

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7275049号

(P7275049)

(45)発行日 令和5年5月17日(2023.5.17)

(24)登録日 令和5年5月9日(2023.5.9)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/55 (2006.01)

C 0 7 K 14/55

Z N A

A 6 1 K 38/20 (2006.01)

A 6 1 K 38/20

A 6 1 K 47/60 (2017.01)

A 6 1 K 47/60

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 16 (全159頁)

(21)出願番号 特願2019-562482(P2019-562482)

(73)特許権者 000001029

(86)(22)出願日 平成30年12月27日(2018.12.27)

協和キリン株式会社

(86)国際出願番号 PCT/JP2018/048361

東京都千代田区大手町一丁目9番2号

(87)国際公開番号 WO2019/131964

(74)代理人 110002000

(87)国際公開日 令和1年7月4日(2019.7.4)

弁理士法人栄光事務所

審査請求日 令和3年12月24日(2021.12.24)

(72)発明者 池田 昌弘

(31)優先権主張番号 特願2017-252224(P2017-252224)

東京都千代田区大手町一丁目9番2号

(32)優先日 平成29年12月27日(2017.12.27)

協和キリン株式会社 本社内

(33)優先権主張国・地域又は機関

(72)発明者 山口 新平

日本国(JP)

東京都千代田区大手町一丁目9番2号

協和キリン株式会社 本社内

(72)発明者 村上 真淑

東京都千代田区大手町一丁目9番2号

協和キリン株式会社 本社内

(72)発明者 小野寺 秀幸

東京都千代田区大手町一丁目9番2号

協和キリン株式会社 本社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I L - 2 改変体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1で表されるアミノ酸配列、または配列番号1のアミノ酸配列の125番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列を含む、I n t e r l e u k i n - 2 (以下、I L - 2と略記する)のアミノ酸配列において、少なくとも129番目のアミノ酸残基が、チオール基 (- S H)を有する非天然アミノ酸残基由来の基にP E Gが結合した基、またはアジド基を有する非天然アミノ酸残基由来の基にP E Gが結合した基に置換された、I L - 2改変体。

【請求項2】

前記チオール基 (- S H)を有する非天然アミノ酸残基由来の基にP E Gが結合した基が、システイン残基由来の非天然アミノ酸残基由来の基にP E Gが結合した基であり、
前記アジド基を有する非天然アミノ酸残基由来の基にP E Gが結合した基が、N⁶ - [{ (o - a z i d o b e n z y l) o x y } c a r b o n y l] - L - l y s i n e (o - A z - Z - L y s)残基由来の基にP E Gが結合した基、またはN⁶ - [{ (m - a z i d o b e n z y l) o x y } c a r b o n y l] - L - l y s i n e (m - A z - Z - L y s)残基由来の基にP E Gが結合した基である、請求項1に記載のI L - 2改変体。

【請求項3】

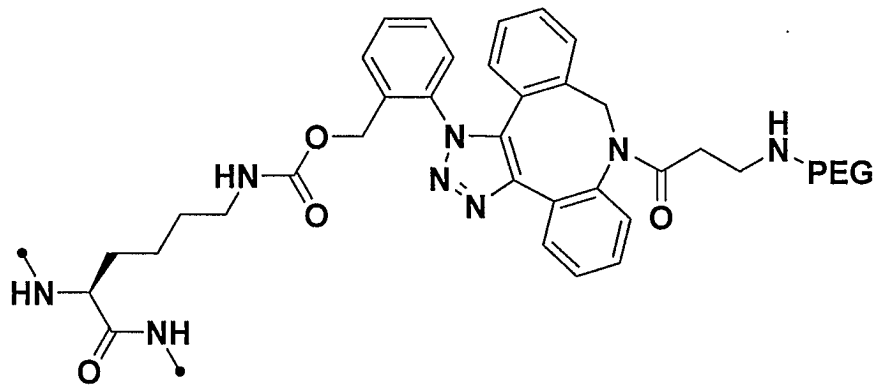
前記N⁶ - [{ (o - a z i d o b e n z y l) o x y } c a r b o n y l] - L - l y s i n e (o - A z - Z - L y s)残基由来の基にP E Gが結合した基が、下記(式11)および/または(式12)で表される構造を有する、請求項2に記載のI L - 2改変

10

20

体。

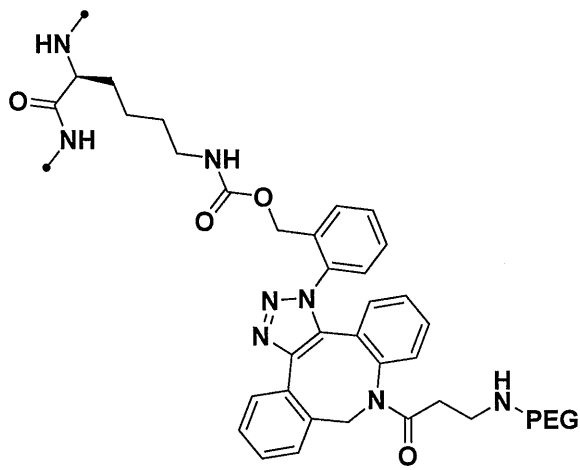
【化 1】



10

(式 1 1)

【化 2】



20

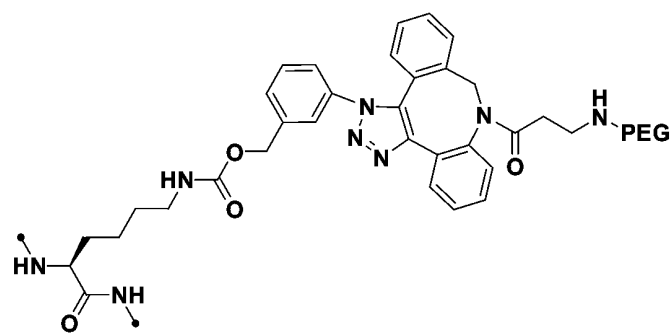
(式 1 2)

【請求項 4】

30

前記 N^6 - [{ (*m*-azidobenzyl) oxy } carbonyl] - L - lysine (*m*-Az-Z-Lys) 残基由来の基に PEG が結合した基が、下記 (式 X 4) および／または (式 X 5) で表される構造を有する、請求項 2 に記載の IL-2 改変体。

【化 3】

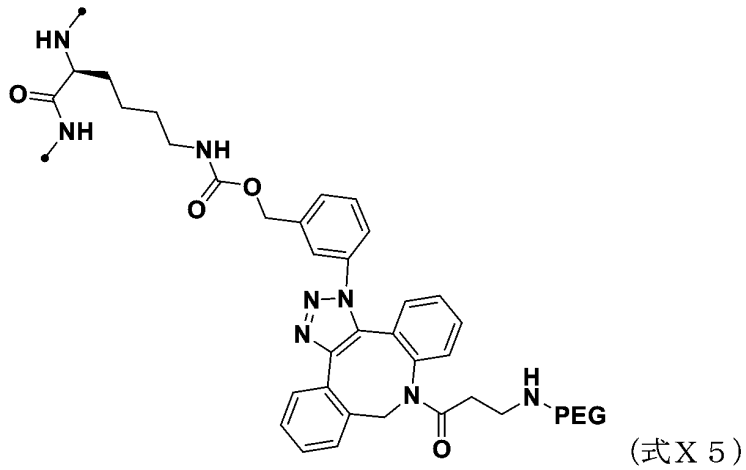


40

(式 X 4)

50

【化 4】



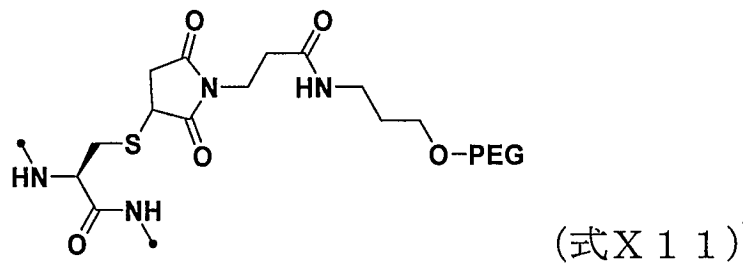
10

【請求項 5】

前記システイン残基由来の非天然アミノ酸残基由来の基に P E G が結合した基が、下記（式 X 1 1）および／または（式 X 1 2）および／または（式 X 1 3）で表される構造を有する、請求項 2 に記載の I L - 2 改変体。

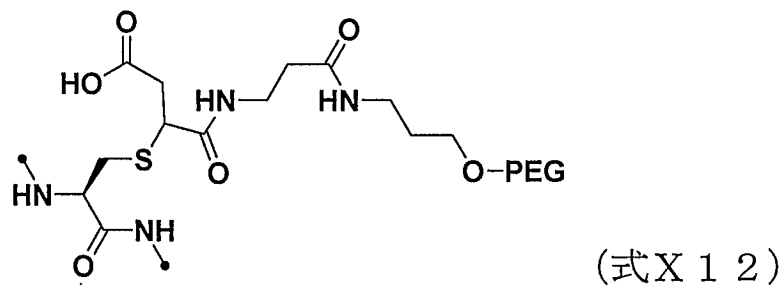
20

【化 5】



30

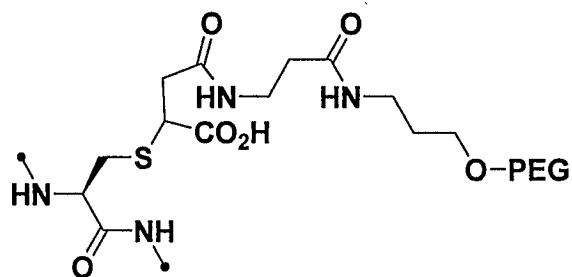
【化 6】



40

50

【化 7】



(式 X 1 3)

10

【請求項 6】

前記 PEG が直鎖状である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の IL-2 改変体。

【請求項 7】

前記 PEG が分岐状である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の IL-2 改変体。

【請求項 8】

前記 PEG が、平均分子量 10 kDa 以上の PEG である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の IL-2 改変体。

【請求項 9】

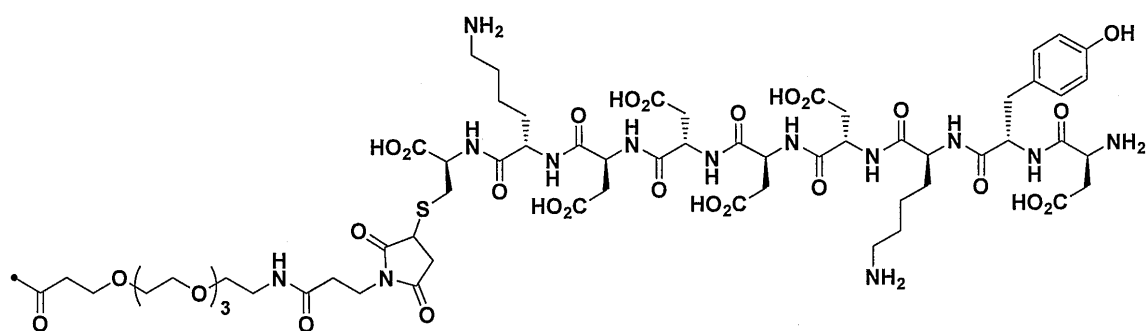
前記 PEG が、平均分子量 10 kDa、20 kDa、30 kDa、40 kDa、50 kDa、60 kDa、70 kDa または 80 kDa の PEG である請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の IL-2 改変体。

20

【請求項 10】

前記 PEG が、下記 (式 13)、(式 14)、(式 15)、(式 16)、(式 X7)、(式 X8)、(式 X9)、(式 X10)、(式 X11)、(式 X13)、(式 X14) または (式 X15) の少なくとも 1 つの式で表される構造を有する、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の IL-2 改変体。

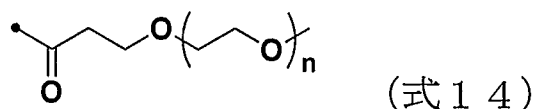
【化 8】



(式 13)

30

【化 9】

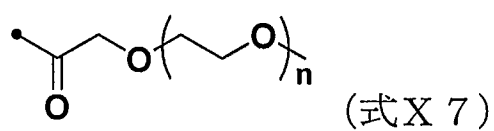


(式 14)

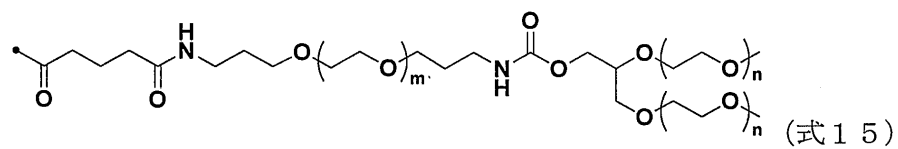
40

50

【化 1 0】

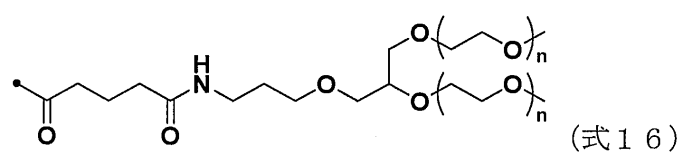


【化 1 1】



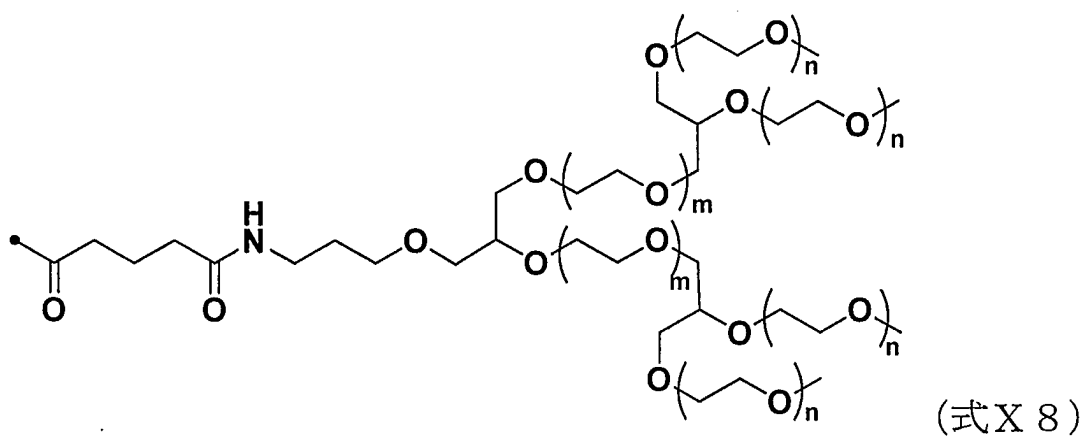
10

【化 1 2】



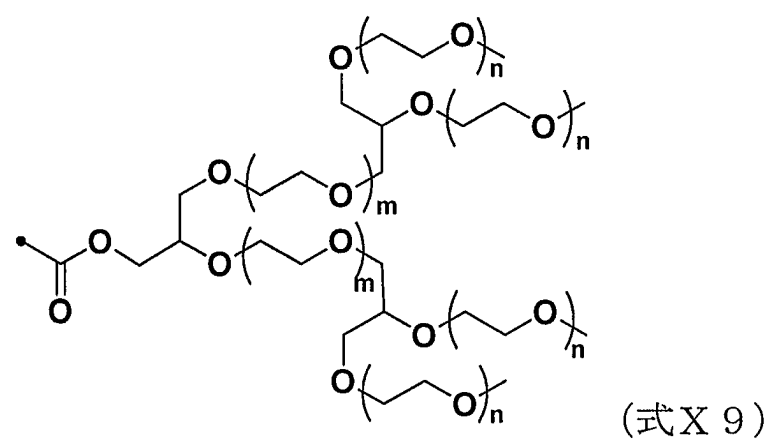
20

【化 1 3】



30

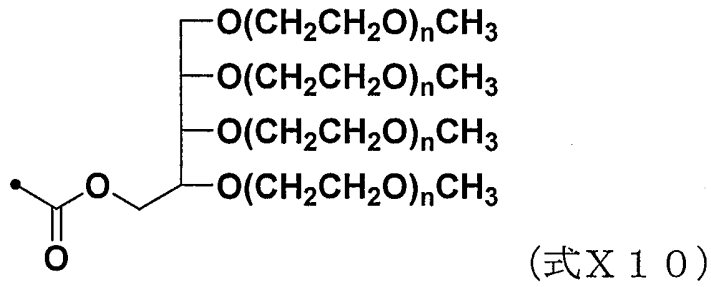
【化 1 4】



40

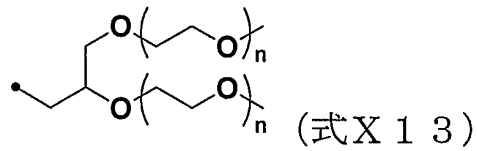
50

【化 1 5】

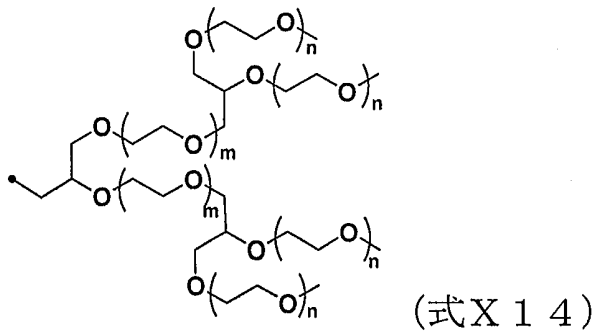


10

【化 1 6】

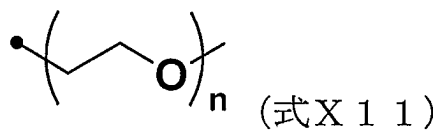


【化 1 7】



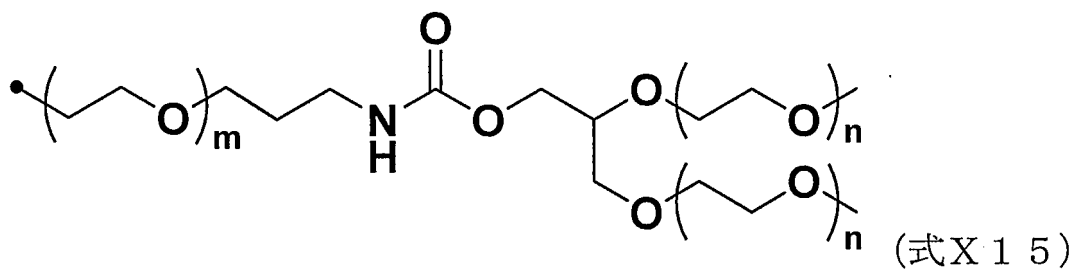
20

【化 1 8】



30

【化 1 9】



40

【請求項 1 1】

前記 I L - 2 の N 末端にさらにメチオニン残基が結合している、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の I L - 2 改変体。

【請求項 1 2】

50

前記 I L - 2 の N 末端のアラニンが欠損している、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の I L - 2 改変体。

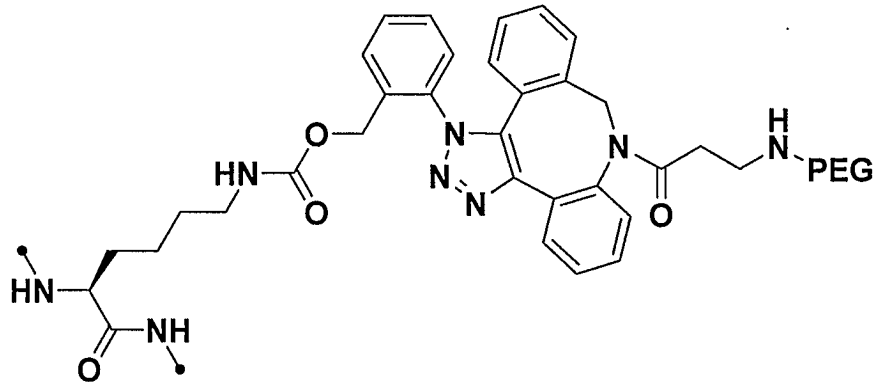
【請求項 1 3】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 2 5 番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列を含む、I L - 2 のアミノ酸配列において、1 2 9 番目のアミノ酸残基が、下記（式 1 1）または（式 1 2）で表される構造を有する基に置換され、

前記（式 1 1）および（式 1 2）で表される構造における P E G は 8 0 k D a の平均分子量を有し、且つ下記（式 1 6）または（式 X 9）で表される構造を含み、かつ前記 I L - 2 のアミノ酸配列の N 末端のアラニンが欠損している I L - 2 改変体。

