけるＤＳＳ誘導性大腸炎モデルを、飲料水に含まれる３％デキストラン硫酸ナトリウムを６日間添加することによって誘導した。大腸炎誘導の１０日前に、８週齢の雌性Ｃ５７Ｂ１／６マウスに、ＩＬ２またはＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６のいずれかをコードする５．１０１１　ｖｇのＡＡＶをＩＰ注射した。対照マウスの群については添加したが、治療しなかった。誘導から１０日後、実験終了時に、炎症の最大に、マウスを安楽死させ、結腸を取り出し、即座にＯＣＴで凍結した。次いで、クライオスタットを使用して耳の８μｍの横断切片を作製し、その後に、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６検出に向けて固定、透過処理および抗ＩＬ２－ＨＲＰまたは抗６Ｘ－ＨｉｓＴａｇ－ＨＲＰを用いる染色を行った。組織化学的な茶色／黒色の着色が、Ｍｅｔａｌ　ｅｎｈａｎｃｅｄ　ＤＡＢ　ｓｕｂｓｔｒａｔｅとのインキュベーション後に、得られた。
【０１８４】
結果
薬物動態
本発明者らが分子の半減期を延長したか判定するために、５０ｋＩＵ　ＳＣ注射でのＩＬ２またはＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６の単回注射後に、マウスにおいて薬物動態実験を実施した（図３）。ＩＬ２は、１時間後にＴｍａｘに達するという状況で急速に増加し、その後、１０時間まで非常に急激に低下し、この場合、ＩＬ２はほとんど検出されなかった。他方で、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６はより緩徐に増加し、注射後１時間から４時間の間でＴｍａｘに達した。血漿の濃度の低下もまたより緩徐であり、２４時間目でも分子はなおも検出可であった。この結果が実証するところは、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６は半減期の延長を有し、本設定では約３倍の延長と算出されること、である。このことにより、Ｔｒｅｇに対するＩＬ－２の効果持続期間が延長し、Ｔｒｅｇの増加をより長期にわたり維持できる可能性がある。
【０１８５】
ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６のインビボでのターゲティングの概念実証
本発明者らは、炎症性疾患、乾癬および大腸炎に関する２つのモデルを開発した。
【０１８６】
乾癬を、一方の耳に５％イミキモドクリームの局所適用によって誘導し、この場合、反

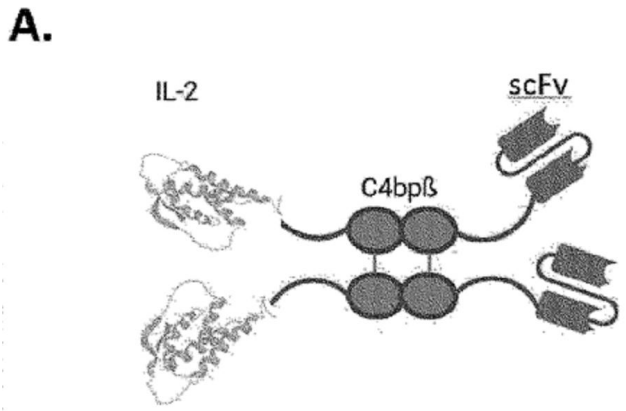
対側の耳を炎症の内部対照として使用し、ワセリンを適用した。これらの条件では、一方の耳は炎症を発生し、この炎症はＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６によって標的とされるはずであるが、これに対して、もう一方の耳は炎症を発生せず、特に標的とされないはずである。簡潔に説明すると、イミキモドおよびワセリンの日毎の適用から６日後にマウスを安楽死させ、耳を取り出し、凍結し、横断切片を行い、蛍光顕微鏡法用にＤＡＰＩおよびＣｙａｎｉｎｅ　５　Ｆｌｕｏｒｏｃｈｒｏｍｅと結合させた抗６Ｘ－ＨｉｓＴａｇで染色した。治療されていない対照マウスは、ワセリン治療耳においてもイミキモド治療耳においてもどちらも６Ｘ－ＨｉｓＴａｇ染色をまったく示さなかったが、本発明者らは、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６をコードするＡＡＶを注射したマウスにおいて、炎症が発生した耳の周囲全体で、本発明者らによる分子の染色を観察した。同じマウスの対照として、ワセリン治療耳ではＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６は検出されなかったが、このことにより、本発明者らによる標的に向けられた分子の炎症組織のインビボでの特異的結合が実証されている。