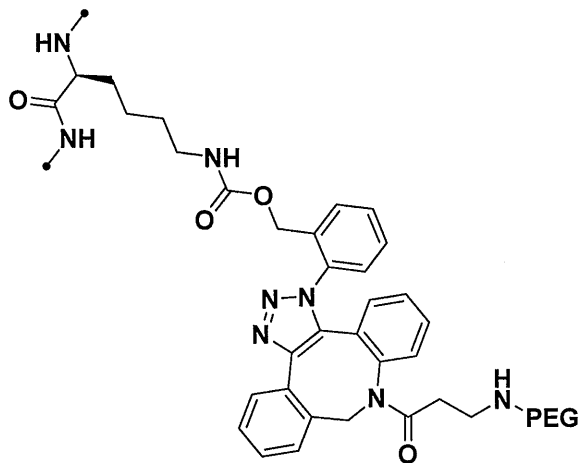
10

【化 2 0】



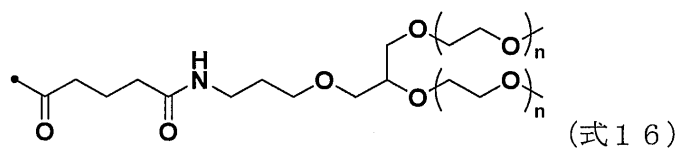
20

【化 2 1】



30

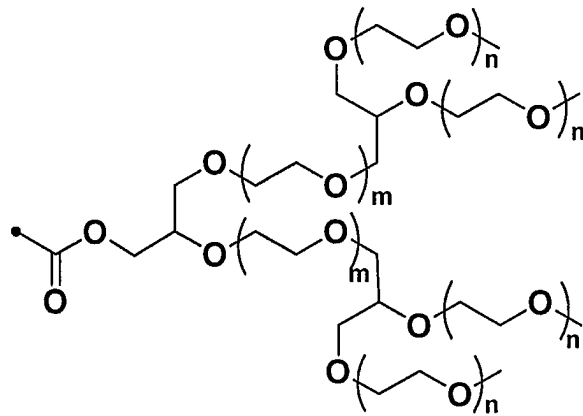
【化 2 2】



40

50

【化 2 3】



(式 X 9)

【請求項 1 4】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 2 5 番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列を含む、IL-2 のアミノ酸配列において、1 2 および 9 1 番目のアミノ酸残基は糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換され、且つ 3 番目のアミノ酸残基は P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換され、

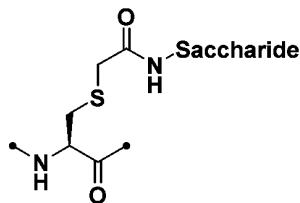
前記糖鎖が結合したシステイン残基由来の基は下記（式 1）で表される構造を有し、

前記糖鎖は下記（式 8）で表される構造を有し、

前記 P E G が結合したシステイン残基由来の基は下記（式 X 4）、または（式 X 5）、（式 X 6）若しくは（式 X 7）であって、

前記 P E G は平均分子量が 5 0 k D a であり、且つ下記（式 X 1 5）で表される、IL-2 改変体。

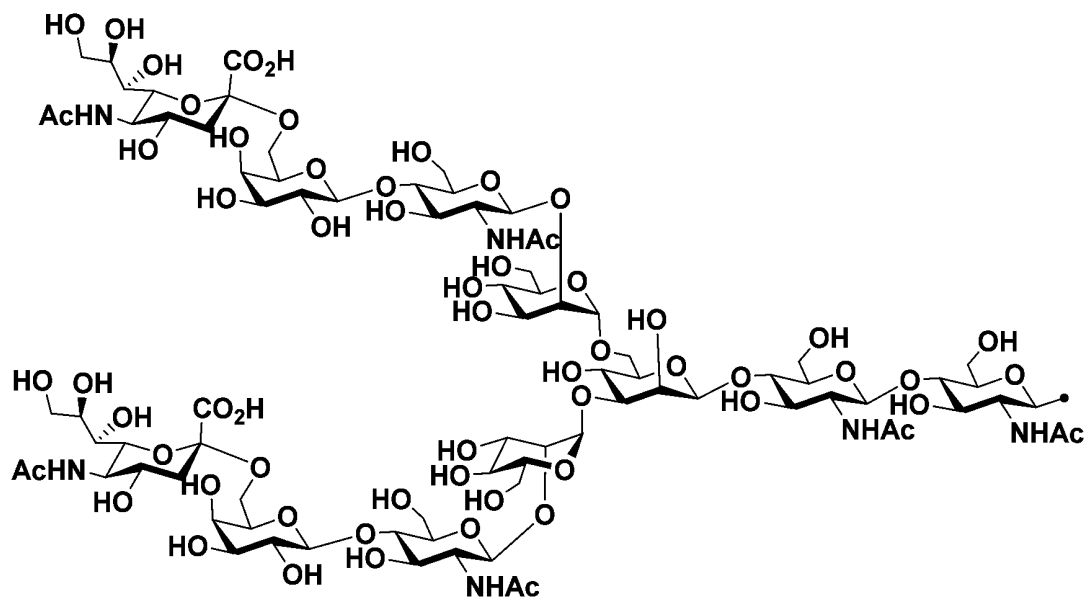
【化 2 4】



(式 1)

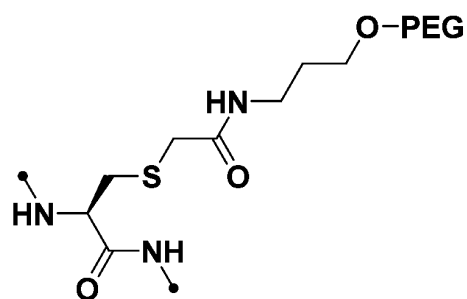
[(式 1) 中、S a c c h a r i d e は糖鎖示す。]

【化 2 5】



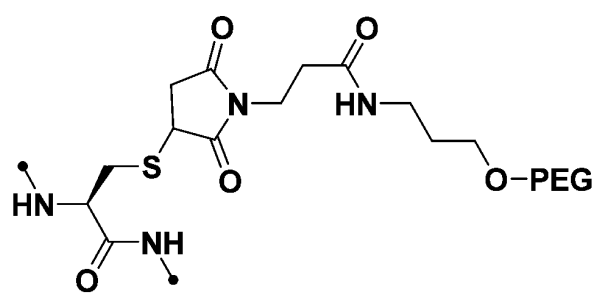
(式 8)

【化 2 6】



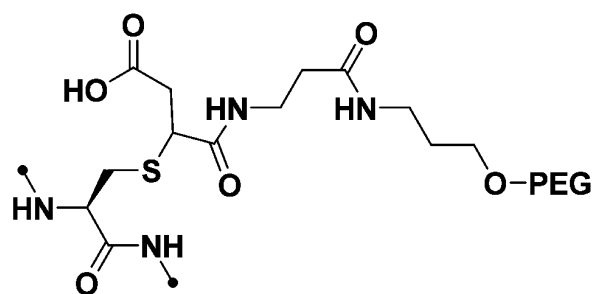
(式 X 4)

【化 2 7】



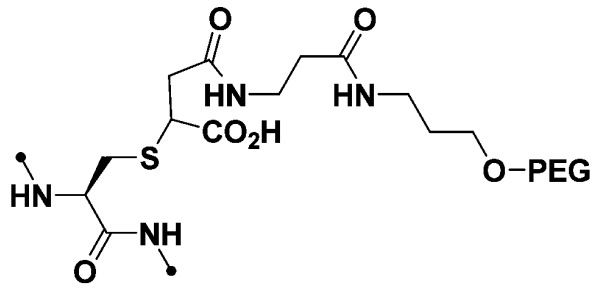
(式 X 5)

【化 2 8】



(式 X 6)

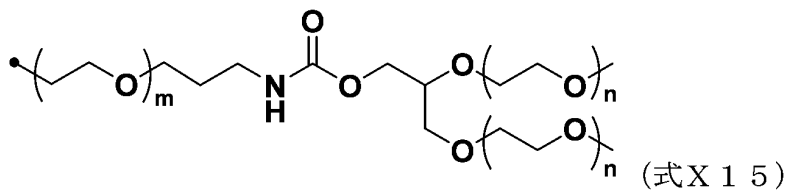
【化 2 9】



(式 X 7)

10

【化 3 0】



(式 X 1 5)

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の IL-2 改変体の製造方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の IL-2 改変体を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IL-2 改変体、該 IL-2 改変体の製造方法、該 IL-2 改変体を含む組成物および治療剤、IL-2 R α サブユニットに対する IL-2 の親和性を向上させる方法、IL-2 R β および γ サブユニットの少なくともいずれか 1 つに対する IL-2 の親和性を低下させる方法、並びに制御性 T 細胞を選択的に活性化させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

制御性 T 細胞 (Treg) は転写因子 Foxp3 (forkhead box P3) を発現することを特徴とする CD4 陽性 T 細胞サブセットである。Treg は IL-10 や TGF- β など抑制性サイトカインの産生、パーフォリンやグランザイムなど細胞傷害性タンパク質を介した細胞溶解、CTLA-4 を介した抗原提示細胞の機能調節、IL-2 の利用競合による枯渇など多様なメカニズムによってエフェクター T 細胞 (Teff) の活性化を阻害し、過剰な免疫応答を負に制御している (非特許文献 1)。

【0003】

Foxp3 の変異による Treg の欠損は重篤な全身性の自己免疫反応を呈する IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群を発症する。また、複数の自己免疫疾患において Treg の量や質が低下していることから、Treg を介した免疫制御の破綻が病態発症に寄与していると考えられる (非特許文献 2、非特許文献 3)。

【0004】

IL-2 (Interleukin-2) は主に活性化 T 細胞から産生されるサイトカインであり、様々な免疫細胞の増殖および活性化に寄与する。ヒトにおける成熟体の分子量は約 15 kDa (133 残基) であり、4 つの α -ヘリックスから構成される four-helix bundle 構造を有している (非特許文献 4)。

【0005】

20

30

40

50

IL-2受容体(IL-2R)はCD25(IL-2R α)、CD122(IL-2R β)、CD132(γ_c)の3つの分子から構成されており、IL-2に対して中親和性(K_D 10^{-9} M)を示すヘテロダイマー型受容体(IL-2R $\beta\gamma$)か、高親和性(K_D 10^{-11} M)を示すヘテロトライマー型受容体(IL-2R $\alpha\beta\gamma$)が形成された場合にシグナルを伝達する。CD25はそれ単体でもIL-2と低親和性(K_D 10^{-8} M)で結合するが、シグナルを伝達することは出来ない(非特許文献5)。

【0006】

IL-2Rの発現パターンは免疫細胞ごとに異なる。CD56^{low} NK細胞やナイーブT細胞ではCD25の発現は非常に低く、IL-2RはIL-2R $\beta\gamma$ として機能している。一方、TregやCD56^{high} NK細胞ではCD25が発現しており、IL-2RはIL-2R $\alpha\beta\gamma$ として機能する(非特許文献6)。

10

【0007】

IL-2とIL-2R $\alpha\beta\gamma$ の結合では、IL-2は初めにCD25に結合した後に、CD122、CD132と順次結合していくことでIL-2Rの三量体化を引き起こす。IL-2によるCD122とCD132の二量体化はCD122細胞内領域へのJAK1のリクルートおよびCD132細胞内領域へのJAK3のリクルートを促し、次いでSTAT5のリン酸化を引き起こす。リン酸化STAT5(pSTAT5)は二量体を形成した後に核内に移行し、標的遺伝子の転写を促す(非特許文献7、非特許文献8)。

【0008】

IL-2シグナルはTregの恒常性維持において重要な役割を担っている。IL-2刺激によって生じるpSTAT5は直接的にFoxp3の発現を促すことで、Tregの増殖促進、安定化およびTeffの活性化抑制機能を向上させる。Tregは高親和性受容体であるIL-2R $\alpha\beta\gamma$ を発現していることに加え、IL-2シグナルを正に制御するProtein phosphatase 1(PP)1およびPP2A活性が高いため、IL-2刺激によるTregのSTAT5のリン酸化やその下流の遺伝子発現は、メモリーT細胞のそれよりも10~100倍程度低い濃度域で引き起こされる(非特許文献6、非特許文献9)。

20

【0009】

IL-2遺伝子やIL-2R遺伝子を欠損したマウスでは、Tregの減少と重篤な自己免疫反応を呈する。ヒトにおいても同様に、CD25遺伝子の欠損は自己反応性T細胞の増殖やIPEX症候群と類似の症状を呈する。SLE(systemic lupus erythematosus)患者やI型糖尿病患者では、T細胞によるIL-2産生能の低下と、それに伴ったTregの減少が認められる(非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12)。

30

【0010】

IL-2シグナルの活性化はTreg機能を増強する。SLE様の症状を呈するMRL/lprマウスへのIL-2の投与は、炎症反応を抑制し病態を改善する。また、GVHD(graft-versus-host disease)患者やSLE患者へのIL-2の投与はTregの増幅を促し、病態を改善する(非特許文献13、非特許文献14、非特許文献15)。

40

【0011】

しかし、野生型IL-2の投与はしばしばNK細胞や好酸球の増加を引き起こし、投与部位反応や発熱およびインフルエンザ様症状などを引き起こす。また、IL-2の血中半減期は約1時間と非常に短いことから、低用量IL-2療法では、IL-2を連日投与する必要がある(非特許文献14、非特許文献15、非特許文献16)。

【0012】

上記の課題解決に向けて、Tregを選択的に活性化し、且つ血中半減期が延長されたIL-2改変体の創製が試みられている。

【0013】

IL-2のIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 選択性を向上させる試みが行われている。一手法では、IL

50

－ 2 R β γ と相互作用するアミノ酸残基に変異を導入したり、抗 IL－2 抗体と免疫複合体を形成させたりする手法が試みられている（特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3、特許文献 4、特許文献 5、特許文献 6、非特許文献 17）。

【0014】

しかし、アミノ酸変異の導入は変異に起因した免疫原性増加が生じる。アミノ酸変異を施したヒト IL－2 改変体のカニクイザルへの投与は、抗薬物抗体が産生されている。抗 IL－2 抗体による IL－2 への IL－2 R α β γ 選択性の付与は、ベルシェイプ様の活性となる（特許文献 2、特許文献 6）。

【0015】

IL－2 の血中半減期を向上させる試みが行われている。一手法では、抗体由来 Fc 配列を付加する手法が試みられている（特許文献 2、特許文献 4、特許文献 7、非特許文献 18）。他の手法では、ポリエチレングリコール（PEG）などの非毒性水溶性ポリマーを付加する方法が知られている。（特許文献 8、特許文献 9、特許文献 10、特許文献 11、非特許文献 19、非特許文献 20）。また、糖鎖を導入する手法も試みられている（特許文献 12、特許文献 13、特許文献 14）。

【0016】

しかし、IL－2 のポリエチレングリコールによる修飾は、生物活性の低下が生じる（非特許文献 19）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【文献】国際公開第 2010/085495 号

国際公開第 2014/153111 号

米国特許出願公開第 2015/037478 号明細書

米国特許第 7186804 号明細書

国際公開第 2014/028748 号

国際公開第 2015/109212 号

米国特許出願公開第 2017/0051029 号明細書

国際公開第 2016/025385 号

日本国特開 2016-202187 号公報

米国特許第 4902502 号明細書

米国特許第 5206344 号明細書

米国特許第 5153310 号明細書

米国特許第 5312903 号明細書

米国特許第 5417970 号明細書

【非特許文献】

【0018】

【文献】Front Immunol, 2013. 4(378)

Nat Rev Immunol, 2014. 14(5):343-349

Autoimmun Rev, 2015. 14(2):105-116

Annu Rev Immunol, 2008. 26:453-479

Immunity, 2013. 38(1):13-25

Diabetes, 2015. 64(6):2172-2183

J Biol Chem, 1997. 272(50):31821-31828

Nat Rev Immunol. 2012 Feb 17;12(3):180-90

Nat Rev Immunol. 2015 May;15(5):283-94

Proc Natl Acad Sci USA, 1997. 94(7):3168-3171

N Engl J Med, 2011. 365(22):2110-2121

Curr Diab Rep, 2014. 14(12):553

J Immunol, 2014. 193(5):2168-2177

10

20

30

40

50

N Engl J Med, 2011. 365(22):2055-2066

Ann Rheum Dis, 2015. 74(4):791-792

Blood. 2014 Dec 4;124(24):3572-6.

Curr Pharm Des, 2002. 8(24):2171-83

J Autoimmun, 2015. 56:66-80

【文献】 American College of Rheumatology Annual Meeting, San Diego, CA, 2017. Poster Abstract 2715: NKTR-358: A Selective, First-in-Class IL-2 Pathway Agonist Which Increases Number and Suppressive Function of Regulatory T Cells for the Treatment of Immune Inflammatory Disorders, Langowski, J., et al. http://www.nektar.com/application/files/6315/1001/4171/NKTR-358_2017ACR_ABS2715.pdf

10

Biotechnology (N Y), 1990. 8(4):343-346

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明は、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ に対する選択性が向上し、且つTregを選択的に活性化す
る新規なIL-2改変体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0020】

上記課題を鋭意検討した結果、本発明者らは、IL-2に糖鎖またはPEGを結合させ
ることにより改変したIL-2改変体により、上記課題を解決できることを見出し、本発
明を完成させた。

20

【0021】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) Interleukin-2 (以下、IL-2と略記する) 改変体。

(2) 糖鎖が結合したIL-2改変体および／またはポリエチレングリコール (PEG)
が結合したIL-2改変体である(1)に記載のIL-2改変体。

(3) IL-2受容体(以下IL-2R) $\alpha\beta\gamma$ に対する選択性が向上している、(1)ま
たは(2)に記載のIL-2改変体。

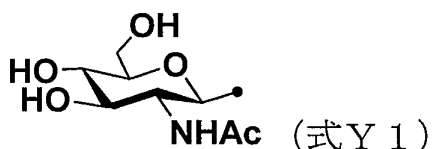
(4) IL-2のアミノ酸配列における、11、12、13、15、16、18、19、
20、84、87、88、91、92、108、115、119、122、123および
130番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基に糖鎖
が結合している、(2)または(3)に記載のIL-2改変体。

30

(5) 糖鎖が下記(式4)～(式8)、(式Y1)、(式Y2)または(式Y3)で表さ
れる構造を有する糖鎖より選ばれる少なくとも1つである、(2)～(4)のいずれか1
に記載のIL-2改変体。

【0022】

【化1】

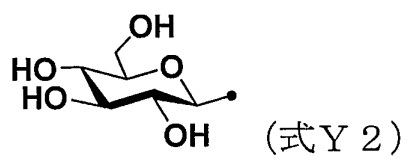


40

【0023】

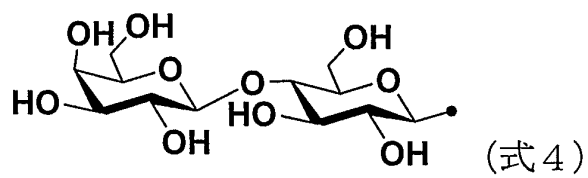
50

【化 2】



【 0 0 2 4】

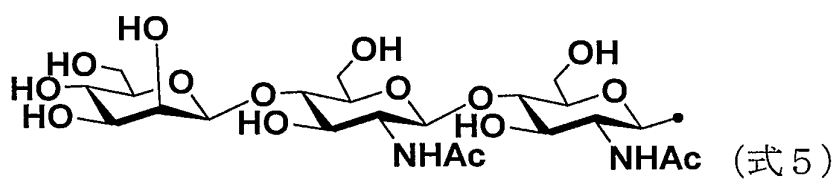
【化 3】



10

【 0 0 2 5】

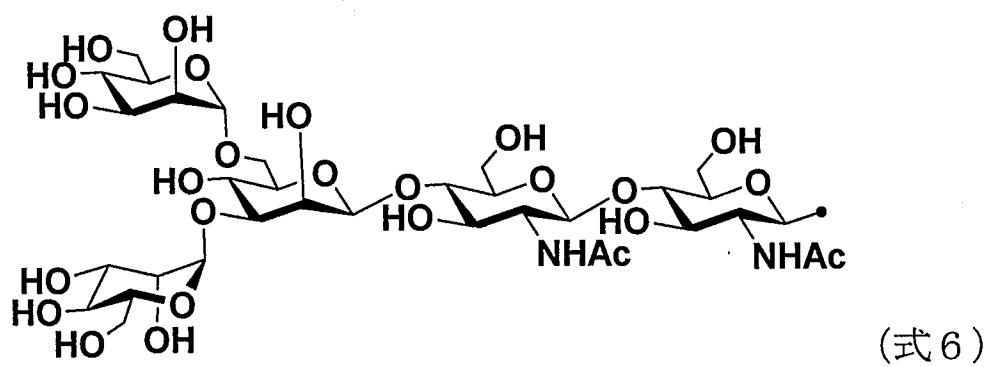
【化 4】



20

【 0 0 2 6】

【化 5】



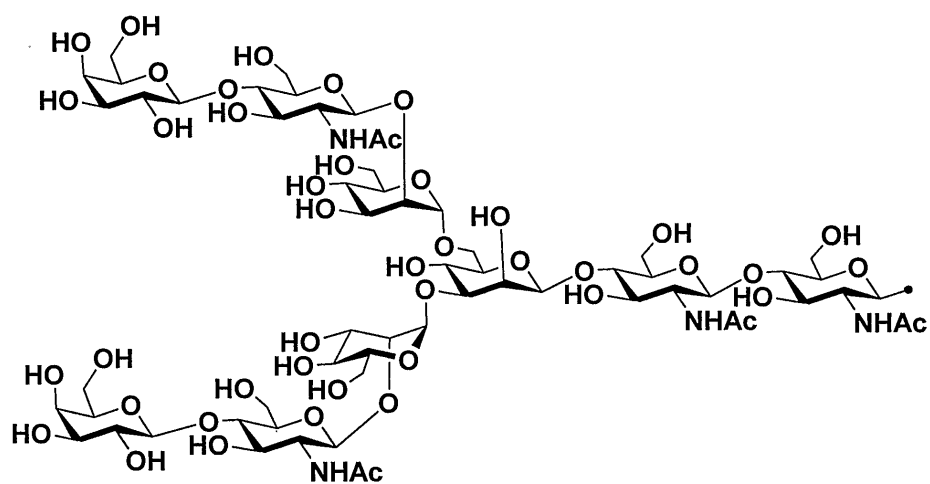
30

40

【 0 0 2 7】

50

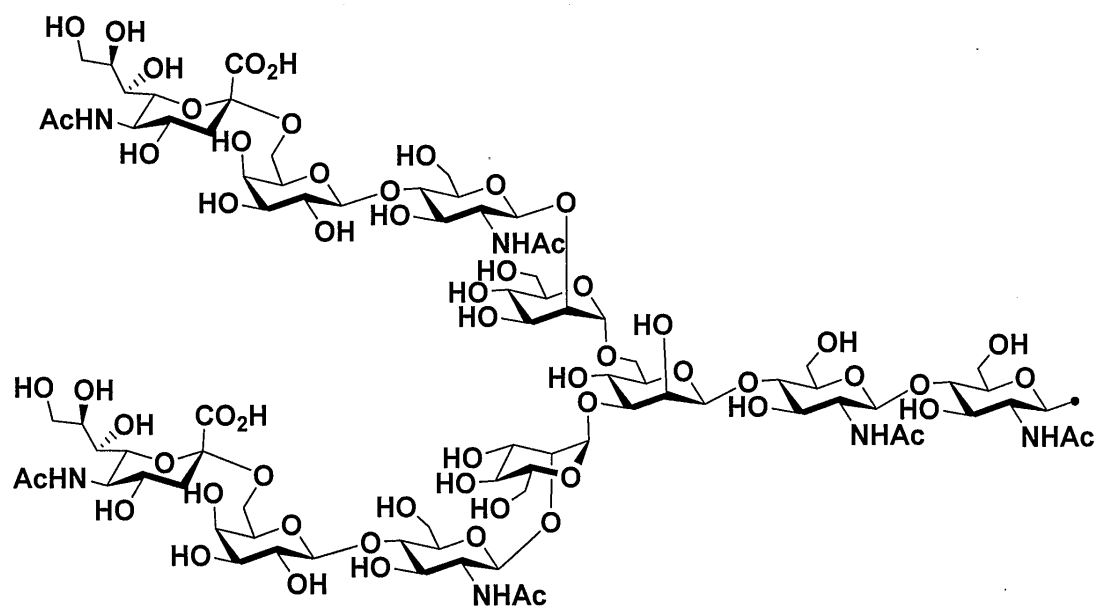
【化 6】



(式 7)

【 0 0 2 8 】

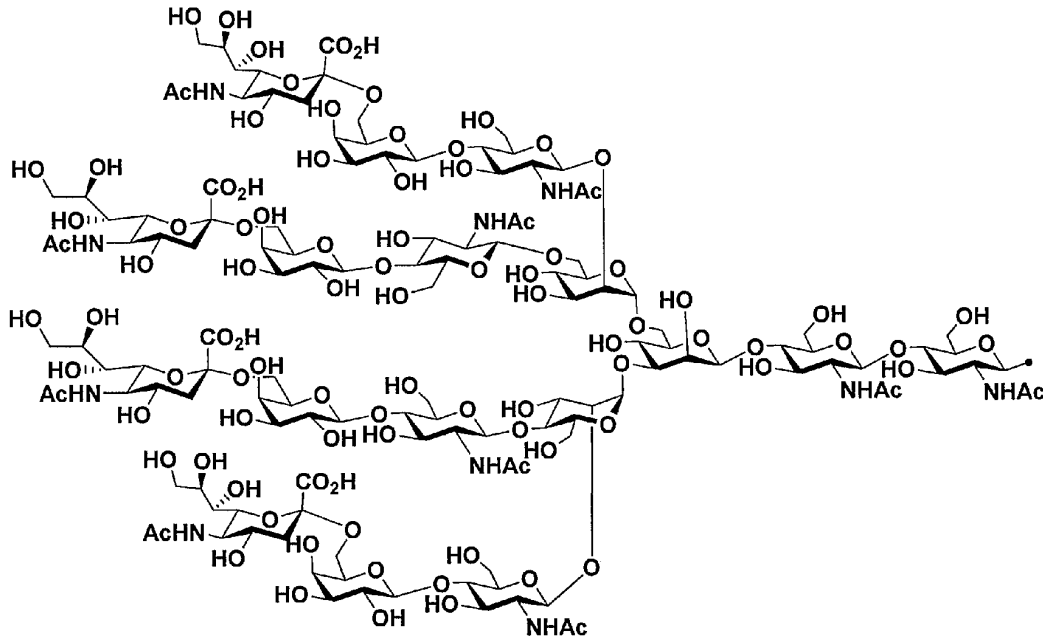
【化 7】



(式 8)

【 0 0 2 9 】

【化 8】



(式 Y 3)

【0030】

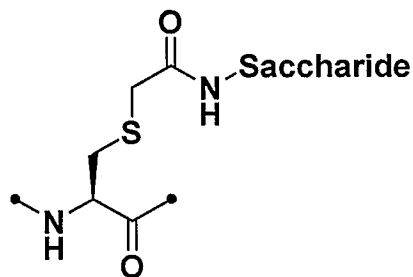
(6) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、11、12、13、15、16、18、19、20、84、87、88、91、92、108、115、119、122、123 および 130 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含む、(2) ~ (5) のいずれか 1 に記載の IL-2 変体。

(7) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、12、15、16、19、88、91 および 119 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含む、(2) ~ (6) のいずれか 1 に記載の IL-2 変体。

(8) 糖鎖が結合したシステイン残基由来の基が、下記 (式 1) で表される構造を有する、(6) または (7) に記載の IL-2 変体。

【0031】

【化 9】



(式 1)

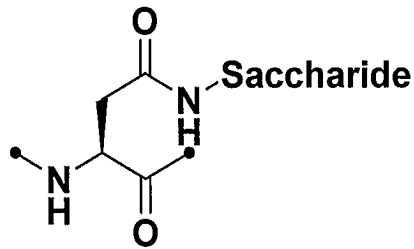
【0032】

〔（式１）中、S a c c h a r i d eは糖鎖示す。〕

（９）糖鎖が結合したアスパラギン残基由来の基が、下記（式２）で表される構造を有する、（６）または（７）に記載のＩＬ－２改変体。

【００３３】

【化１０】



（式２）

10

【００３４】

〔（式２）中、S a c c h a r i d eは糖鎖を示す。〕

（１０）糖鎖が結合したＩＬ－２改変体にさらにＰＥＧが結合したＩＬ－２改変体である、（２）～（９）のいずれか１に記載のＩＬ－２改変体。

（１１）配列番号１で表されるアミノ酸配列、または配列番号１で表されるアミノ酸配列の１２５番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、１、３、５１および７８番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が、ＰＥＧが結合したアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を含む、（２）～（１０）のいずれか１に記載のＩＬ－２改変体。

20

（１２）ＩＬ－２のアミノ酸配列における、４、５、６、７、８、６０、７８、７９、９９、１００、１０１および１２９番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基にＰＥＧが結合している、（２）または（３）に記載のＩＬ－２改変体。

（１３）配列番号１で表されるアミノ酸配列、または配列番号１のアミノ酸配列の１２５番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、４、５、６、７、８、６０、７８、７９、９９、１００、１０１および１２９番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が、ＰＥＧが結合したアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を含む、（２）、（３）および（１２）のいずれか１に記載のＩＬ－２改変体。

30

（１４）配列番号１で表されるアミノ酸配列、または配列番号１で表されるアミノ酸配列の１２５番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における４、５、８、７８および１２９番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が、ＰＥＧが結合しているアミノ酸残基に置換されている、（２）、（３）、（１２）および（１３）のいずれか１に記載のＩＬ－２改変体。

（１５）配列番号１で表されるアミノ酸配列、または配列番号１で表されるアミノ酸配列の１２５番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における４、５、８、７８および１２９番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも２つのアミノ酸残基が、ＰＥＧが結合しているアミノ酸残基に置換されている、（２）、（３）、（１２）～（１４）のいずれか１に記載のＩＬ－２改変体。

40

（１６）配列番号１で表されるアミノ酸配列、または配列番号１で表されるアミノ酸配列の１２５番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、４、５および８番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基、ならびに、７８番目または１２９番目のアミノ酸残基が、ＰＥＧが結合しているアミノ酸残基に置換されている、（２）、（３）、（１２）～（１５）のいずれか１に記載のＩＬ－２改変体。

（１７）ＰＥＧが結合したアミノ酸残基が、ＰＥＧが結合した非天然アミノ酸残基である

50

、(2)、(3)、(12)～(16)のいずれか1に記載のIL-2改変体。

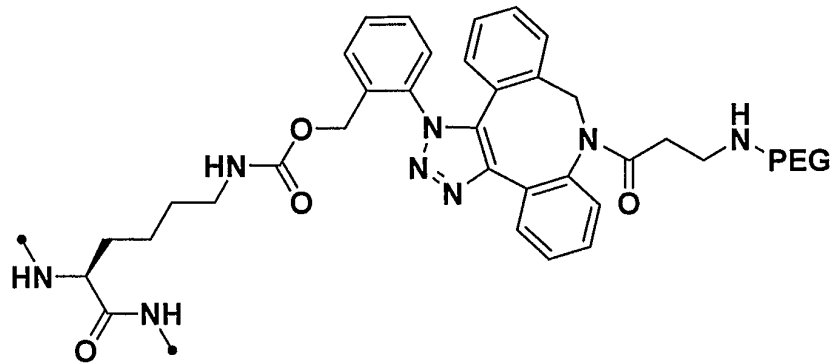
(18) PEGが結合した非天然アミノ酸残基が、PEGが結合したチオール基(−SH)を有するアミノ酸残基由来の基、またはPEGが結合したアジド基を有するアミノ酸残基由来の基である、(17)に記載のIL-2改変体。

(19) PEGが結合した非天然アミノ酸残基が、 N^6 -[{(o-azidobenzyl)oxy} carbonyl]-L-lysine (o-Az-Z-Lys) 残基由来の基、 N^6 -[{(m-azidobenzyl)oxy} carbonyl]-L-lysine (m-Az-Z-Lys) 残基由来の基またはシステイン残基由来の基である、(17)または(18)に記載のIL-2改変体。

(20) PEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基が、下記(式11)および/または(式12)で表される構造を有する、(19)に記載のIL-2改変体。

【0035】

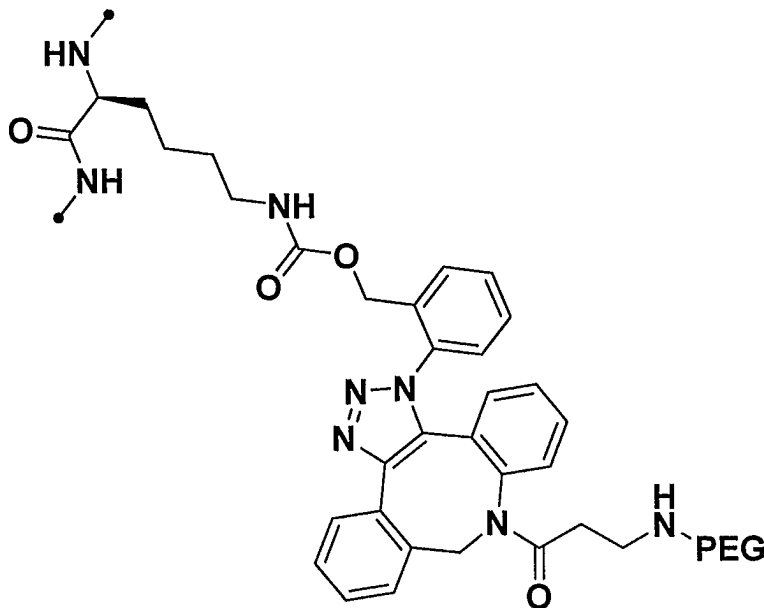
【化11】



(式11)

【0036】

【化12】



(式12)

【0037】

(21) PEGが結合したm-Az-Z-Lys残基由来の基が、下記(式X4)および/または(式X5)で表される構造を有する、(19)に記載のIL-2改変体。

【0038】

10

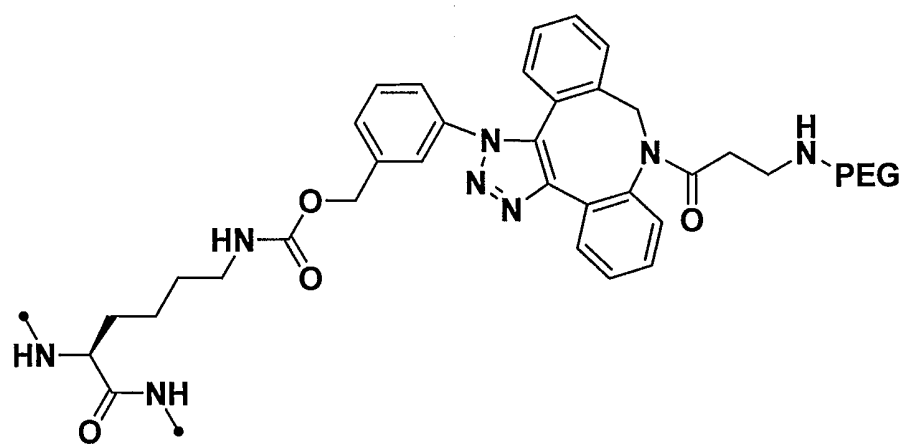
20

30

40

50

【化 1 3】

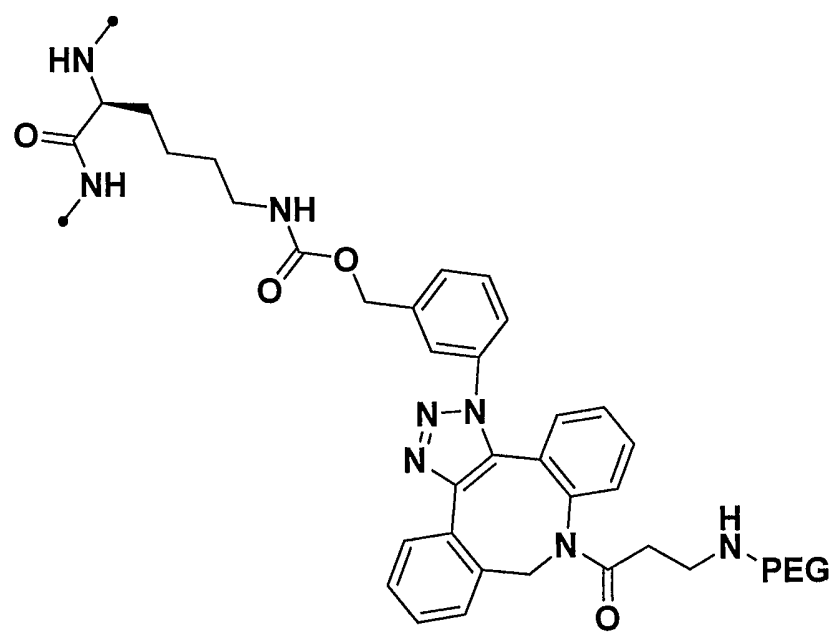


10

(式 X 4)

【 0 0 3 9】

【化 1 4】



20

30

(式 X 5)

【 0 0 4 0】

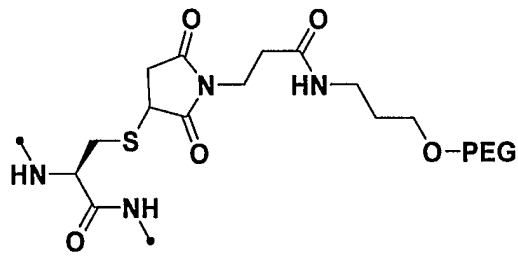
(2 2) P E G が結合したシステイン残基由来の基が、下記 (式 X 1 1) および/または (式 X 1 2) および/または (式 X 1 3) で表される構造を有する、(1 9) に記載の I L - 2 改変体。

40

【 0 0 4 1】

50

【化 1 5】

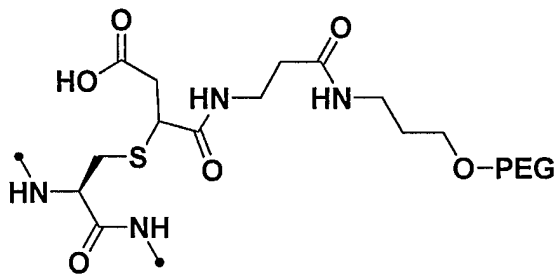


(式 X 1 1)

10

【 0 0 4 2】

【化 1 6】

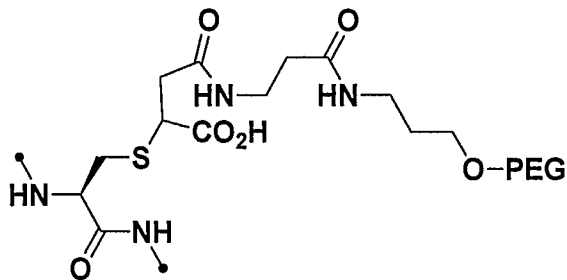


(式 X 1 2)

20

【 0 0 4 3】

【化 1 7】



(式 X 1 3)

30

【 0 0 4 4】

(23) PEG が直鎖状である、(2)、(10) ~ (22) いずれか 1 に記載の IL-2 改変体。

(24) PEG が分岐状である、(2)、(10) ~ (22) いずれか 1 に記載の IL-2 改変体。

40

(25) PEG が、平均分子量 10 kDa 以上の PEG である、(2)、(10) ~ (24) いずれか 1 に記載の IL-2 改変体。

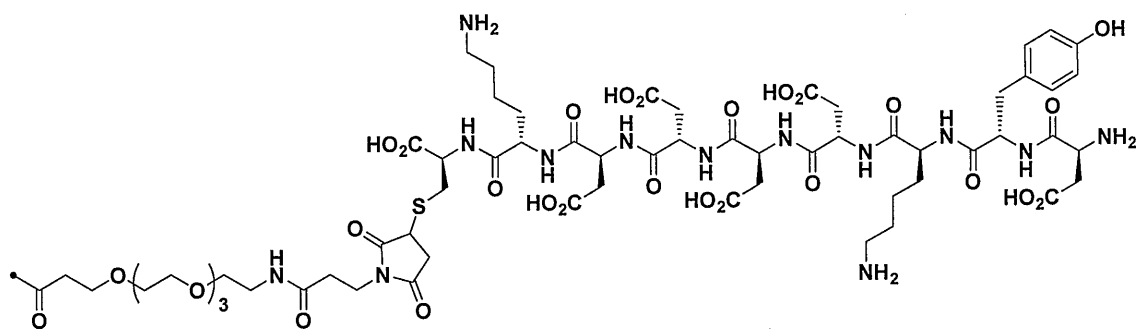
(26) 結合している PEG が、平均分子量 10 kDa、20 kDa、30 kDa、40 kDa、50 kDa、60 kDa、70 kDa または 80 kDa の PEG である (2)、(10) ~ (25) のいずれか 1 に記載の IL-2 改変体。

(27) 結合している PEG が、下記 (式 13)、(式 14)、(式 15)、(式 16)、(式 X 7)、(式 X 8)、(式 X 9)、(式 X 10)、(式 X 11)、(式 X 13)、(式 X 14) または (式 X 15) の少なくとも 1 つの式で表される構造を有する、(2)、(10) ~ (26) のいずれか 1 に記載の IL-2 改変体。

50

【0045】

【化18】

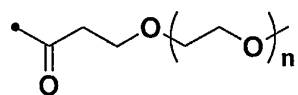


10

(式13)

【0046】

【化19】

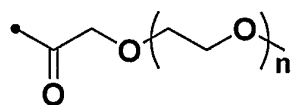


20

(式14)

【0047】

【化20】

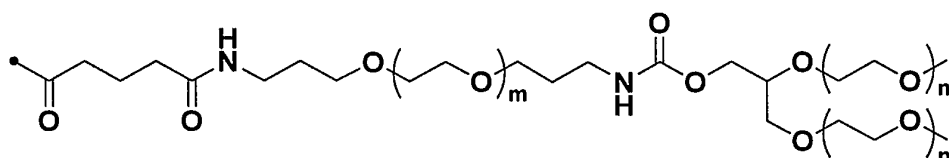


30

(式X7)

【0048】

【化21】



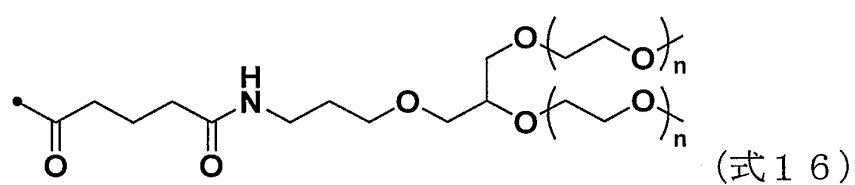
40

(式15)