【０１８７】

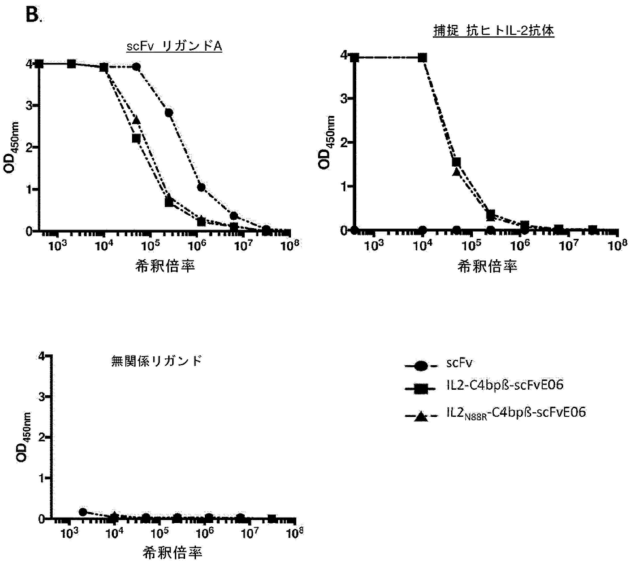
本発明者らはさらに、ＤＳＳ誘導性大腸炎モデルを開発して、様々な条件で本発明者らによる分子について試験した（図４）。大腸炎を誘導するために、３％ＤＳＳを飲料水に６日間添加した。炎症が最大であるとき１０日目に、マウスを安楽死させ、結腸を取り出し、凍結し、横断切片を行い、両方ともＨＲＰに結合させた抗ｈＩＬ２または抗６Ｘ－ＨｉｓＴａｇで染色した。免疫組織化学染色を、Ｍｅｔａｌ　ｅｎｈａｎｃｅ　ＤＡＢ　ｓｕｂｓｔｒａｔｅを使用して実施したが、この場合、分子が見出された場所で黒または暗褐色が発色した。結果として、未治療対照群もＩＬ２治療群もどちらも結腸においてＩＬ２または６Ｘ－ＨｉｓＴａｇの検出を実証することはなかった。しかし、ＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６で治療したマウスが、結腸おいてＩＬ２と６Ｘ－ＨｉｓＴａｇの両方の検出を示したが、このことにより、ここでも、炎症状態におけるＩＬ－２－Ｃ４ｂｐβ－ｓｃＦｖＥ０６のインビボでの特異的結合が実証されている。