【0049】

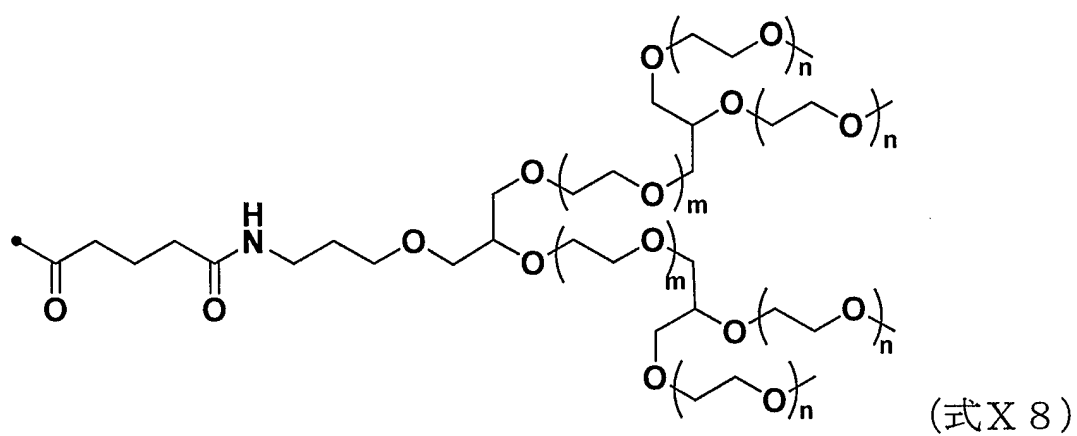
50

【化 2 2】



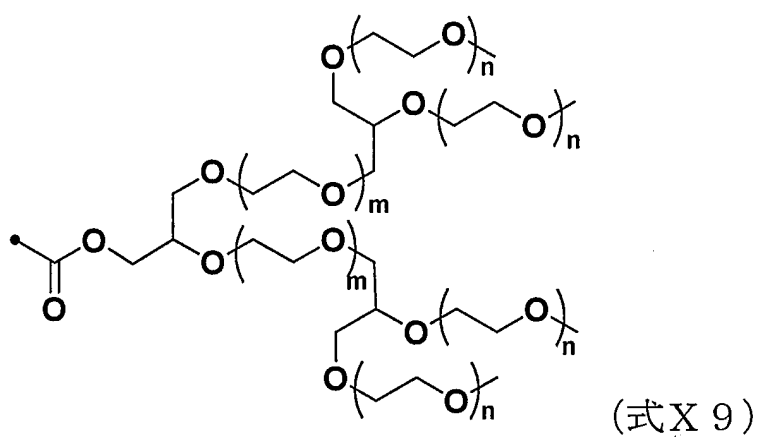
【 0 0 5 0】

【化 2 3】



【 0 0 5 1】

【化 2 4】



【 0 0 5 2】

10

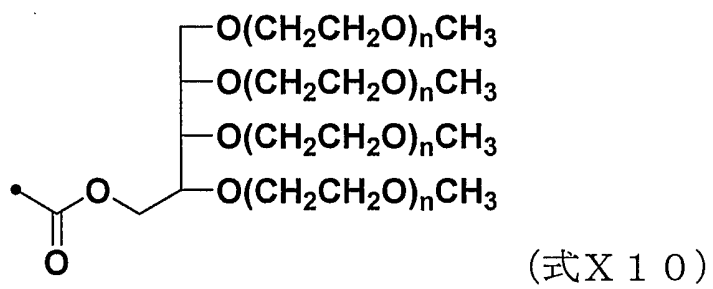
20

30

40

50

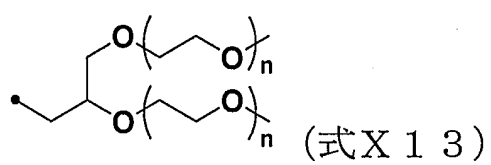
【化 2 5】



10

【 0 0 5 3】

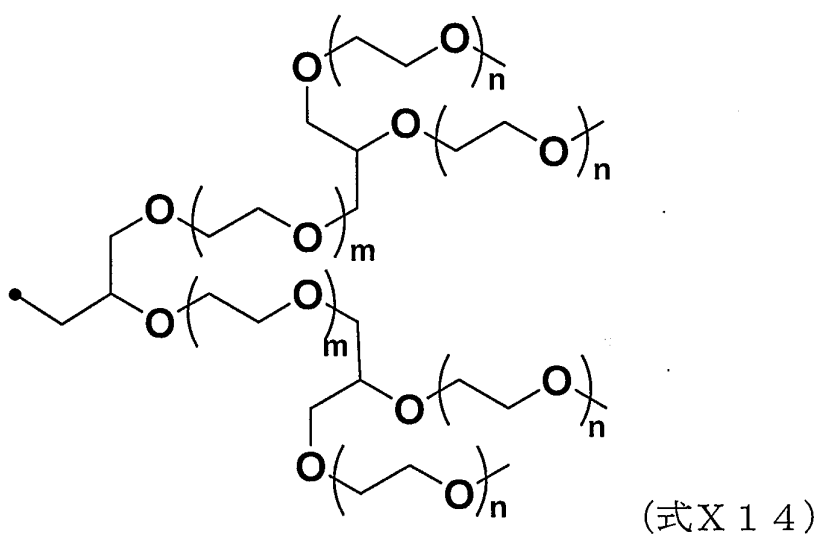
【化 2 6】



20

【 0 0 5 4】

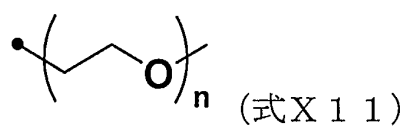
【化 2 7】



30

【 0 0 5 5】

【化 2 8】

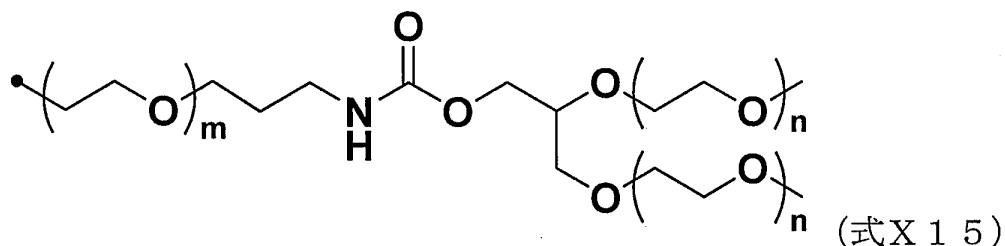


40

【 0 0 5 6】

50

【化 2 9】



10

【0 0 5 7】

(28) IL-2 のN末端にさらにメチオニン残基が結合している、(1)～(27)のいずれか1に記載のIL-2 改変体。

(29) IL-2 のN末端のアラニンが欠損している、(1)～(28)のいずれか1に記載のIL-2 改変体。

(30) IL-2 のN末端のアラニンが欠損し、さらにメチオニンが結合している、(1)～(29)に記載のIL-2 改変体。

(31) (1)～(30)のいずれか1に記載のIL-2 改変体の製造方法。

(32) (1)～(30)のいずれか1に記載のIL-2 改変体を含む組成物。

(33) (1)～(30)のいずれか1に記載のIL-2 改変体を含む、免疫疾患の治療剤。

20

(34) IL-2 のIL-2 R_{αβγ} に対する選択性を向上させる方法。

(35) IL-2 に糖鎖および／またはPEGを結合させることを含む、(34)に記載の方法。

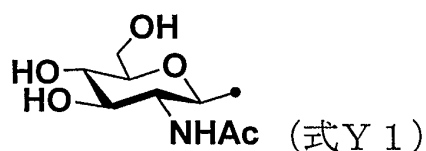
(36) IL-2 のアミノ酸配列における、11、12、13、15、16、18、19、20、84、87、88、91、92、108、115、119、122、123および130番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基に、糖鎖を結合させることを含む、(35)に記載の方法。

(37) 糖鎖が、下記(式4)～(式8)、(式Y1)、(式Y2)または(式Y3)で表される構造を有する糖鎖より選ばれる少なくとも1つである、(35)または(36)に記載の方法。

30

【0 0 5 8】

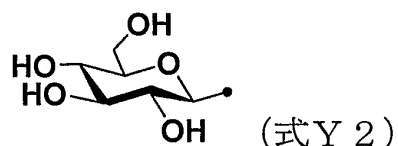
【化 3 0】



40

【0 0 5 9】

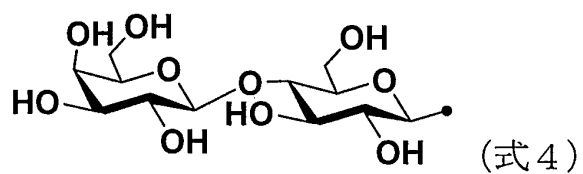
【化 3 1】



【0 0 6 0】

50

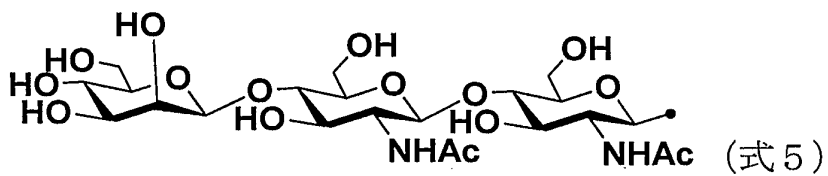
【化 3 2】



【 0 0 6 1】

【化 3 3】

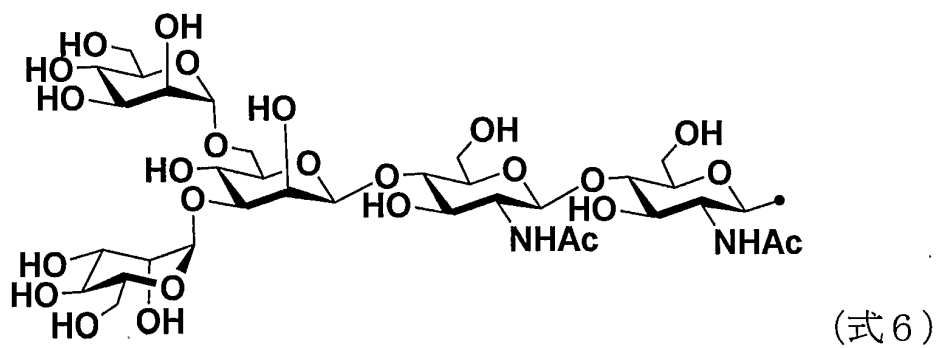
10



【 0 0 6 2】

【化 3 4】

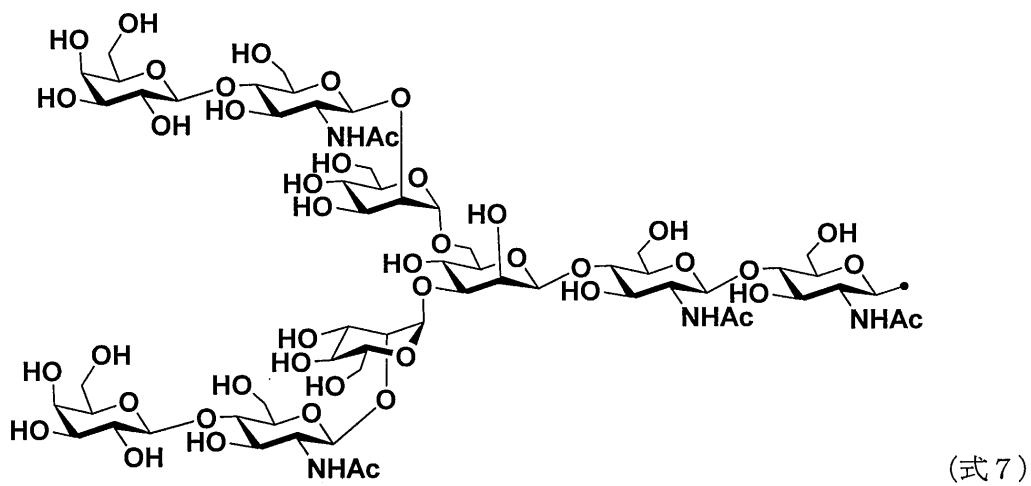
20



30

【 0 0 6 3】

【化 3 5】

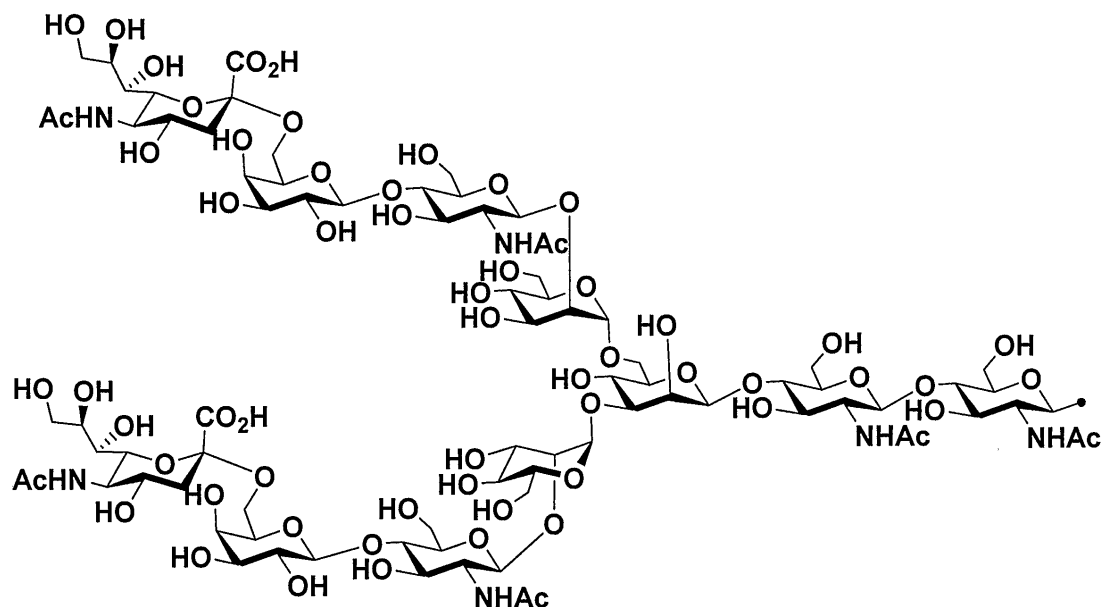


40

【 0 0 6 4】

50

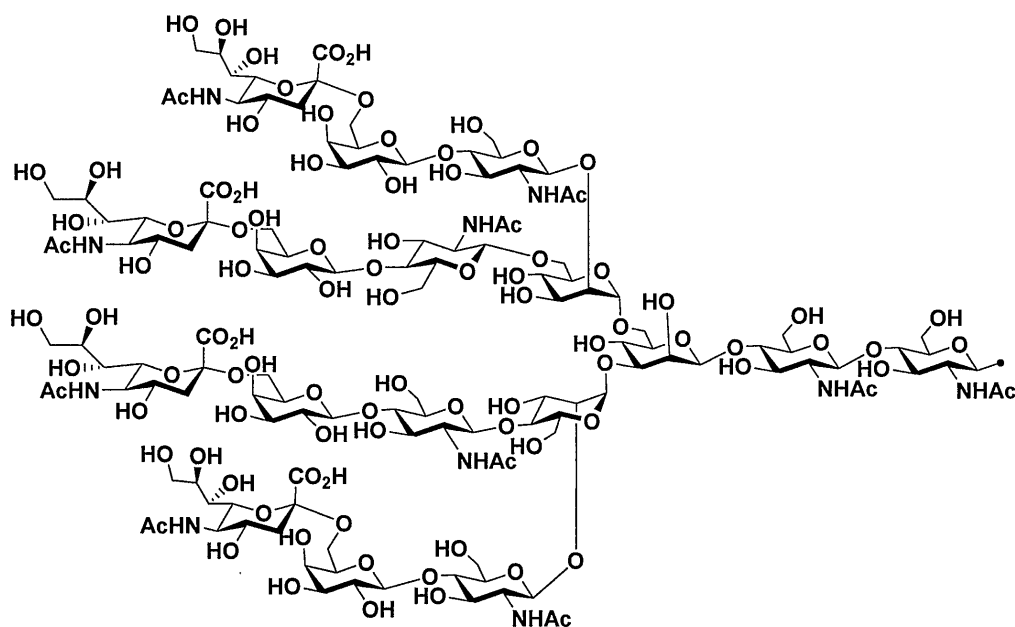
【化 3 6】



(式 8)

【 0 0 6 5】

【化 3 7】



(式 Y 3)

【 0 0 6 6】

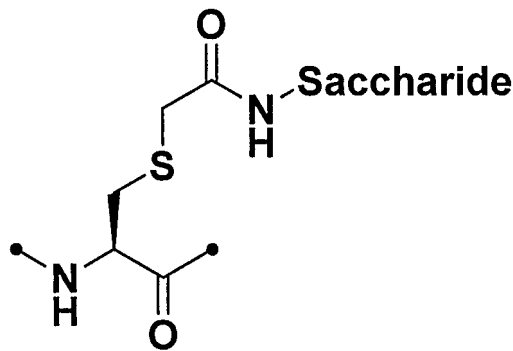
(38) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列を含む IL-2 において、該アミノ酸配列の 11、12、13、15、16、18、19、20、84、87、88、91、92、108、115、119、122、123 および 130 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基を、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換することを含む、(35) ~ (37) のいずれか 1 に記載の方法。

(39) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、12、15、16、19、88、91 および 119 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換することを含む、(35) ~ (38) のいずれか 1 に記載の方法。

(40) 糖鎖が結合したシステイン残基由来の基が、下記 (式 1) で表される構造を有する、(38) または (39) に記載の方法。

【0067】

【化 38】



(式 1)

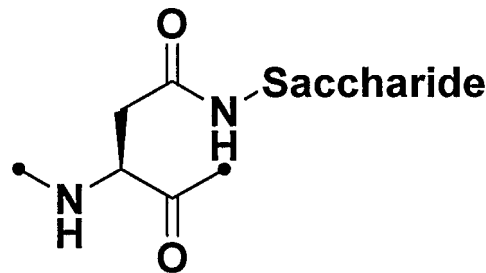
【0068】

[(式 1) 中、Saccharide は糖鎖を示す。]

(41) 糖鎖が結合したアスパラギン残基由来の基が、下記 (式 2) で表される構造を有する、(38) または (39) に記載の方法。

【0069】

【化 39】



(式 2)

【0070】

[(式 2) 中、Saccharide は糖鎖を示す。]

(42) 糖鎖が結合した IL-2 改変体にさらに PEG を結合させることを含む (35) ~ (41) のいずれか 1 に記載の方法。

(43) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、1、3、51 および 78 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、PEG が結合したアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を含む、(42) に記載の方法。

(44) IL-2 のアミノ酸配列における、4、5、6、7、8、60、78、79、99、100、101 および 129 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基に PEG が結合している、(35) に記載の方法。

(45) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 のアミノ酸配列の 125

番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における、4、5、6、7、8、60、78、79、99、100、101および129番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、PEGが結合したアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を含む、(35)または(44)に記載の方法。

(46) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、または配列番号1で表されるアミノ酸配列の125番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における4、5、8、78および129番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、PEGが結合しているアミノ酸残基に置換されている、(35)、(44)および(45)のいずれか1に記載の方法。

(47) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、または配列番号1で表されるアミノ酸配列の125番目のアミノ酸残基をセリン残基に置換したアミノ酸配列における4、5、8、78および129番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも2つのアミノ酸残基が、PEGが結合しているアミノ酸残基に置換されている、(35)、(44)～(46)のいずれか1に記載の方法。

(48) PEGが結合したアミノ酸残基が、PEGが結合した非天然アミノ酸残基である、(35)、(42)～(47)のいずれか1に記載の方法。

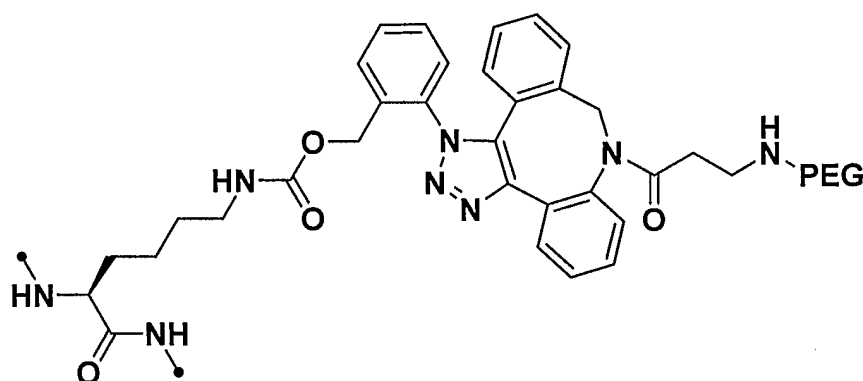
(49) PEGが結合した非天然アミノ酸残基が、PEGが結合したチオール基(—SH)を有するアミノ酸残基由来の基、またはPEGが結合したアジド基を有するアミノ酸残基由来の基である、(48)に記載の方法。

(50) PEGが結合した非天然アミノ酸残基が、 $N^6 - [\{ (o\text{-azidobenzyl}) \text{oxy} \} \text{carbonyl}] - L\text{-lysine} (o\text{-Az-Z-Lys})$ 残基由来の基、 $N^6 - [\{ (m\text{-azidobenzyl}) \text{oxy} \} \text{carbonyl}] - L\text{-lysine} (m\text{-Az-Z-Lys})$ 残基由来の基またはシステイン残基由来の基である、(48)または(49)に記載の方法。

(51) PEGが結合した $o\text{-Az-Z-Lys}$ 残基由来の基が、下記(式11)および/または(式12)で表される構造を有する、(50)に記載の方法。

【0071】

【化40】



(式11)

【0072】

10

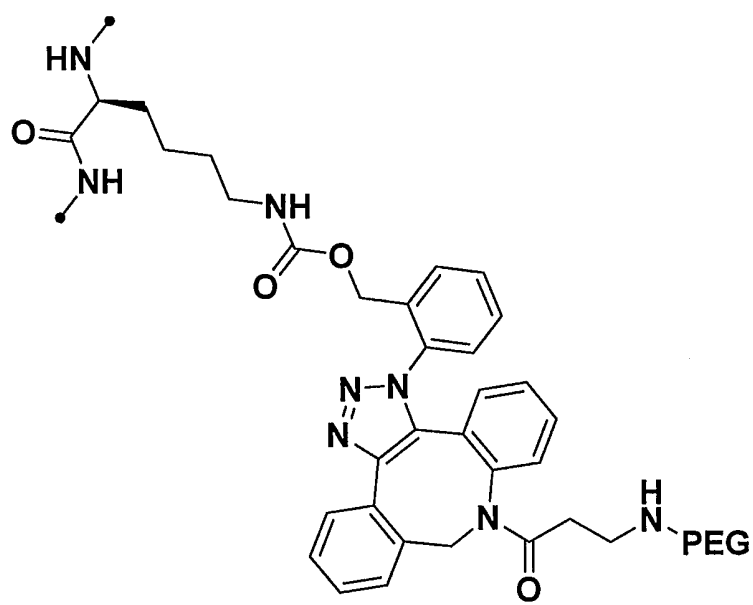
20

30

40

50

【化 4 1】



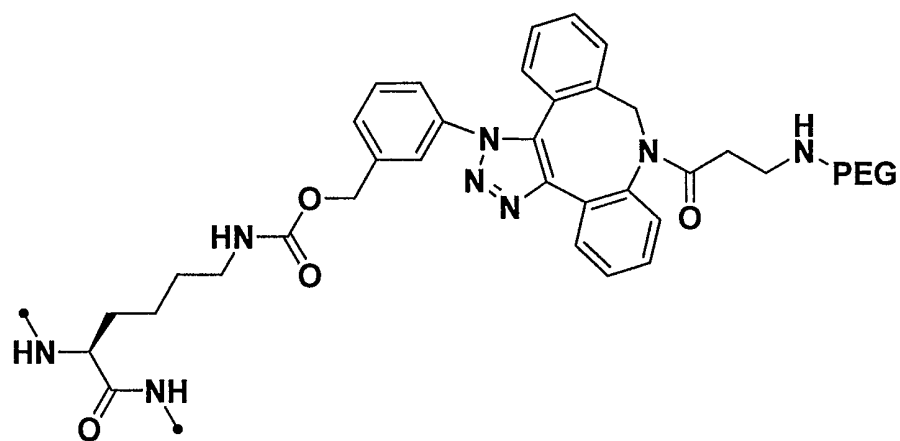
(式 1 2)

【 0 0 7 3】

(5 2) P E G が結合した m - A z - Z - L y s 残基由来の基が、下記 (式 X 4) および / または (式 X 5) で表される構造を有する、(5 0) に記載の方法。

【 0 0 7 4】

【化 4 2】



(式 X 4)

【 0 0 7 5】

10

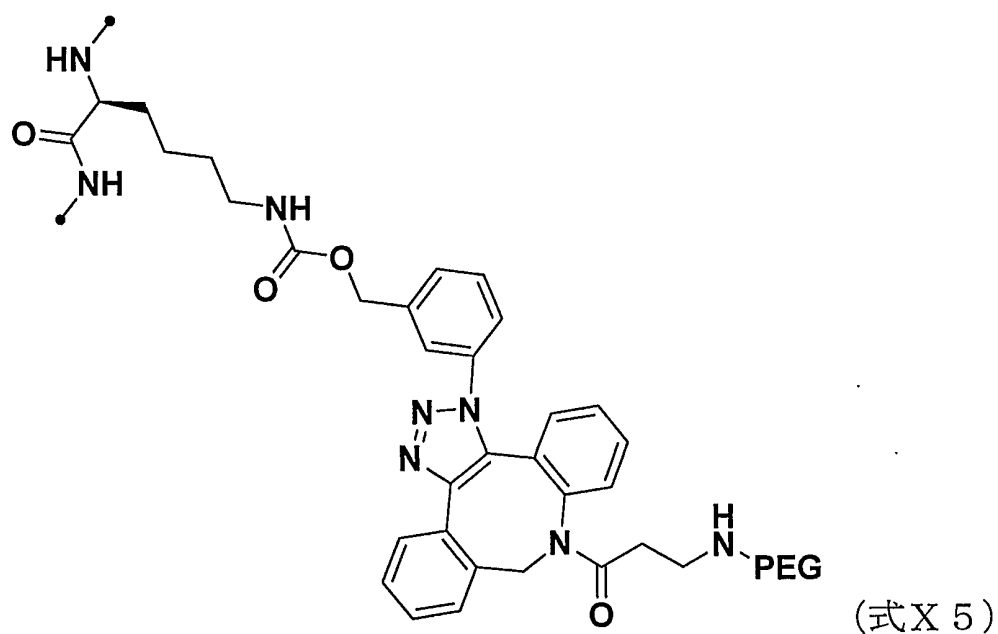
20

30

40

50

【化 4 3】

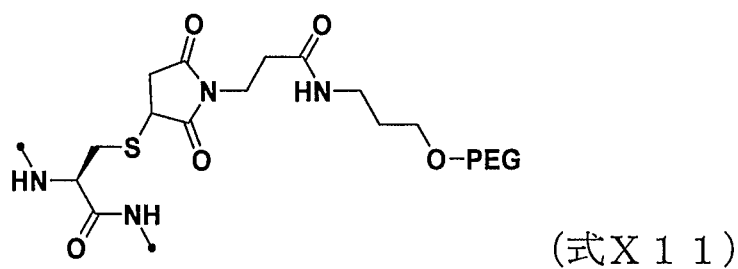


【0 0 7 6】

(53) PEGが結合したシステイン残基由来の基が、下記(式X 1 1)および/または(式X 1 2)および/または(式X 1 3)で表される構造を有する、(50)に記載の方法。

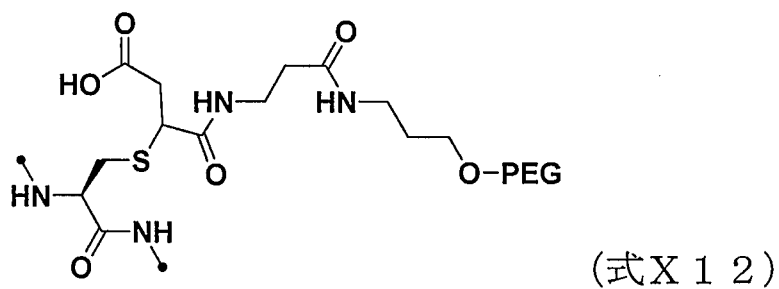
【0 0 7 7】

【化 4 4】



【0 0 7 8】

【化 4 5】



【0 0 7 9】

10

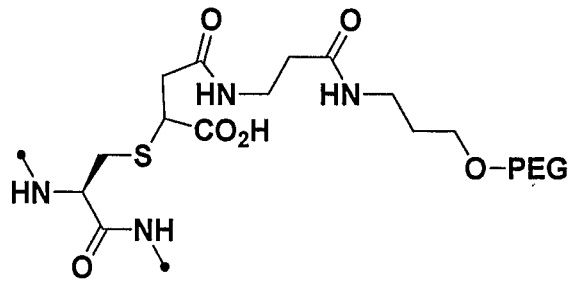
20

30

40

50

【化 4 6】



(式 X 1 3)

10

【0080】

(54) PEGが直鎖状である、(35)、(42)～(53)のいずれか1に記載の方法。

(55) PEGが分岐状である、(35)、(42)～(53)のいずれか1に記載の方法。

(56) PEGが、平均分子量10kDa以上のPEGである、(35)、(42)～(55)のいずれか1に記載の方法。

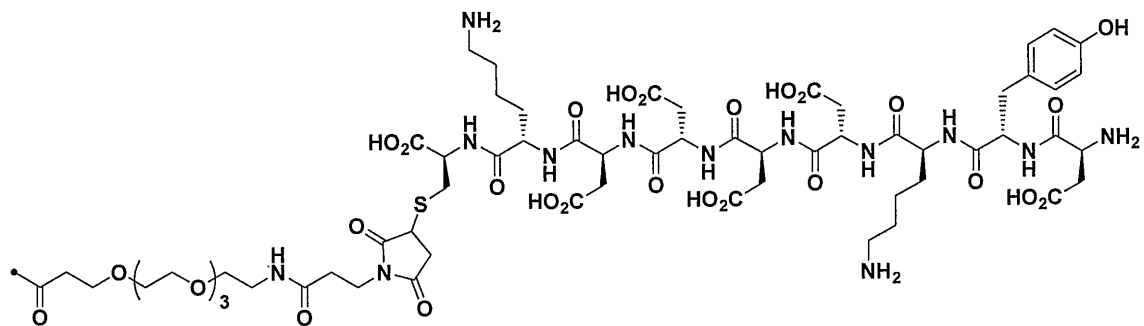
(57) PEGが、平均分子量10kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDaまたは80kDaのPEGである(35)、(42)～(56)のいずれか1に記載の方法。

20

(58) 結合しているPEGが、下記(式13)、(式14)、(式15)、(式16)、(式X7)、(式X8)、(式X9)、(式X10)、(式X11)、(式X13)、(式X14)または(式X15)の少なくとも1つの式で表される構造を有する、(35)、(42)～(57)のいずれか1に記載の方法。

【0081】

【化 4 7】



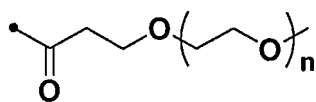
(式 1 3)

30

40

【0082】

【化 4 8】

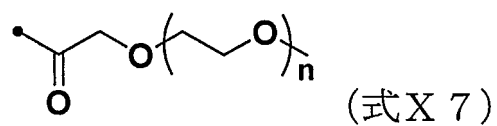


(式 1 4)

【0083】

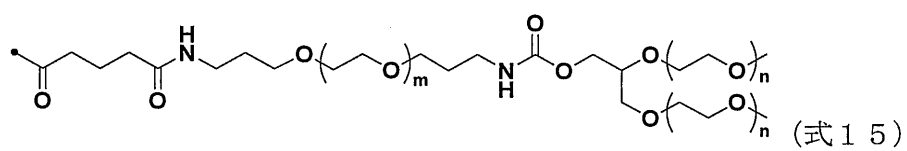
50

【化 4 9】



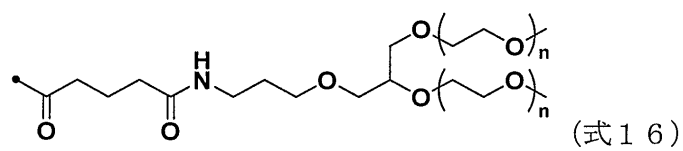
【 0 0 8 4】

【化 5 0】



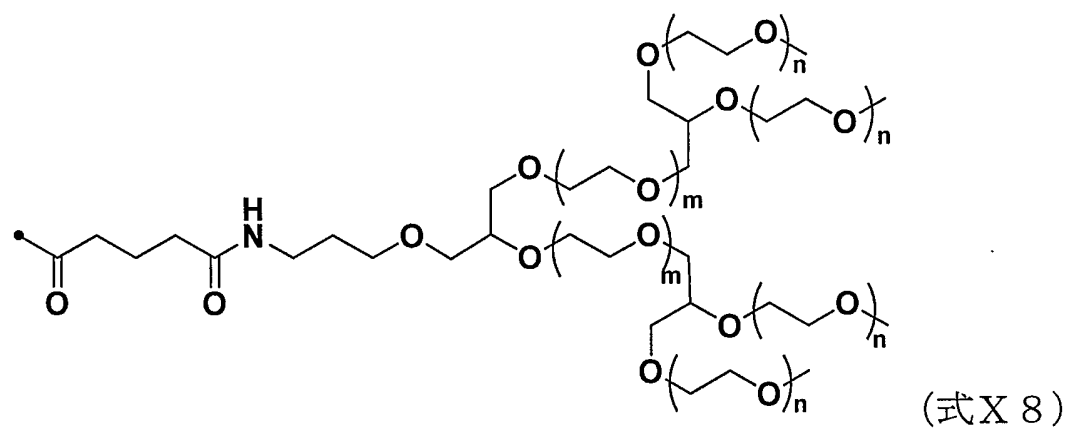
【 0 0 8 5】

【化 5 1】



【 0 0 8 6】

【化 5 2】



【 0 0 8 7】

10

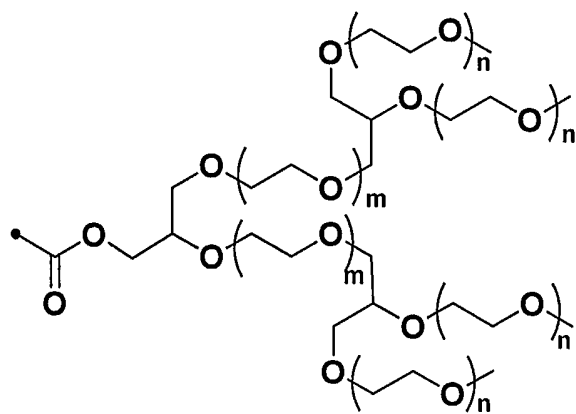
20

30

40

50

【化 5 3】

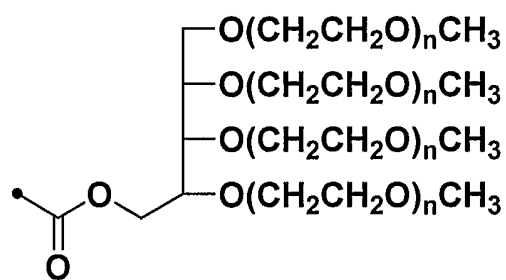


(式 X 9)

10

【 0 0 8 8】

【化 5 4】

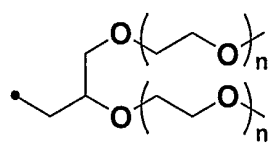


(式 X 1 0)

20

【 0 0 8 9】

【化 5 5】



(式 X 1 3)

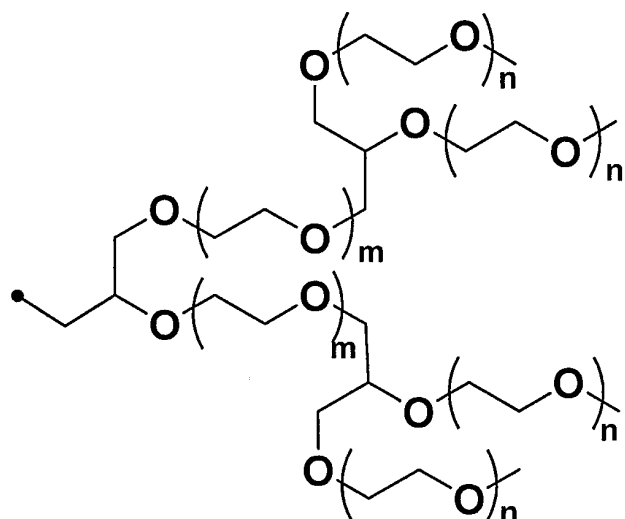
30

【 0 0 9 0】

40

50

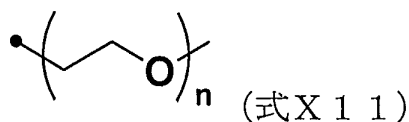
【化 5 6】



(式 X 1 4)

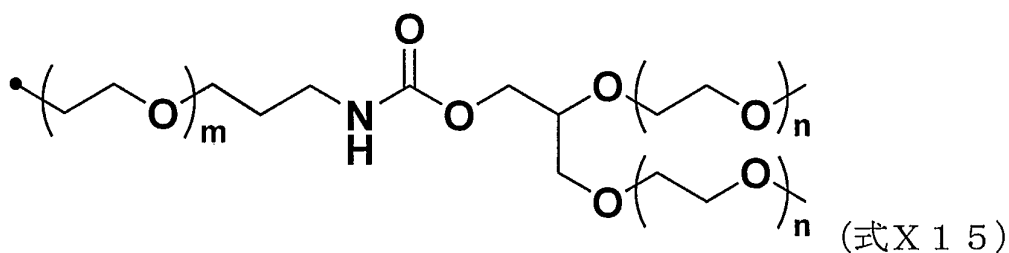
【 0 0 9 1】

【化 5 7】



【 0 0 9 2】

【化 5 8】



【 0 0 9 3】

(5 9) I L - 2 の N 末端にさらにメチオニン残基が結合している、(3 4) ~ (5 8) のいずれか 1 に記載の方法。

(6 0) I L - 2 の N 末端のアラニンが欠損している、(3 4) ~ (5 9) のいずれか 1 に記載の方法。

(6 1) I L - 2 の N 末端のアラニンが欠損し、さらにメチオニンが結合している、(3 4) ~ (6 0) のいずれか 1 に記載の方法。

(6 2) 制御性 T 細胞を選択的に活性化させる方法。

(6 3) I L - 2 R β および γ サブユニットの少なくとも一方に対する I L - 2 の親和性を低下させる方法。

(6 4) I L - 2 R α サブユニットに対する I L - 2 の親和性を向上させる方法。

【発明の効果】

【 0 0 9 4】

10

20

30

40

50

本発明のIL-2改変体は、Tregに高発現しているIL-2R $\alpha\beta\gamma$ に選択的に結合してTregを選択的に活性化する。本発明によれば、IL-2改変体、該IL-2改変体の製造方法、該IL-2改変体を含む組成物および免疫疾患の治療剤、IL-2のIL-2R $\alpha\beta\gamma$ への選択性を増加させる方法、IL-2R α サブユニットに対するIL-2の親和性を向上させる方法、IL-2R β および γ サブユニットの少なくともいずれか1つに対するIL-2の親和性を低下させる方法、並びに制御性T細胞を選択的に活性化させる方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1A】図1Aは各種糖鎖結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸はPeprrotech社製IL-2〔以下、IL-2(P)と記載〕、黒三角はH16C-2、黒四角はL19C-9、黒横棒はN88C-2の活性を示す。横軸にIL-2濃度(pM)、縦軸にIL-2依存性細胞増殖率(%)を記す。

10

【図1B】図1Bは各種糖鎖結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸はE15C-11、黒三角はL19C-11*、黒四角はL12C-11/V91C-11、黒ひし形はV91C-11/V115C-11、黒横棒はV91C-11/N119C-11、白丸はA1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11の活性を示す。横軸にIL-2濃度(pM)、縦軸にIL-2依存性細胞増殖率(%)を記す。

【図1C】図1Cは各種Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸はA1C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11、黒三角はT3C-Li20(IAc)/L12C-11/V91C-11、黒四角はT3C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11、黒ひし形はT3C-Y50(IAc)/E15C-11、黒棒はT3C-V40(IAc)/E15C-11、白丸はT3C-V80(Mal)/E15C-11、白三角はF78C-V40(IAc)/L12C-11の活性を示す。横軸にIL-2濃度(pM)、縦軸にIL-2依存性細胞増殖率(%)を記す。

20

【図1D】図1Dは各種PEG結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸は8His-IL-2、黒三角は8His-F78(oAZZK)-Li20、黒四角は8His-I129(oAZZK)-Li20の活性を示す。横軸にIL-2濃度(pM)、縦軸にIL-2依存性細胞増殖率(%)を記す。

30

【図1E】図1Eは各種PEG結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸は8His-S4(oAZZK)-Li20、黒三角は8His-S5(oAZZK)-Li20、黒四角は8His-S6(oAZZK)-Li20、黒ひし形は8His-T7(oAZZK)-Li20、黒横棒は8His-K8(oAZZK)-Li20の活性を示す。横軸にIL-2濃度(pM)、縦軸にIL-2依存性細胞増殖率(%)を記す。

【図1F】図1Fは各種PEG結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸は8His-E60(oAZZK)-Li20、黒三角は8His-H79(oAZZK)-Li20、黒四角は8His-R81(oAZZK)-Li20、黒ひし形は8His-L94(oAZZK)-Li20の活性を示す。横軸にIL-2濃度(pM)、縦軸にIL-2依存性細胞増殖率(%)を記す。

40

【図1G】図1Gは各種PEG結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸は8His-S99(oAZZK)-Li20、黒三角は8His-E100(oAZZK)-Li20、黒四角は8His-T101(oAZZK)-Li20、黒ひし形は8His-Q126(oAZZK)-Li20の活性を示す。横軸にIL-2濃度(pM)、縦軸にIL-2依存性細胞増殖率(%)を記す。

【図1H】図1Hは各種PEG結合IL-2改変体のTreg増殖促進活性を示す図である。黒丸は8His-F78(oAZZK)-V40、黒三角は8His-F78(oAZZK)-W40、黒四角は8His-I129(oAZZK)-Li40、黒ひし形は