【図面】

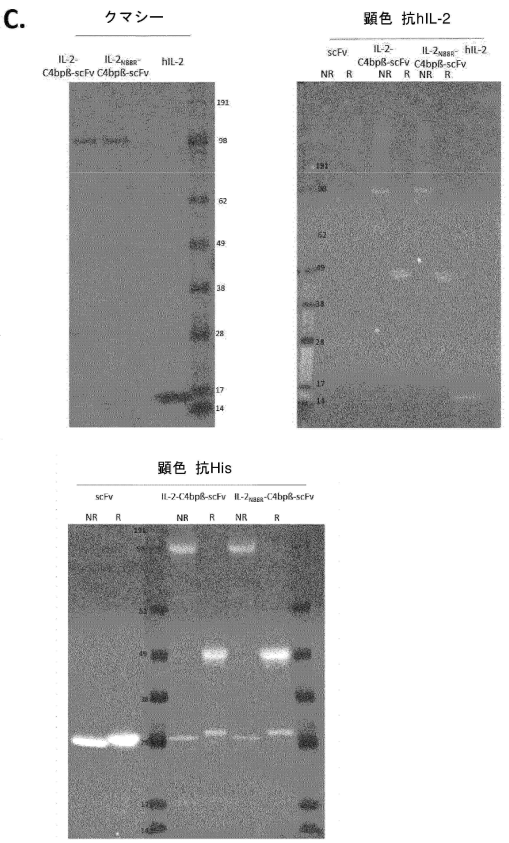
【図１Ａ】



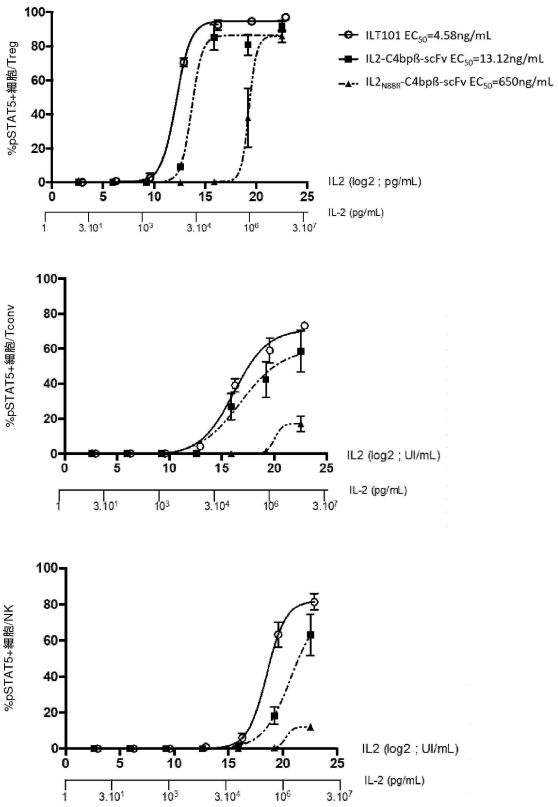
【図１Ｂ】



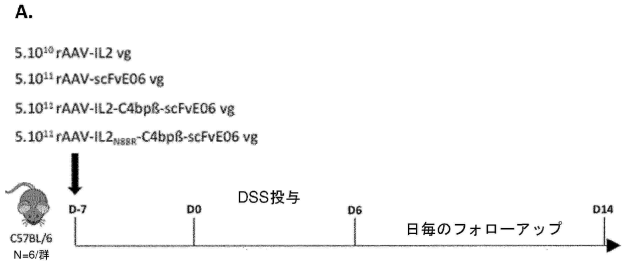
【図１Ｃ】



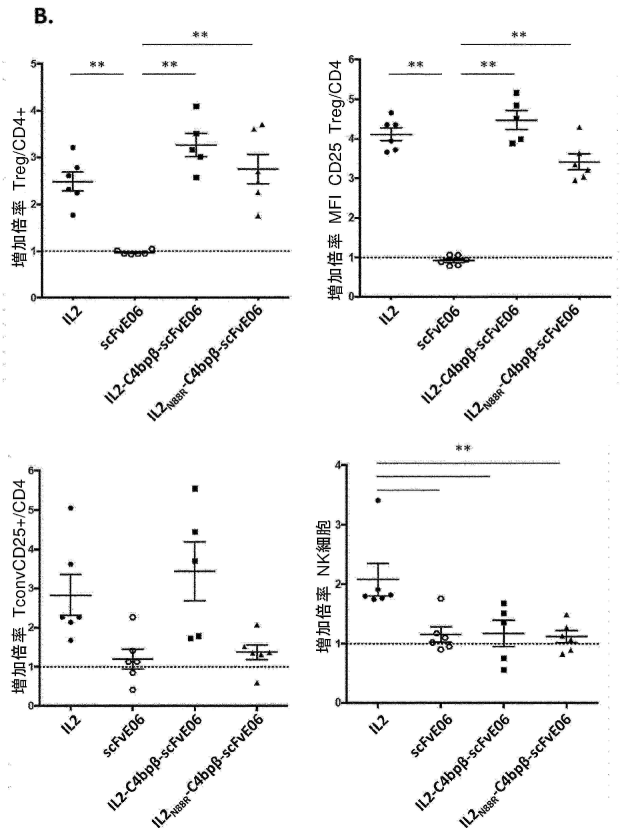
【図１Ｄ】



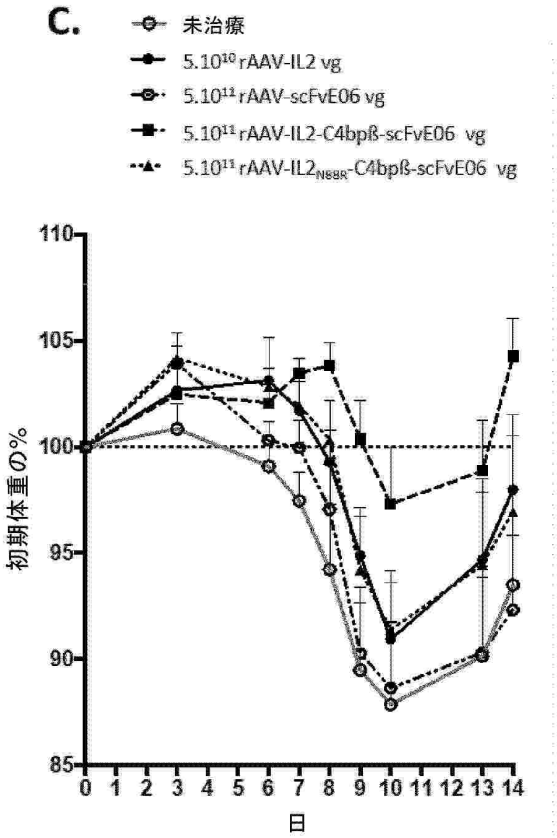
【図２Ａ】



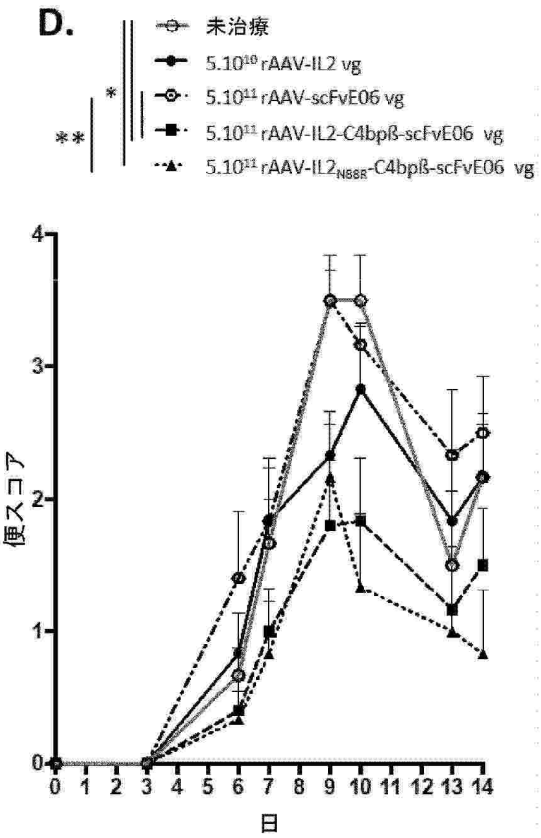
【図２Ｂ】



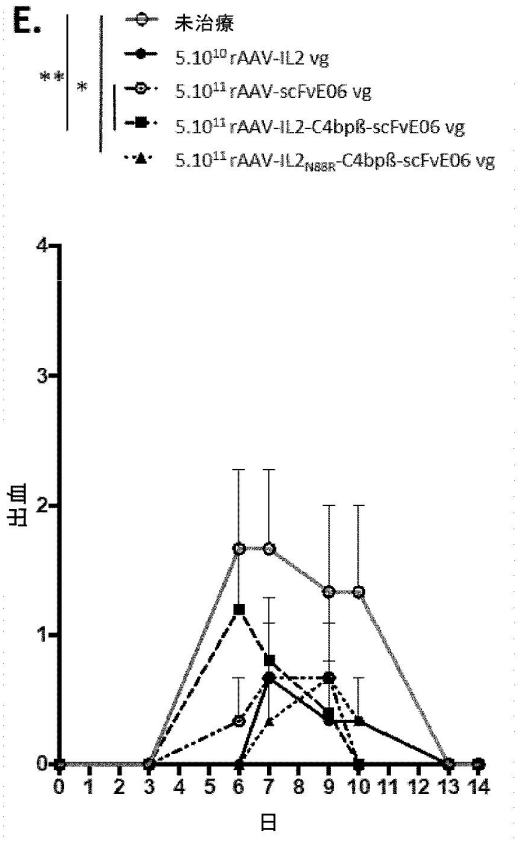
【図２Ｃ】



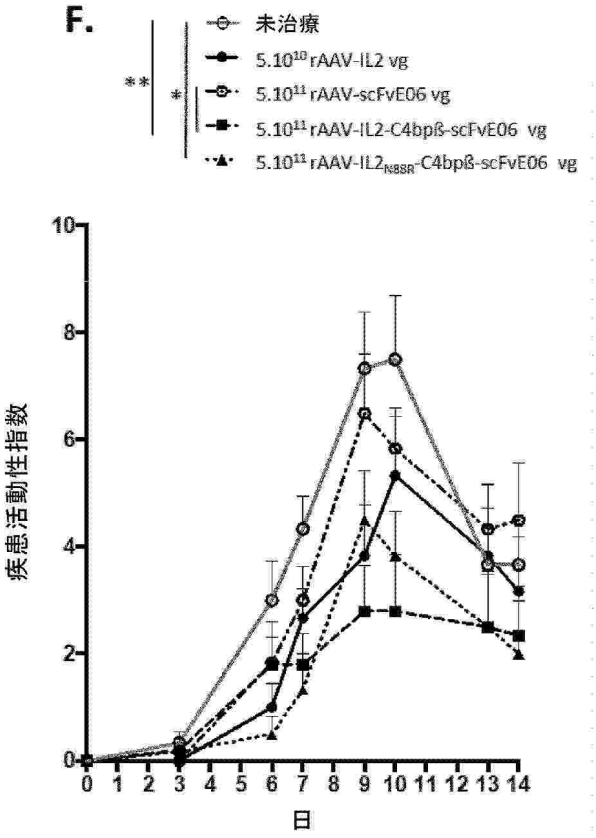
【図２Ｄ】



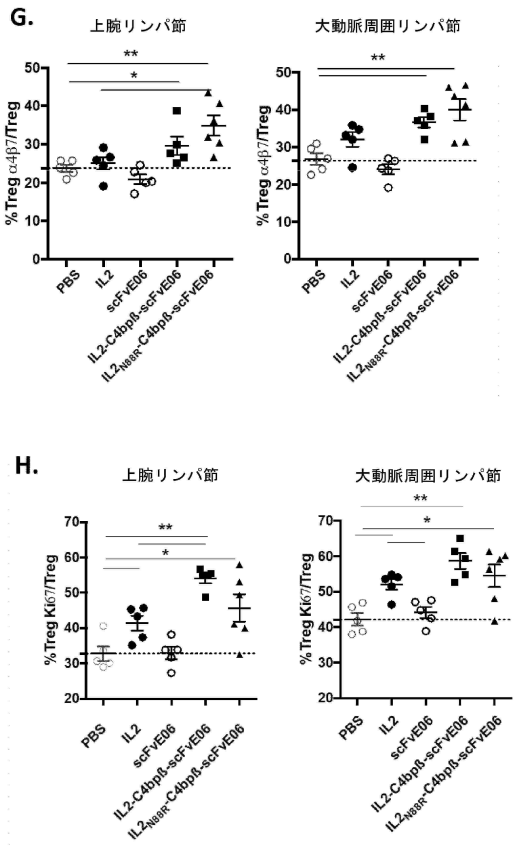
【図２Ｅ】



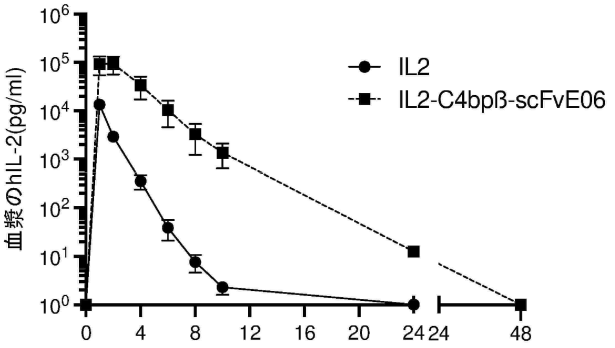
【図２Ｆ】



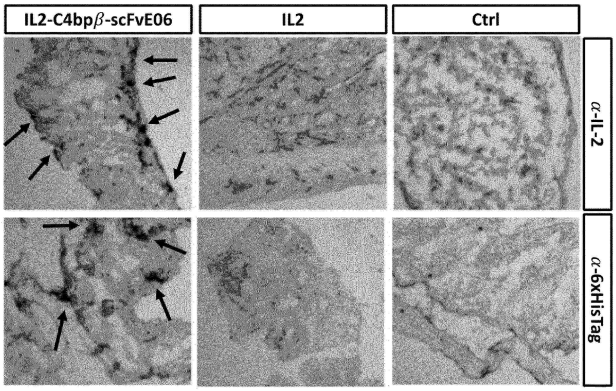
【図２Ｇ－２Ｈ】



【図３】



【図４】



【配列表】

2024533848000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/077847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/00 A61K39/00 A61P29/00 A61P37/06 C07K14/47
C07K14/55 C07K16/18 C07K16/44 C07K16/46 A61K39/39
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)