50

8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - V 4 0、黒棒は8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - W 4 0、白丸は8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、白三角はI 1 2 9 (o A z Z K) - V 4 0、白四角はI 1 2 9 (o A z Z K) - W 8 0、白ひし形はI 1 2 9 C - V 4 0 (M a l) の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図1 I】図1 Iは各種PEG結合IL-2 変体のT r e g 増殖促進活性を示す図である。黒丸は8 H i s - S 4 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒三角はS 4 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、黒四角は8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒ひし形はS 5 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、黒棒は8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、白丸はK 8 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、白三角は8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、白四角は8 H i s - H 7 9 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、白ひし形は8 H i s - S 9 9 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図1 J】図1 Jは各種PEG結合IL-2 変体のT r e g 増殖促進活性を示す図である。黒丸は8 H i s - S 4 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、黒三角は8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、黒四角は8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、黒ひし形は8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / H 7 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒棒は8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / S 9 9 (o A z Z K) - L i 3 0の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図2 A】図2 Aは各種糖鎖結合IL-2 変体のNK細胞増殖促進活性を示す図である。黒ひし形はI L - 2 (P)、黒四角はH 1 6 C - 2、黒三角はL 1 9 C - 9、黒丸はN 8 8 C - 2の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図2 B】図2 Bは各種PEG結合IL-2 変体のNK細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は8 H i s - I L - 2、黒三角は8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 2 0、黒四角は8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 2 0の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図2 C】図2 Cは各種PEG結合IL-2 変体のNK細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は8 H i s - S 4 (o A z Z K) - L i 2 0、黒三角は8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 2 0、黒四角は8 H i s - S 6 (o A z Z K) - L i 2 0、黒ひし形は8 H i s - T 7 (o A z Z K) - L i 2 0、黒横棒は8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 2 0の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図2 D】図2 Dは各種PEG結合IL-2 変体のNK細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は8 H i s - S 9 9 (o A z Z K) - L i 2 0、黒三角は8 H i s - E 1 0 0 (o A z Z K) - L i 2 0、黒四角は8 H i s - T 1 0 1 (o A z Z K) - L i 2 0、黒ひし形は8 H i s - Q 1 2 6 (o A z Z K) - L i 2 0の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図2 E】図2 Eは各種PEG結合IL-2 変体のNK細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は8 H i s - E 6 0 (o A z Z K) - L i 2 0、黒三角は8 H i s - H 7 9 (o A z Z K) - L i 2 0、黒四角は8 H i s - R 8 1 (o A z Z K) - L i 2 0、黒ひし形は8 H i s - L 9 4 (o A z Z K) - L i 2 0の活性を示す。横軸にI L - 2 濃度 (p M)、縦軸にI L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図2 F】図2 Fは各種PEG結合IL-2 変体のNK細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - V 4 0、黒三角は8 H i s - F 7 8 (o A

10

20

30

40

50

z Z K) - W 4 0、黒四角は 8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 4 0、黒ひし形は 8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - V 4 0、黒横棒は 8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - W 4 0、白丸は 8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、白三角は I 1 2 9 (o A z Z K) - W 8 0、白四角は I 1 2 9 C - V 4 0 (M a l) の活性を示す。横軸に I L - 2 濃度 (p M)、縦軸に I L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図 2 G】図 2 G は各種 P E G 結合 I L - 2 改変体の N K 細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は 8 H i s - S 4 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒三角は S 4 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、黒四角は 8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒ひし形は S 5 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、黒横棒は 8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、白丸は K 8 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0 の活性を示す。横軸に I L - 2 濃度 (p M)、縦軸に I L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

10

【図 2 H】図 2 H は各種糖鎖結合 I L - 2 改変体および各種 C y s - P E G 化、糖鎖結合 I L - 2 改変体の N K 細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1、黒三角は A 1 C - Y 5 0 (I A c) / L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1、黒四角は T 3 C - L i 2 0 (I A c) / L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1、黒ひし形は T 3 C - Y 5 0 (I A c) / L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1、黒棒は T 3 C - Y 5 0 (I A c) / E 1 5 C - 1 1、白丸は T 3 C - V 4 0 (I A c) / E 1 5 C - 1 1、白三角は T 3 C - V 8 0 (M a l) / E 1 5 C - 1 1、白四角は F 7 8 C - V 4 0 (I A c) / L 1 2 C - 1 1 の活性を示す。横軸に I L - 2 濃度 (p M)、縦軸に I L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

20

【図 2 I】図 2 I は各種 P E G 結合 I L - 2 改変体の N K 細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は I L - 2 (P)、黒三角は I 1 2 9 (o A z Z K) - V 4 0、黒四角は 8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒ひし形は 8 H i s - H 7 9 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒棒は 8 H i s - S 9 9 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0 の活性を示す。横軸に I L - 2 濃度 (p M)、縦軸に I L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

【図 2 J】図 2 J は各種 P E G 結合 I L - 2 改変体の N K 細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は 8 H i s - S 4 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、黒三角は 8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、黒四角は 8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、黒ひし形は 8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / H 7 9 (o A z Z K) - L i 3 0、黒棒は 8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / S 9 9 (o A z Z K) - L i 3 0 の活性を示す。横軸に I L - 2 濃度 (p M)、縦軸に I L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

30

【図 2 K】図 2 K は各種糖鎖結合 I L - 2 改変体の N K 細胞増殖促進活性を示す図である。黒丸は E 1 5 C - 1 1、黒三角は L 1 9 C - 1 1 *、黒四角は V 9 1 C - 1 1 / V 1 1 5 C - 1 1、黒ひし形は V 9 1 C - 1 1 / N 1 1 9 C - 1 1、黒棒は A 1 C - 1 1 / T 3 C - 1 1 / S 5 C - 1 1 / L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1 の活性を示す。横軸に I L - 2 濃度 (p M)、縦軸に I L - 2 依存性細胞増殖率 (%) を記す。

40

【図 3】図 3 は未刺激 T r e g 又は各種 I L - 2 改変体刺激 T r e g 共存下でのレスポンドー T 細胞 (T r e s p) の増殖率を示す図である。図 3 (A) は C D 4 陽性 T r e s p の増殖率、図 3 (B) は C D 8 陽性 T r e s p の増殖率である。いずれの図も横軸に T r e s p と T r e g の存在比、縦軸に T r e s p の増殖率 (%) を記す。白ひし形は未刺激、黒ひし形は I L - 2 (P)、黒四角は H 1 6 C - 2、黒三角は L 1 9 C - 9、黒丸は N 8 8 C - 2 を示す。

【図 4】図 4 (A) - 図 4 (E) は自己血漿で再構成したヒト P B M C に各種 I L - 2 改変体を添加し培養した際の培養上清中のサイトカイン濃度を示す図である。図 4 (A) は I L - 4 濃度、図 4 (B) は I L - 6 濃度、図 4 (C) は I L - 1 0 濃度、図 4 (D) は

50

IFN γ 濃度および図4(E)はTNF α 濃度である。いずれの図も横軸に添加したIL-2濃度(pM)、縦軸にサイトカイン産生量(pg/mL)を記す。図4(F)はTreg選択的増殖活性を評価した結果を示す図である。縦軸に、CD4陽性画分のうち、CD25⁺Foxp3^{high}画分をTreg、CD25⁺Foxp3^{low}画分をエフェクターT細胞(Teff)とした時の、その比[Treg(%) / Teff(%)]を示した。横軸に、添加したIL-2濃度を示す。いずれの図も、白ひし形は未刺激、黒ひし形はIL-2(P)、黒四角はH16C-2、黒三角はL19C-9、黒丸はN88C-2を示す。

【発明を実施するための形態】

【0096】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0097】

「Treg」または「Treg細胞」とは、制御性T細胞を示す。制御性T細胞とは、他の免疫細胞の活性を抑制するT細胞のクラスであり、フローサイトメトリーを使用して、細胞マーカー表現型であるCD4⁺CD25⁺FOX P3⁺により規定される。

【0098】

FOX P3は、細胞内タンパク質であり、染色のために、細胞の固定と透過処理を必要とすることから、生存するTregを規定するためには、細胞表面表現型である、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}を使用することができる。

【0099】

Tregはまた、tTreg(胸腺由来)およびpTreg(末梢由来であり、末梢のナイーブT細胞から分化させた)など、多様なTregサブクラスも含む。全てのTregは、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ を発現し、IL-2依存的に増殖するが、本発明のIL-2改変体は、少なくとも1のTregサブクラスを選択的に活性化することができ、好ましくはいずれのサブクラスも選択的に活性化し得る。

【0100】

「IL-2」とは、野生型IL-2、IL-2改変体いずれの場合もある。

「野生型IL-2」とは、下記1)~3)のIL-2いずれのものも含む。

- 1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるヒト由来野生型成熟IL-2。
- 2) 上記1)の遺伝子組換え体を作製する際に加え得るアミノ酸改変を有するIL-2。
- 3) 上記1)および上記2)のIL-2のN末端のアミノ酸残基が欠失したIL-2。

【0101】

上記2)のアミノ酸改変とは、例えば大腸菌でIL-2を発現させるために配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端に開始コドンによってコードされるメチオニン残基を結合させる改変や、大腸菌でIL-2を発現させ、かつ簡便に精製するために配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端に、MH H H H H H H H Hで表されるアミノ酸配列(メチオニンが結合したポリヒスチジン)を結合させる改変や、IL-2の物性を高めるためにヒト由来野生型成熟IL-2の125番目のアミノ酸残基をアラニン残基またはセリン残基に置換する改変等が挙げられる。

【0102】

上記3)のIL-2のN末端のアミノ酸残基が欠失したIL-2とは、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニン残基、またはアラニン残基およびプロリン残基が欠失したアミノ酸配列を有するIL-2等が挙げられる。

【0103】

野生型IL-2は、具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端にMH H H H H H H H Hで表されるアミノ酸配列が結合したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニン残基が欠失したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニン残基が欠失し、かつメチオニンが結合したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニ

10

20

30

40

50

ン残基およびプロリン残基が欠失したアミノ酸配列、または配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端にMHHHHHHHHHで表されるアミノ酸配列が結合したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニン残基が欠失したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニン残基が欠失し、かつメチオニンが結合したアミノ酸配列、もしくは配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニン残基およびプロリン残基が欠失したアミノ酸配列において、125番目のアミノ酸残基をセリン残基もしくはアラニン残基に置換したアミノ酸配列を有するIL-2が挙げられる。上述、N末端側のアミノ酸配列及び配列番号1で表されるアミノ酸配列の125番目のセリン残基は、IL-2の活性に影響を与えることなく、タンパク質発現またはタンパク質安定性の観点から許容されるアミノ酸配列のバリエーションであり、本発明のIL-2改変体においても本アミノ酸配列のバリエーションが含まれる。

10

【0104】

なお、本発明において記載されるIL-2のアミノ酸残基の番号は、いずれも配列番号1で表されるIL-2のアミノ酸配列を基準とした時のアミノ酸残基の番号（位置）を示す。従って、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端のアラニン残基が1番目、プロリン残基が2番目、N末端に結合したメチオニン残基は-1番目として定義される。

【0105】

「IL-2改変体」とは、野生型IL-2に何らかの改変を加えて作製された、野生型IL-2の機能を有する全てのタンパク質を含む。改変体としては、例えばアミノ酸改変（例えば、置換、欠失、付加など）により野生型IL-2が改変されたIL-2改変体、糖鎖修飾により野生型IL-2が改変されたIL-2改変体、化学修飾により野生型IL-2が改変されたIL-2改変体などが挙げられる。上記の改変は、自然に生じる改変および人為的な改変のいずれの改変も含む。

20

【0106】

「野生型IL-2の機能」とは、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ への結合、IL-2R $\beta\gamma$ への結合、CD122およびCD132の細胞内領域を介した細胞内シグナル伝達経路の活性化、JAK1のリン酸化、JAK3のリン酸化、STAT5のリン酸化、STAT3のリン酸化、PI3Kのリン酸化、MEKのリン酸化、Foxp3発現促進、Foxp3により転写が制御されている遺伝子群の発現促進、Foxp3遺伝子のTSDR（Treg-specific demethylation region）領域のDNA脱メチル化促進、IL-2R $\beta\gamma$ を発現する免疫細胞の増殖および生存促進、IL-2R $\beta\gamma$ を発現する免疫細胞のサイトカイン産生促進、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ を発現する免疫細胞の増殖および生存促進、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ を発現する免疫細胞のサイトカイン産生促進、Treg増殖および生存促進、ならびにTregのTeff活性化抑制能の向上から選ばれる少なくとも1つの機能を示す。

30

【0107】

本発明のIL-2改変体の一態様としては、IL-2の所定の領域に糖鎖が結合したIL-2改変体、およびIL-2の所定の領域にPEGが結合したIL-2改変体、およびIL-2の所定の領域に糖鎖およびPEGが結合したIL-2改変体が挙げられる。結合としては、例えば、共有結合、非共有結合などが挙げられるが、結合様式は問わない。

40

【0108】

「アミノ酸残基」は天然アミノ酸残基と非天然アミノ酸残基のいずれの場合もある。

【0109】

「天然アミノ酸残基」とは、セレノシステイン残基、及び以下の20種の α -アミノ酸残基：アラニン残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、グリシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、リジン残基、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、プロリン残基、セリン残基、スレオニン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、バリン残基、又はシステイン残基が挙げられる

50

。天然アミノ酸残基はL体とD体の両方を含み、ヒトにおいてはL体のほうが好ましい。

【0110】

「非天然アミノ酸残基」とは、天然アミノ酸残基以外の全てのアミノ酸残基をいう。非天然アミノ酸残基としては、例えば、天然アミノ酸残基を修飾したアミノ酸残基、人工的にデザインされたアミノ酸残基が挙げられる。

【0111】

「修飾」とは、化学修飾、翻訳後修飾など、あらゆる修飾を含む。

【0112】

本発明のIL-2 変体の一実施形態としては、IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性が向上しているIL-2 変体が挙げられる。IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性が向上しているIL-2 変体により、IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ を発現しているTregを選択的に活性化させることができる。

10

【0113】

「IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性」とは、IL-2がIL-2 $R_{\beta\gamma}$ よりもIL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に選択的に結合する性質をいう。また、「IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性が向上している」とは、野生型IL-2と比較して、IL-2 変体のIL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性が向上していることをいう。

【0114】

IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性、またはIL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性が向上していることは、例えば以下に記載する方法で判断することができる。

20

【0115】

(1) 各種IL-2について、IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する結合活性のEC₅₀値と、IL-2 $R_{\beta\gamma}$ に対する結合活性のEC₅₀値を測定する。IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ のEC₅₀がIL-2 $R_{\beta\gamma}$ のEC₅₀よりも小さい、またはEC₅₀ ratio値 (IL-2 $R_{\beta\gamma}$ EC₅₀ / IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ EC₅₀) が1より大きければ、当該IL-2はIL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性があると判断できる。

【0116】

また、野生型IL-2のEC₅₀ ratio値よりもIL-2 変体のEC₅₀ ratio値が大きい、または標準化EC₅₀ ratio値 (IL-2 変体のEC₅₀ ratio値 / 野生型IL-2のEC₅₀ ratio値) が1より大きい場合、当該IL-2 変体はIL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性が向上していると判断できる。標準化EC₅₀ ratio値は、1より大きい、5以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、21以上、22以上、23以上、24以上、25以上、26以上、27以上、28以上、29以上、30以上の順で好ましい。野生型IL-2の代わりに、野生型IL-2と同等のEC₅₀ ratio値を有するIL-2 変体を使用してもよい。

30

【0117】

EC₅₀値の測定方法としては、具体的には例えば、下記(A)～(C)に示す手順による方法が挙げられる。より具体的な方法としては、実施例において後述する方法が挙げられる。

40

(A) 哺乳動物細胞にヒトIL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ 、又はヒトIL-2 $R_{\beta\gamma}$ を発現させて、ヒトIL-2 依存性生存細胞株を作製し、各細胞株を96穴プレートに播種する。

(B) コントロールのIL-2を1000 ng/mlで添加したウェルのrelative fluorescence units (RLU) 値を100%、IL-2を含まない培地を添加したウェルのRLU値を0%として、被験物質であるIL-2 変体のIL-2 依存性細胞増殖率を算出する。

(C) (A) で得られたデータを元に統計解析ソフト (例えば、IBDS社製XLfit 5 version 5.3.1.3) を用いてEC₅₀値を算出する。

【0118】

(2) 野生型IL-2とIL-2 変体のそれぞれで、IL-2 R細胞外ドメイン (E

50

CD) - Fc 融合タンパク質である CD25ECD - Fc、IL-2R $\beta\gamma$ ECD - Fc に対する親和性を Biacore で測定する。野生型よりも IL-2 改変体で、CD25ECD - Fc の K_D 値が小さい、および／または IL-2R $\beta\gamma$ ECD - Fc の K_D 値が大きいとき、当該 IL-2 改変体は IL-2R $\alpha\beta\gamma$ に対する選択性が向上していると判断することができる。また、CD25ECD - Fc の K_D 値に対する IL-2R $\beta\gamma$ ECD - Fc の K_D 値の相対値が、野生型よりも IL-2 改変体で増加しているとき、当該 IL-2 改変体は IL-2R $\alpha\beta\gamma$ に対する選択性が向上していると判断することもできる。

【0119】

「Treg を選択的に活性化させる」とは、下記 (a) ~ (c) の少なくともいずれか一つをいう。

(a) 野生型 IL-2 よりも IL-2 改変体の Treg 増殖活性が高い、および／または NK 細胞増殖活性が低い。

(b) 野生型 IL-2 よりも IL-2 改変体で、細胞集団中のエフェクター T 細胞 (Teff) の割合に対する Treg の割合の比 [Treg (%) / Teff (%)] が高い。

(c) 野生型 IL-2 よりも IL-2 改変体で炎症性サイトカインの産生量が低下している、および／または抗炎症性サイトカインの産生量が増加している。

【0120】

上記 (a) ~ (c) のいずれの場合も、野生型 IL-2 の代わりに野生型 IL-2 と同等の活性を有する IL-2 改変体を使用してもよい。

【0121】

Treg 増殖活性、および NK 細胞増殖活性は、例えば以下に記載する方法で測定することができる。Treg または NK 細胞を 96 穴プレートに播種し、コントロールの IL-2 を添加したウェルの RLU 値を 100%、IL-2 を含まない培地を添加したウェルの RLU 値を 0% として、被験物質である IL-2 改変体の Treg または NK 細胞増殖率を算出する。より具体的な方法としては、実施例において後述する方法が挙げられる。

【0122】

Treg (%) / Teff (%) は、例えば、以下に記載する方法で測定することができる。ヒト末梢血単核細胞 (以下、PBMC と略す) を自己血漿に懸濁し、そこに抗 CD3 抗体 OKT3 を添加して 96 穴プレートに播種後、各種 IL-2 を添加して培養する。得られたヒト PBMC と、蛍光標識抗ヒト CD4 抗体、蛍光標識 CD25 抗体、蛍光標識抗 Foxp3 抗体と反応させた後、フローサイトメーター (例えば、BD Biosciences 社製 LSRFortessa) にて各種蛍光強度を測定する。

【0123】

得られたデータを、データ解析ソフト (例えば、TreeStar 社製 FlowJo、version 7.6.5) を用いて解析し、CD4 陽性画分の中で、CD25⁺Foxp3^{high} 画分を Treg、CD25⁺Foxp3^{low} 画分をエフェクター T 細胞 (Teff) として、その存在比 [Treg (%) / Teff (%)] を算出する。より具体的な方法としては、実施例において後述する方法が挙げられる。

【0124】

各種サイトカインの産生量は、例えば、以下に記載する方法で測定することができる。ヒト PBMC を自己血漿に懸濁し、抗 CD3 抗体 OKT3 を添加して 96 穴プレートに播種後、各種 IL-2 を添加して培養し、上清中のサイトカイン産生量を定量する。より具体的な方法としては、実施例において後述する方法が挙げられる。

【0125】

本発明の IL-2 改変体の一態様としては、IL-2 に糖鎖が結合することにより改変された IL-2 改変体 (以下、糖鎖結合 IL-2 改変体とも略す。)、IL-2 に PEG が結合することにより改変された IL-2 改変体 (以下、PEG 結合 IL-2 改変体とも略す。) が挙げられる。以下、各改変体について説明する。

【0126】

[糖鎖結合 IL-2 改変体]

10

20

30

40

50

本発明のＩＬ－２改変体の一実施形態としては、ＩＬ－２のアミノ酸配列における１１、１２、１３、１５、１６、１８、１９、２０、８４、８７、８８、９１、９２、１０８、１１５、１１９、１２２、１２３および１３０番目のアミノ酸残基から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基に糖鎖が結合しているＩＬ－２改変体が好ましい。

【０１２７】

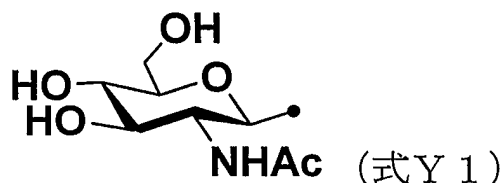
本明細書において、「糖鎖」とは、単糖または２以上の単糖がグリコシド結合という結合を介して結合したものをいい、いずれの糖鎖を用いることもできる。

【０１２８】

ＩＬ－２に結合する糖鎖としては、具体的には例えば、下記（式４）～（式８）および（式Ｙ１）～（式Ｙ３）で表される構造を有する糖鎖からなる群より選ばれる少なくとも１が挙げられる。ＩＬ－２のアミノ酸配列における前記アミノ酸残基に該糖鎖を結合させることにより、ＩＬ－２ $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性を向上させることができる。また、（式６）の $\alpha 1-6$ アーム、 $\alpha 1-3$ アームの Mannose (Man) のそれぞれに N-acetylglucosamine (GlcNAc) が１つ結合した糖鎖、（式７）の $\alpha 1-6$ アーム、 $\alpha 1-3$ アームの Man-GlcNAc のそれぞれから Galactose (Gal) が１つ除かれた糖鎖 (G1)、（式８）の非還元末端の Sialic acid (Sial) が１つ除かれた糖鎖、および（式Ｙ３）の非還元末端の Sial が１～４個除かれた糖鎖も本発明のＩＬ－２改変体の糖鎖に用いることができる。

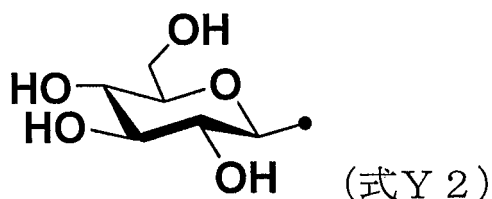
【０１２９】

【化５９】



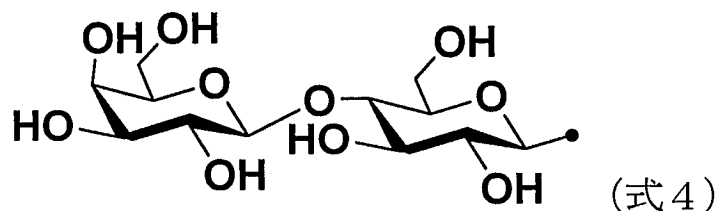
【０１３０】

【化６０】



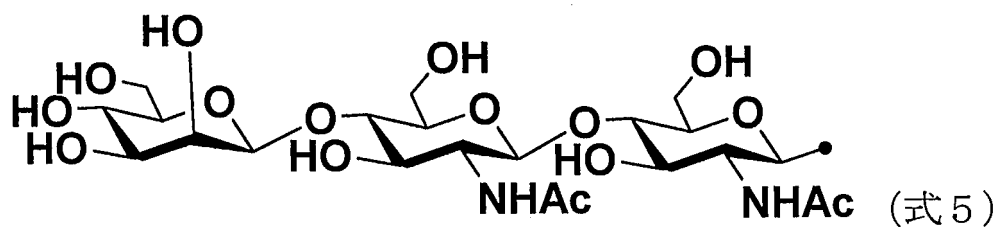
【０１３１】

【化６１】



【０１３２】

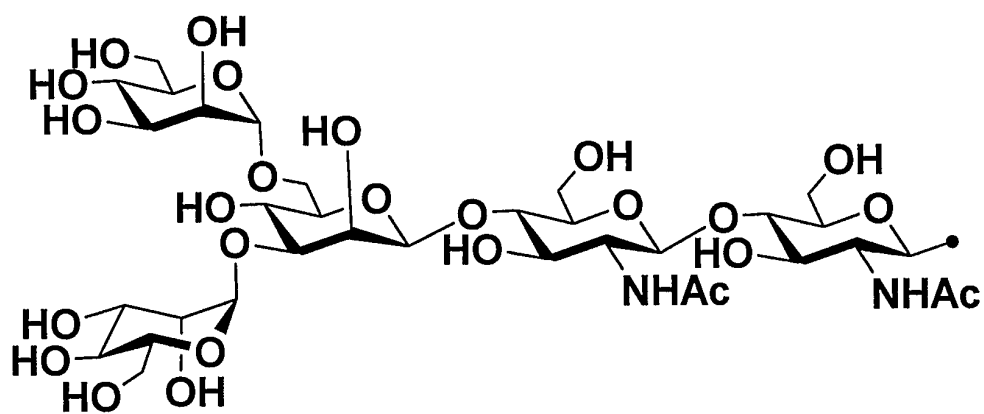
【化 6 2】



【 0 1 3 3】

10

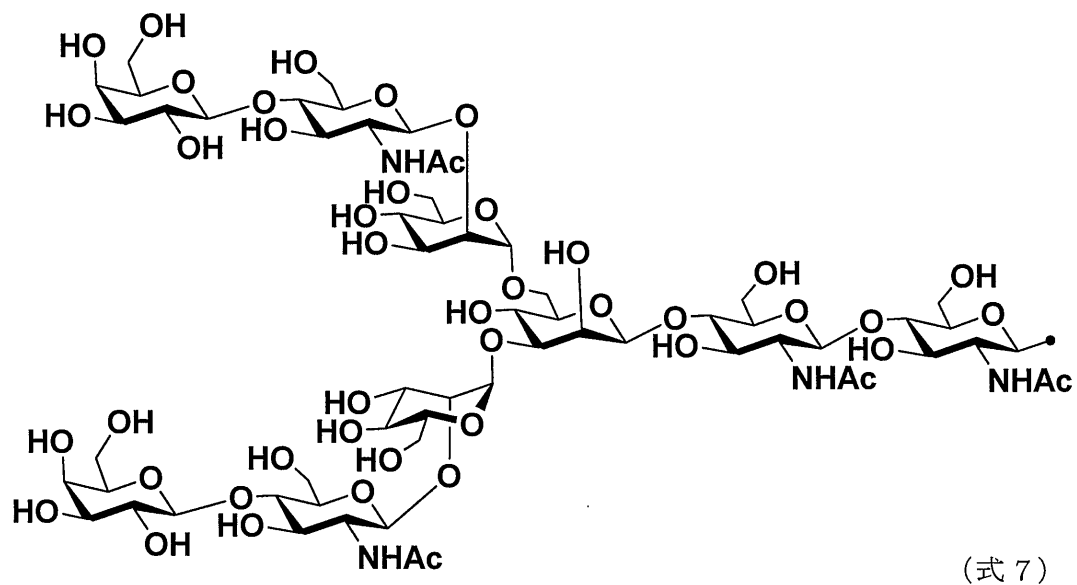
【化 6 3】



20

【 0 1 3 4】

【化 6 4】



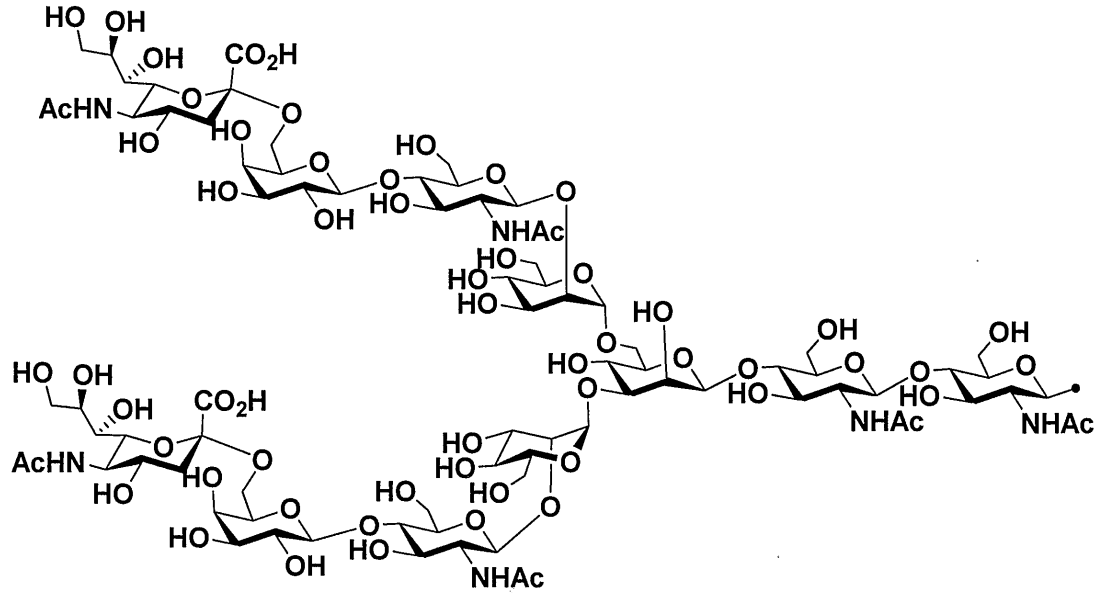
30

40

【 0 1 3 5】

50

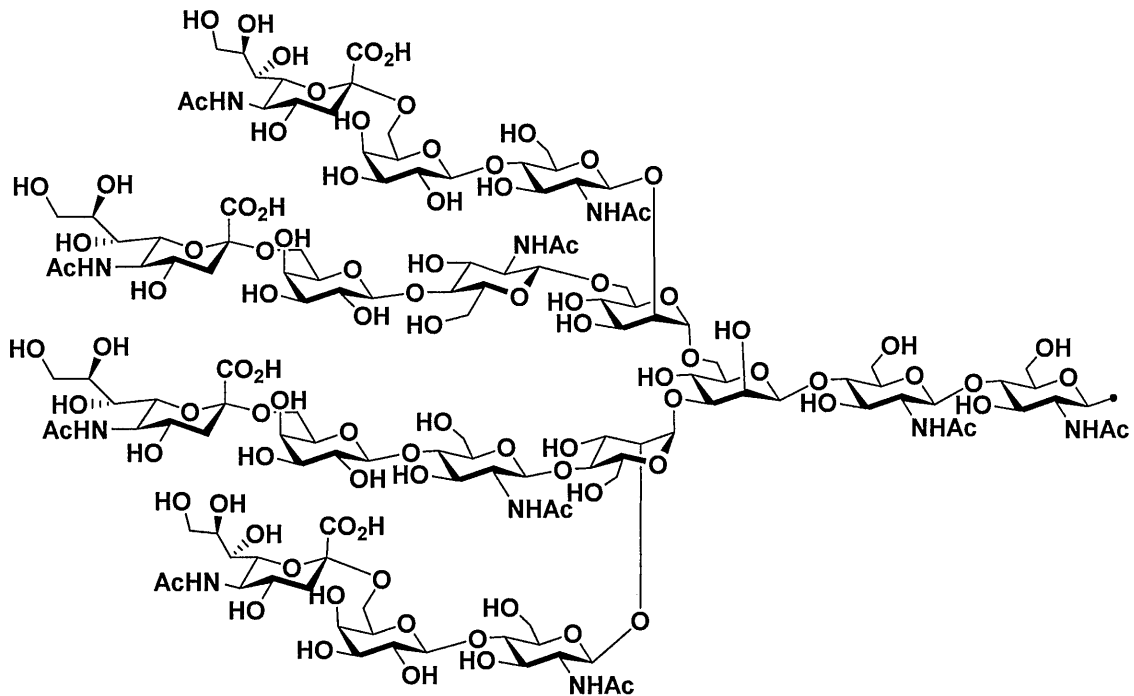
【化 6 5】



(式 8)

【 0 1 3 6】

【化 6 6】



(式 Y 3)

【 0 1 3 7】

本発明の IL-2 改変体の一実施形態としては、野生型 IL-2 のアミノ酸配列における、11、12、13、15、16、18、19、20、84、87、88、91、92、108、115、119、122、123 および 130 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含む IL-2 改変体が好ましく

、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列における、12、13、15、16、19、88、91 および 119 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含む I L - 2 改変体がより好ましい。

【0138】

本実施形態においては、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をセリン残基またはアラニン残基に置換したアミノ酸配列がより好ましい。

【0139】

システイン残基またはアスパラギン残基由来の基とは、それぞれシステイン残基の側鎖チオールまたはアスパラギン残基の側鎖アミドが修飾されている基をいう。

【0140】

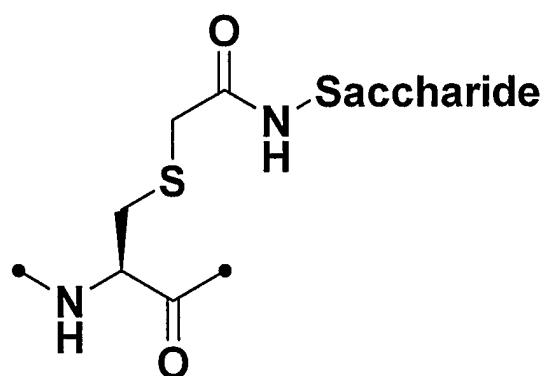
糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基とは、システイン残基の側鎖チオールまたはアスパラギン残基の側鎖アミドに化学修飾により糖鎖が結合した基をいう。システイン残基またはアスパラギン残基由来の基は、リンカー等により修飾されていてもよく、リンカーを介してシステイン残基またはアスパラギン残基と糖鎖とが結合していてもよい。

【0141】

糖鎖が結合したシステイン残基由来の基としては、例えば、下記（式 1）に示すように、システイン残基の側鎖チオールに CH_2CONH リンカーを介して糖鎖が結合した構造を有するアミノ酸残基が挙げられる。システイン残基の側鎖チオールと糖鎖とは、リンカーを介さずに結合していてもよい。

【0142】

【化 67】



【0143】

上記（式 1）中、S a c c h a r i d e は糖鎖を示す。

【0144】

糖鎖が結合したアスパラギン残基由来の基としては、例えば、下記（式 2）に示すように、アスパラギン残基の側鎖アミドに化学修飾により糖鎖が結合した構造が挙げられる。アスパラギン残基の側鎖アミドと糖鎖とは、リンカーを介して結合していてもよい。

【0145】

10

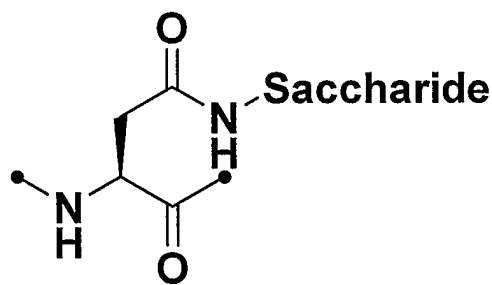
20

30

40

50

【化 6 8】



(式 2)

10

【0146】

上記(式 2)中、Saccharideは糖鎖を示す。

【0147】

本発明のIL-2 改変体の一実施形態としては、例えば野生型IL-2 のアミノ酸配列における、11、12、13、15、16、18、19、20、84、87、88、91、92、108、115、119、122、123 および 130 番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されたIL-2 改変体が挙げられる。

20

【0148】

野生型IL-2 に糖鎖が1つ結合したIL-2 改変体の例としては、以下に記載する物が挙げられる。

【0149】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、11 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

【0150】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、12 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

30

【0151】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、13 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

【0152】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、15 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

【0153】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、16 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

【0154】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、18 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

40

【0155】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、19 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

【0156】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、20 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、IL-2 改変体。

【0157】

・野生型IL-2 のアミノ酸配列において、84 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合した

50

アミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0158】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、87 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0159】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、88 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0160】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、91 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0161】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、92 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0162】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、108 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0163】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、115 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0164】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、119 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0165】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、122 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0166】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、123 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0167】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、130 番目のアミノ酸残基が、糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている、I L-2 改変体。

【0168】

上記 I L-2 改変体において、結合している糖鎖はいずれの糖鎖であってもよいが、例えば(式4)、(式5)、(式6)、(式7)、(式8)または(式Y3)で示される構造を持つ糖鎖が挙げられる。

【0169】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、11 番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0170】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、12 番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式7)または(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0171】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、13 番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式4)または(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0172】

・野生型 I L-2 のアミノ酸配列において、15 番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r

10

20

30

40

50

i d eの構造が(式4)、(式8)または(式Y3)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0173】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、16番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)、(式5)、(式6)または(式7)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0174】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、18番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)または(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

10

【0175】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、19番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)、(式7)、(式8)、または(式Y3)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0176】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、20番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)または(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

20

【0177】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、84番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0178】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、87番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)または(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0179】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、88番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)、(式7)または(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

30

【0180】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)、(式7)または(式8)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0181】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、92番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)で示される構造である、I L-2 改変体。

40

【0182】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、108番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)または(式7)で示される構造である、I L-2 改変体。

【0183】

・野生型I L-2のアミノ酸配列において、115番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のS a c c h a r i d eの構造が(式4)で示される構造である、I L-2 改変体。

50

【0184】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、119番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式4)または(式7)で示される構造である、IL-2改変体。

【0185】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、122番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式4)で示される構造である、IL-2改変体。

【0186】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、123番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式8)で示される構造である、IL-2改変体。

【0187】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、130番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式4)または(式7)で示される構造である、IL-2改変体。

【0188】

本発明の一実施形態としては、野生型IL-2に少なくとも2つの糖鎖を結合させたIL-2改変体も挙げられる。野生型IL-2に2つの糖鎖を結合させた例としては、野生型IL-2のアミノ酸配列における1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127および130番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも2つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されたアミノ酸配列を含むIL-2改変体が挙げられる。

【0189】

野生型IL-2に糖鎖が2つ結合したIL-2改変体の例としては、野生型IL-2のアミノ酸配列における1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127および130番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる1つのアミノ酸残基、および、11、12、18、20、84、87、88、91、108、115、119、122および123番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる1つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含むIL-2改変体が好ましい。

【0190】

本発明の具体的なIL-2改変体の一実施形態としては、以下に示すものが挙げられる。

【0191】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、8番目および19番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2改変体。

【0192】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目および16番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2改変体。

【0193】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、15番目および119番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2改変体。

【0194】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、19番目および23番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2改変体。

【0195】

10

20

30

40

50

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12 番目および 91 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0196】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12 番目および 115 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0197】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12 番目および 119 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0198】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、13 番目および 91 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

10

【0199】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、13 番目および 115 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0200】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、13 番目および 119 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0201】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、19 番目および 115 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

20

【0202】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、91 番目および 115 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0203】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、91 番目および 119 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0204】

上記 I L - 2 改変体において、結合している糖鎖はいずれの糖鎖であってもよいが、例えば（式 4）または（式 8）で示される構造を持つ糖鎖が挙げられる。

【0205】

30

また、本発明の具体的な I L - 2 改変体の一実施形態としては、以下に示すものも挙げられる。

【0206】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、8 番目および 19 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の S a c c h a r i d e の構造が（式 8）である I L - 2 改変体。

【0207】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12 番目および 16 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ 12 番目に結合する（式 1）の S a c c h a r i d e の構造が（式 8）であり、かつ 16 番目に結合する（式 1）の S a c c h a r i d e の構造が（式 4）であり、I L - 2 改変体。

40

【0208】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、15 番目および 119 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の S a c c h a r i d e の構造が（式 8）である I L - 2 改変体。

【0209】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、19 番目および 23 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の S a c c h a r i d e の構造が（式 8）である I L - 2 改変体。

【0210】

50

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、12 番目および 91 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0211】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、12 番目および 115 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0212】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、12 番目および 119 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

10

【0213】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、13 番目および 91 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0214】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、13 番目および 115 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0215】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、13 番目および 119 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

20

【0216】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、19 番目および 115 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0217】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、91 番目および 115 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

30

【0218】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、91 番目および 119 番目のアミノ酸残基が（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0219】

本発明の一実施形態としては、野生型 IL-2 に少なくとも 3 つ糖鎖を結合させた IL-2 改変体も挙げられる。野生型 IL-2 に 3 つの糖鎖を結合させた例としては、野生型 IL-2 のアミノ酸配列における 1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127 および 130 番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも 3 つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されたアミノ酸配列を含む IL-2 改変体が挙げられる。

40

【0220】

また、野生型 IL-2 に糖鎖が 3 つ結合した例としては、野生型 IL-2 のアミノ酸配列における 1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127 および 130 番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸残基と、11、12、18、20、84

50

、 87、88、91、108、115、119、122および123番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含むIL-2変体がより好ましい。

【0221】

本発明の一実施形態としては、野生型IL-2に少なくとも4つ糖鎖を結合させたIL-2変体も挙げられる。野生型IL-2に4つの糖鎖を結合させた例としては、野生型IL-2のアミノ酸配列における1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127および130番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも4つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されたアミノ酸配列を含むIL-2変体が挙げられる。

10

【0222】

また、野生型IL-2に糖鎖が4つ結合した例としては、野生型IL-2のアミノ酸配列における1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127および130番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基と、11、12、18、20、84、87、88、91、108、115、119、122および123番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含むIL-2変体がより好ましい。

20

【0223】

本発明の一実施形態としては、野生型IL-2に少なくとも5つ糖鎖を結合させたIL-2変体も挙げられる。野生型IL-2に5つの糖鎖を結合させた例としては、野生型IL-2のアミノ酸配列における1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127および130番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる5つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されたアミノ酸配列を含むIL-2変体が挙げられる。

30

【0224】

また、野生型IL-2に糖鎖が5つ結合した例としては、野生型IL-2のアミノ酸配列における1、3、4、5、8、11、12、13、15、16、18、19、20、23、32、38、51、76、84、87、88、91、92、100、102、104、108、115、119、122、123、127および130番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基と、1、3、5、12、32、51、76、91、100、102および104番目のアミノ酸残基からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、糖鎖が結合したシステイン残基またはアスパラギン残基由来の基に置換されているアミノ酸配列を含むIL-2変体がより好ましい。

40

【0225】

本発明のIL-2変体の一実施形態としては、以下に示すものが挙げられる。

【0226】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、3番目、12番目、32番目、76番目および91番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0227】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、1番目、3番目、5番目、12番目および91番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されているIL-

50

2 改変体。

【0228】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、3 番目、12 番目、51 番目、91 番目および 100 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている IL-2 改変体。

【0229】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、3 番目、12 番目、76 番目、91 番目および 100 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている IL-2 改変体。

【0230】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、12 番目、91 番目、100 番目、102 番目および 104 番目のアミノ酸残基が、それぞれ糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換されている IL-2 改変体。

【0231】

上記 IL-2 改変体において、結合している糖鎖はいずれの糖鎖でもよいが、例えば（式 8）で示される構造を持つ糖鎖が挙げられる。

【0232】

また、本発明の IL-2 改変体の一実施形態としては、以下に示すものも挙げられる。

【0233】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、3 番目、12 番目、32 番目、76 番目および 91 番目のアミノ酸残基が、（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0234】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、1 番目、3 番目、5 番目、12 番目および 91 番目のアミノ酸残基が、（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0235】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、3 番目、12 番目、51 番目、91 番目および 100 番目のアミノ酸残基が、（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0236】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、3 番目、12 番目、76 番目、91 番目および 100 番目のアミノ酸残基が、（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0237】