A61K C07K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, INSPEC, IBM-TDB, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VALEDKARIMI ZAHRA ET AL: "Antibody-cytokine fusion proteins for improving efficacy and safety of cancer therapy", BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, vol. 95, 7 September 2017 (2017-09-07), pages 731-742, XP085226466, ISSN: 0753-3322, DOI: 10.1016/J.BIOPHA.2017.07.160 the whole document Abstract; p. 735, col. 1-p. 737, col. 2 ----- -/--	1-8, 12-15

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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	Date of mailing of the international search report
1 February 2023	13/02/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Madruga, Jaime

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/077847

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/118016 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 13 August 2015 (2015-08-13) the whole document claim 4 claims, claims 37-47; examples; p. 3, lines 15-30; page 19; claim 21, page 35, line 23 to p. 36, line 3; Examples, Fig. 12-24, 37-44; p. 67, lines 23-25; pages 30-31; SEQ ID NO: 9, 11	1-8, 12-15
Y	WO 2020/252421 A2 (CUGENE INC [US]) 17 December 2020 (2020-12-17) the whole document claims; examples claim 3; examples 1, 15	1-8, 12-15
Y	WO 2011/160845 A2 (MEDIRISTA BIOTECHNOLOGIES AB [SE]; FROSTEGAARD JOHAN [SE]) 29 December 2011 (2011-12-29) the whole document pages 1-2; claims; examples	1-8, 12-15
Y	WO 2019/148204 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 1 August 2019 (2019-08-01) the whole document paragraphs [[0007]], [[0031]]; claims paragraphs [[0092]], [[0149]]; claim 3; examples	1-8, 12-15
A	WO 2021/116444 A1 (ILTOO PHARMA [FR]; UNIV SORBONNE [FR] ET AL.) 17 June 2021 (2021-06-17) the whole document claims; examples	1-15

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/077847

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIANMING HUANG ET AL: "Enhancing the potency of a whole-cell breast cancer vaccine in mice with an antibody-IL-2 immunocytokine that targets exposed phosphatidylserine", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 29, no. 29, 21 April 2011 (2011-04-21), pages 4785-4793, XP028382170, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.04.082 [retrieved on 2011-05-04]	1,2,4,5, 7,8, 12-15
Y	the whole document Abstract page 4786, col. 1, para 2; Materials and methods	1,2,4,5, 7,8, 12-15

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/077847

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed.

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/077847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015118016 A1	13-08-2015	AR 099289 A1	13-07-2016
		AU 2015215001 A1	19-05-2016
		AU 2019264579 A1	05-12-2019
		BR 112016018288 A2	10-10-2017
		CA 2931114 A1	13-08-2015
		CL 2016001968 A1	24-02-2017
		CN 105980410 A	28-09-2016
		CN 111423513 A	17-07-2020
		CR 20160333 A	05-09-2016
		DK 3102595 T3	04-02-2019
		EA 201691576 A1	30-12-2016
		EA 201992609 A1	04-03-2020
		EP 3102595 A1	14-12-2016
		EP 3508496 A1	10-07-2019
		ES 2704731 T3	19-03-2019
		HR P20190028 T1	22-02-2019
		HU E041530 T2	28-05-2019
		JP 6306201 B2	04-04-2018
		JP 2017510551 A	13-04-2017
		JP 2018102312 A	05-07-2018
		KR 20160103134 A	31-08-2016
		KR 20190126205 A	08-11-2019
		LT 3102595 T	25-01-2019
		MA 39250 A1	30-03-2018
		MX 370283 B	09-12-2019
		NZ 719654 A	26-06-2020
		PE 20161324 A1	25-11-2016
		PH 12016501406 A1	31-08-2016
		PL 3102595 T3	30-04-2019
		PT 3102595 T	11-01-2019
		SG 11201606369X A	29-09-2016
		SI 3102595 T1	28-02-2019
		TW 201534625 A	16-09-2015
		UA 120847 C2	25-02-2020
		US 2015218260 A1	06-08-2015
		WO 2015118016 A1	13-08-2015
		ZA 201603262 B	30-10-2019
WO 2020252421 A2	17-12-2020	AU 2020292421 A1	27-01-2022
		CA 3143038 A1	17-12-2020
		CN 114728040 A	08-07-2022
		EP 3983001 A2	20-04-2022
		JP 2022536347 A	15-08-2022
		KR 20220035122 A	21-03-2022
		US 2022170028 A1	02-06-2022
		WO 2020252421 A2	17-12-2020
WO 2011160845 A2	29-12-2011	NONE	
WO 2019148204 A1	01-08-2019	AU 2019213045 A1	06-08-2020
		BR 112020015121 A2	05-01-2021
		CA 3089709 A1	01-08-2019
		CN 111868084 A	30-10-2020
		EP 3746478 A1	09-12-2020
		IL 276042 A	31-08-2020
		JP 2021512859 A	20-05-2021
		KR 20200116104 A	08-10-2020
		RU 2020125162 A	02-03-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/077847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SG 11202006770P A	28-08-2020
		US 2021155679 A1	27-05-2021
		WO 2019148204 A1	01-08-2019
WO 2021116444 A1	17-06-2021	AU 2020401357 A1	21-07-2022
		BR 112022011414 A2	30-08-2022
		CA 3159468 A1	17-06-2021
		CN 115190885 A	14-10-2022
		EP 4073094 A1	19-10-2022
		IL 293628 A	01-08-2022
		KR 20220139293 A	14-10-2022
		WO 2021116444 A1	17-06-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20	
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02	
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ｃ０７Ｋ	*14/55*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/55	
Ｃ０７Ｋ	*16/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00	
Ｃ１２Ｎ	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	
Ｃ１２Ｎ	*15/26*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/26	

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

－ ＨＯＰＩＴＡＵＸ ＤＥ ＰＡＲＩＳ
フランス国パリ、ブルヴァール、ディデュロ、５５

(71)出願人 592236234
アンスティテュー・ナシオナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・メディカル・（イ・エヌ・エス・ウ・エール・エム）
ＩＮＳＴＩＴＵＴ ＮＡＴＩＯＮＡＬ ＤＥ ＬＡ ＳＡＮＴＥ ＥＴ ＤＥ ＬＡ ＲＥＣＨＥＲＣＨＥ ＭＥＤＩＣＡＬＥ （Ｉ．Ｎ．Ｓ．Ｅ．Ｒ．Ｍ．）
フランス７５６５４パリ・セデックス１３、リュ・ドゥ・トルビアック１０１番

(74)代理人 100145403
弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100106518
弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911
弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 クラッツマン，ダヴィド
フランス７５０１３パリ、リュ・デュ・タージュ１１

(72)発明者 テドギ，アラン
フランス７５００１パリ、リュ・ドゥ・リヴォリ１３８

(72)発明者 バスケス，トマ
フランス９３１００モントルイユ、アヴニュ・デュ・プレジダン・ヴィルソン１００

(72)発明者 ビリアル，ニコラ
フランス７５０１６パリ、リュ・デ・サブロン２８

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 CC04 CC07 CC41 EE59
4C084 AA02 BA44 DA14 NA13 NA14 ZB071 ZB111
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA04 DA76 EA20 FA74