・野生型 IL-2 のアミノ酸配列において、12 番目、91 番目、100 番目、102 番目および 104 番目のアミノ酸残基が、（式 1）に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ（式 1）の Saccharide の構造が（式 8）である IL-2 改変体。

【0238】

本実施形態においては、野生型 IL-2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をセリン残基またはアラニン残基に置換したアミノ酸配列がより好ましい。

【0239】

[糖鎖結合 IL-2 改変体の製造方法]

糖鎖結合 IL-2 改変体の製造方法としては、糖鎖結合ペプチドを化学合成した後にフ

10

20

30

40

50

オールディングさせる手法（化学合成法）、または野生型 I L - 2 のアミノ酸配列における糖鎖導入位置のアミノ酸残基を糖鎖が結合し得るアミノ酸残基へと置換した I L - 2 改変体が大腸菌などの宿主細胞により発現させた後に、糖鎖が結合し得るアミノ酸残基へ糖鎖を結合させる方法（発現法）が挙げられる。

【0240】

本明細書において「ペプチド」とは、複数のアミノ酸残基がペプチド結合を介して鎖状につながったものをいう。特に記載のない場合は、各アミノ酸残基の側鎖には保護基を含んでいてもよく、N末端のアミノ基、C末端のカルボキシル基が修飾されていてもよい。

【0241】

糖鎖結合 I L - 2 改変体は、化学合成法および発現法の組み合わせによって製造されてもよい。以下、各方法について説明する。

【0242】

（化学合成法による糖鎖結合 I L - 2 改変体の製造）

化学合成法においては、少なくとも一つ以上の糖鎖結合ペプチドフラグメントとペプチドフラグメントとを順次連結させた後にフォールディングさせることにより糖鎖結合 I L - 2 改変体を製造することが好ましい。

【0243】

連結させるペプチドフラグメントと糖鎖結合ペプチドフラグメントの総数として、好ましくは2～15個のフラグメント、より好ましくは2～5個のフラグメントを用いることが好ましい。糖鎖結合ペプチドフラグメントおよびペプチドフラグメントはチオエステル化し、糖鎖結合ペプチドチオエステルおよびペプチドチオエステルとして連結させてもよい。

【0244】

ペプチドフラグメント、ペプチドチオエステルを合成する方法としては、例えば、ペプチド合成で常用される方法〔例えば、第5版 実験化学講座16 有機化合物の合成IV：カルボン酸・アミノ酸・ペプチド（日本化学会編、丸善株式会社、2005年）、Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification（Luca D. DiAndreaら著、Wiley、2017年）等に記載の方法〕が挙げられる。

【0245】

この際、ペプチドの溶解性を向上させるなどのために、2アミノ酸の代わりにシュードプロリン（J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 9218-9227）またはイソペプチド（Angew. Chem. Int. Ed., 2015, 54, 8226-8230）を使用することも出来る。

【0246】

また、ペプチドフラグメント、ペプチドチオエステルを合成する方法としては、例えば、ペプチド固相合成法の代わりに高橋らによって開発されたAjiPhase技術（Tetrahedron Lett., 2012, 53, 1936.）、および岡田らによって開発されたMolecular Hivving技術（J. Org. Chem., 2013, 78, 320-327）などの液相合成法が挙げられる。

【0247】

また、ペプチドフラグメントを合成する方法としては、例えば、従来公知の方法に従い、例えば、ポリメラーゼ連鎖増幅反応（PCR）、プラスミドDNAの調製、制限酵素によるDNAの切断、オリゴヌクレオチドの調製、DNAのライゲーション、mRNAの単離、適切な宿主細胞へのDNAの導入による形質転換体の取得、形質転換体の培養を含む組換えDNA法により製造する方法、または無細胞タンパク質発現法（Current Opinion in Biotechnology 2002, 13:297-303）などに記載の方法が挙げられる。ペプチドチオエステルを合成する方法としては、例えば、（Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:6705-6710）などに記載の方法が挙げられる。

【0248】

ペプチドフラグメント、ペプチドチオエステルなどに糖鎖を結合させる方法としては、例えば、ペプチドフラグメントのシステイン残基の側鎖チオールに糖鎖を結合させる場合

10

20

30

40

50

、特許第4607017号公報などに記載の方法が挙げられる。また、例えば、ペプチドフラグメントのアスパギン残基の側鎖アミドに糖鎖を結合させる場合、特許第4119428号公報などに記載の方法が挙げられる。また、糖鎖の製造方法としては、例えば、国際公開第03/008431号に記載の方法などが挙げられる。

【0249】

ペプチドフラグメントおよび／または糖鎖結合ペプチドフラグメントを連結する方法としては、ペプチド合成で常用される方法〔例えば、第5版 実験化学講座16 有機化合物の合成IV：カルボン酸・アミノ酸・ペプチド（日本化学会編、丸善株式会社、2005年）、Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification (Luca D. DiAndreaら著、Wiley、2017年)、Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions Volume 1、2 (W.Russ Algarら著、Wiley、2017年) 等に記載の方法〕が挙げられ、C末端をチオエステルとしたペプチドフラグメントと、N末端がシステイン残基である別のペプチドフラグメントとのネイティブケミカルライゲーション (NCL) 法が好ましい。

【0250】

ペプチドフラグメントおよび／または糖鎖結合ペプチドフラグメントの連結は任意の箇所で行うことができるが、NCL法を用いる場合には、C末端側ペプチドフラグメントのN末端アミノ酸残基としてはシステイン残基およびアラニン残基が好ましく、より好ましくはシステイン残基である。

【0251】

ペプチドフラグメントおよび／または糖鎖結合ペプチドフラグメントを連結する方法としては、具体的には例えば、C末端側フラグメントのN末端アミノ酸残基としてアラニン残基を用いる場合には、定法〔Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification (Luca D. DiAndreaら著、Wiley、2017年) 等に記載の方法〕に従い、アラニン残基をシステインへ残基と置換したC末端側ペプチドフラグメントとN末端側ペプチドチオエステルフラグメントとをNCL法により連結した後に脱硫反応によりシステイン残基をアラニンへ残基と変換する方法が挙げられる。

【0252】

糖鎖結合ペプチドをフォールディングする方法としては、例えば、ペプチドのフォールディングで常用される方法〔例えば、第5版 実験化学講座16 有機化合物の合成IV：カルボン酸・アミノ酸・ペプチド（日本化学会編、丸善株式会社、2005年）、Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification (Luca D. DiAndreaら著、Wiley、2017年) 等に記載の方法〕が挙げられる。

【0253】

(発現法による糖鎖結合IL-2改変体の製造)

発現法においては、糖鎖結合IL-2改変体は、従来公知の方法に従い、例えば、ポリメラーゼ連鎖増幅反応 (PCR)、プラスミドDNAの調製、制限酵素によるDNAの切断、オリゴヌクレオチドの調製、DNAのライゲーション、mRNAの単離、適切な宿主細胞へのDNAの導入による形質転換体の取得、形質転換体の培養を含む組換えDNA法、および化学修飾による糖鎖導入により製造できる。

【0254】

糖鎖結合IL-2改変体は、例えば、野生型IL-2のアミノ酸配列において、糖鎖が結合し得るアミノ酸残基を含むように変異が導入されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む発現カセットを適切な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に該発現ベクターを導入して、得られたタンパク質に化学修飾で糖鎖を結合させることにより、糖鎖結合IL-2改変体を得ることができる。

【0255】

上記発現ベクターの作製に用いる野生型IL-2をコードする塩基配列としては、NCBIアクセッションNo. NM_000586で表される塩基配列からシグナル配列をコードする塩基配列を除いた塩基配列、配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩

10

20

30

40

50

基配列などが挙げられる。

【0256】

IL-2をコードする塩基配列は、人工遺伝子合成や、日本DNAデータバンク（DDBJ）など遺伝子バンクに登録された配列から適当なプライマーを設計し、当該動物の細胞または組織等から抽出したmRNAよりRT-PCRを行うことにより取得できる。

【0257】

また、糖鎖結合IL-2改変体は、上記発現ベクターを目的の糖鎖を生合成できる宿主細胞に導入することにより、得ることもできる。

【0258】

前記発現ベクターは、具体的には例えば、前記変異が導入されたIL-2をコードする塩基配列を所望の位置（例えば、5'末端）に組み込んだ発現に適したベクター中のプロモーターの下流に連結することにより、発現ベクターを得ることができる。当該発現ベクターは、宿主に合わせて分泌シグナルを有していてもよい。

【0259】

糖鎖が結合し得るアミノ酸残基を含むように野生型IL-2のアミノ酸配列に部位特異的に変異を導入する方法としては、公知の方法を用いることができる（米国特許出願公開2004/0171154号明細書；Storici et al, 2001, Nature Biotechnology, 19, p.773-776；Kren et al, 1998, Nat. Med., vol.4, p.285-290；Calissano and Macino, 1996, Fungal Genet. News lett., Vol. 43, p.15-16）。また、部位特異的な変異の導入には、市販のキットを用いてもよい。

【0260】

具体的には、例えば、糖鎖が結合し得るアミノ酸残基としてシステイン残基を用いる場合、野生型IL-2のアミノ酸残基をシステイン残基に置換したIL-2改変体は、米国特許第5206344号明細書、国際公開第2016/025385号等に記載の方法に従い調製することが出来、該IL-2改変体への糖鎖の結合は、特許第4607017号公報に記載の方法に従い行うことができる。

【0261】

IL-2をコードする塩基配列を含む領域は、5'末端に翻訳開始コドンを含み、また、3'末端には翻訳終始コドンを含んでいてもよい。また、IL-2をコードする塩基配列を発現させるには、その上流にプロモーターを接続することが好ましい。

【0262】

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応したプロモーターであれば特に制限されない。形質転換する宿主が枯草菌である場合は、例えば、SP01、SP02およびPenPプロモーターが挙げられる。宿主が酵母である場合は、例えば、PH05、PGK、GAPおよびADHプロモーターが挙げられる。宿主が大腸菌の場合は、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター等が挙げられる。宿主が動物細胞である場合は、例えば、SV40由来のプロモーターおよびレトロウイルスのプロモーターが挙げられる。

【0263】

IL-2タンパク質はE. coli内でシグナル配列を伴わずに発現させることもでき、該タンパク質は、封入体から回収し、活性形態へとリフォールディングさせることができる。このような発現系は米国特許第7105653号明細書に記載されている。

【0264】

シグナル配列を使用して、IL-2タンパク質の発現を容易にすることもできる。哺乳動物細胞のシグナル配列としては、例えば、天然ヒトIL-2シグナル配列、TCRコード配列と相同なシグナル配列、マウスIL-2コード配列と相同なシグナル配列が挙げられる。また、他の適切なシグナル配列／宿主細胞対としては、例えば、B. subtilis内で分泌させるためのB. subtilis sacBシグナル配列、およびP. pastorisによる分泌のためのSaccharomyces cerevisiae α接合因子シグナル配列、またはP. pastoris酸ホスファターゼphoIシグナ

10

20

30

40

50

ル配列を含む。シグナル配列は、シグナルペプチダーゼ切断部位をコードする配列を介して、タンパク質コード配列へと直接接続することもでき、短いヌクレオチド架橋を介して接続することもできる。

【0265】

真核生物タンパク質発現系の転写および翻訳を増強するためのエレメントを用いてもよく、例えば、異種プロモーターの両側1000bpの位置に、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)プロモーターを置くことにより、植物細胞内の転写レベルを、10～400倍高めることができる。

【0266】

宿主細胞としては、特に限定されず、原核細胞および真核細胞が挙げられる。好ましい宿主細胞としては、例えば、*E. coli*、*Bacillus subtilis*などの原核細胞、並びにHEK、J558、NSO、SP2-O、CHO、COS、KB、NIH3T3、BALB/c3T3、臍帯静脈内皮細胞等の動物細胞および*S. cerevisiae*、*Pichia pastoris*等の酵母株およびSf9またはTn等などの昆虫細胞が挙げられる。

【0267】

宿主細胞は、目的の糖鎖の生合成ができるように改変されたものであってもよい。

【0268】

宿主の形質転換は、それぞれの宿主について一般的に行われている方法または適応可能な方法であればよい。例えば、宿主が大腸菌や酵母であれば、リチウム法などで作製したコンピテント細胞に組み換えDNAを含む発現ベクターを温度ショック法またはエレクトロポレーション法により導入する。宿主が動物細胞であれば、増殖期等の細胞に組み換えDNAを含む発現ベクターをリン酸カルシウム法、リポフェクション法またはエレクトロポレーション法により導入する。

【0269】

このようにして得られた形質転換体は、それぞれの宿主に一般的に用いられている培地、あるいは適用可能な培養液を用いて培養してタンパク質を発現させ、必要に応じてさらに化学修飾で糖鎖を結合させることにより、糖鎖結合型IL-2タンパク質を製造することができる。培養液としては、例えば、宿主が大腸菌である場合はLB培地などの培養液、宿主が酵母である場合はYPD培地などの培養液、宿主が動物細胞である場合はDulbecco's MEMにウシ胎児血清を加えた培養液が挙げられる。

【0270】

培養は、それぞれの宿主について一般的に用いられている条件あるいは適用可能な条件であればよい。例えば、宿主が酵母であれば、約25～37℃にて約12時間～2週間培養を行い、必要により、通気や攪拌を加えることができる。宿主が動物細胞の場合は、37℃にて、5%炭酸ガス、100%湿度の条件で約24時間～2週間培養を行い、必要により、気相の条件を変化または攪拌してもよい。

【0271】

[PEG結合IL-2改変体]

本発明のIL-2改変体の一実施形態としては、IL-2のアミノ酸配列における、4、5、6、7、8、60、78、79、99、100、101および129番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基にPEGが結合している改変体が好ましく、78および129番目の少なくとも一方のアミノ酸残基にPEGが結合しているIL-2改変体がより好ましい。

【0272】

本発明のIL-2改変体の一実施形態としては、野生型IL-2のアミノ酸配列における、4、5、6、7、8、60、78、79、99、100、101および129番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、PEGが結合したアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を含むIL-2改変体が好ましく、78および129番目の少なくとも一方のアミノ酸残基が、PEGが結合したアミノ酸残基に置

10

20

30

40

50

換されているアミノ酸配列を含む I L - 2 改変体がより好ましい。

【0273】

本実施形態において、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損したアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損しメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列もしくは配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損したアミノ酸配列、および配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損しメチオニン残基が結合したアミノ酸配列において、125 番目のアミノ酸残基をセリン残基またはアラニン残基に置換したアミノ酸配列がより好ましい。

10

【0274】

「PEG」とは、「 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 」(n は 2 以上) で表されるエチレングリコールが重合した構造を含む水溶性ポリマーである、ポリ(エチレングリコール)分子である。PEG としては、PEG 4、平均分子量 10 kDa 以上のものが好ましく、例えば、平均分子量 10 kDa、20 kDa、30 kDa、40 kDa、50 kDa、60 kDa、70 kDa、80 kDa、90 kDa、100 kDa、200 kDa 等が挙げられるが、特に限定されない。また PEG の形状としては、直鎖状でもよいし、分岐鎖状でもよいが、これらに限定されない。I L - 2 のアミノ酸配列における前記アミノ酸残基に PEG を化学的に結合させることにより、I L - 2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性を向上させることができる。I L - 2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ に対する選択性を向上させた I L - 2 改変体により、Treg を選択的に活性化させることができる。

20

【0275】

PEG が結合したアミノ酸残基としては、例えば PEG が結合したシステイン残基および非天然アミノ酸残基が挙げられる。

【0276】

PEG が結合した非天然アミノ酸残基としては、例えば、PEG が結合したチオール基を有するアミノ酸残基由来の基並びに PEG が結合したアジド基を有するアミノ酸残基由来の基が挙げられる。チオール基を有するアミノ酸残基としては、具体的には例えば、アセチルシステイン、ホモシステインなどが挙げられるが、これらに限定されない。アジド基を有するアミノ酸残基としては、具体的には例えば、o-Az-Z-Lys 残基、m-Az-Z-Lys 残基、N⁶-ジアゾリジン、p-アジドフェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されない。非天然アミノ酸残基としては、他に、国際公開第 2017/030156 号、[Nature, 2017 Nov 29;551(7682):644-647.]、国際公開第 2013/068874 号、米国出願公開第 2014/0046030 号明細書、[Bioconj. Chem., 2014, 25 (2), pp 351-361]、国際公開第 2014/044872 号、[Bioconj. Chem. 2015 Nov 18;26(11):2249-60]、国際公開第 2014/124258 号、[Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28;108(26):10437-42]等に記載される非天然アミノ酸残基でもよい。PEG と上記非天然アミノ酸残基とは、リンカーを介して結合していてもよい。当該リンカーは PEG や非天然アミノ酸残基の種類に応じて適宜変更することができる。

30

40

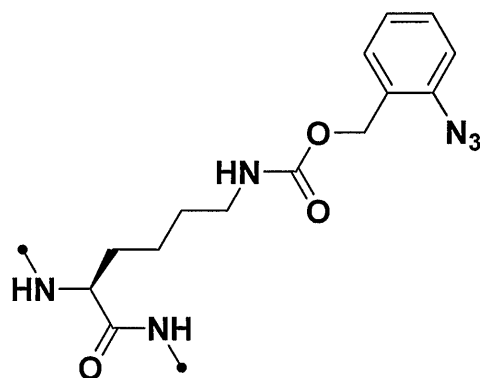
【0277】

前記 o-Az-Z-Lys 残基は、下記(式 10)で表される構造を有するアミノ酸残基である。

【0278】

50

【化 6 9】



(式 1 0)

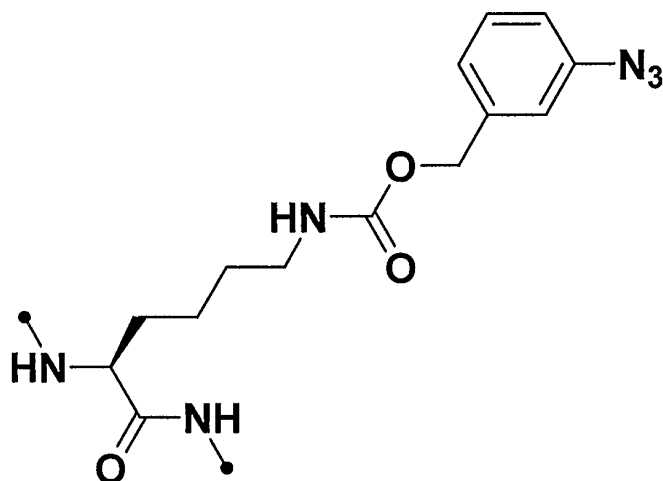
10

【 0 2 7 9】

前記 m -Az-Z-Lys 残基は、下記 (式 XX1) で表される構造を有するアミノ酸残基である。

【 0 2 8 0】

【化 7 0】



(式 XX1)

20

30

【 0 2 8 1】

PEG が結合した o -Az-Z-Lys 残基由来の基または PEG が結合した m -Az-Z-Lys 残基由来の基とは、 o -Az-Z-Lys 残基または m -Az-Z-Lys のアジド基にアセチレンを反応させてできたリンカーを介して、PEG が結合した構造が挙げられる。アセチレンとしては、例えば、Dibenzylcyclooctyne (DBCO)、Bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) 等が挙げられる。また、アセチレンの代わりに、[J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, pp 8820]、[Org. Lett. 2000, 2, pp2141]、[Org. Lett. 2000, 2, pp1939.]等に記載の方法に従い、アミド結合を介して、PEG が結合した構造等が挙げられるが、これらに限定されない。

40

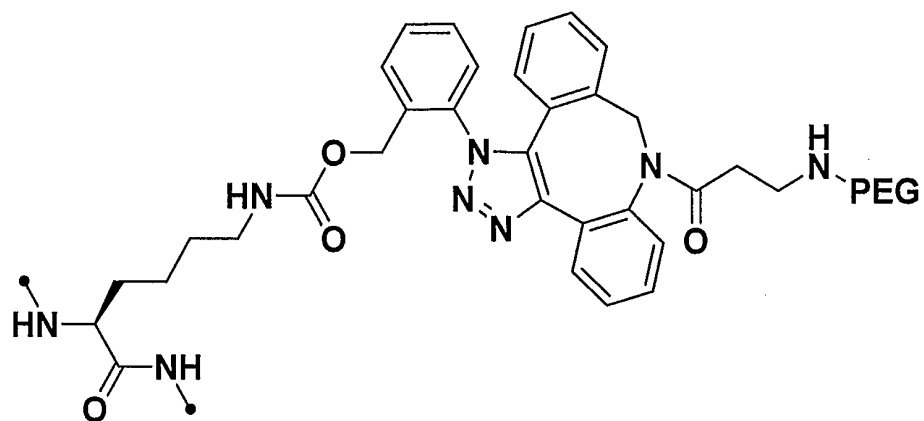
【 0 2 8 2】

PEG が結合した o -Az-Z-Lys 残基由来の基または m -Az-Z-Lys 残基由来の基は、具体的には例えば、下記 (式 1 1) および／または (式 1 2)、または下記 (式 Y 4) および／または (式 Y 5) で表される構造が挙げられる。

【 0 2 8 3】

50

【化 7 1】

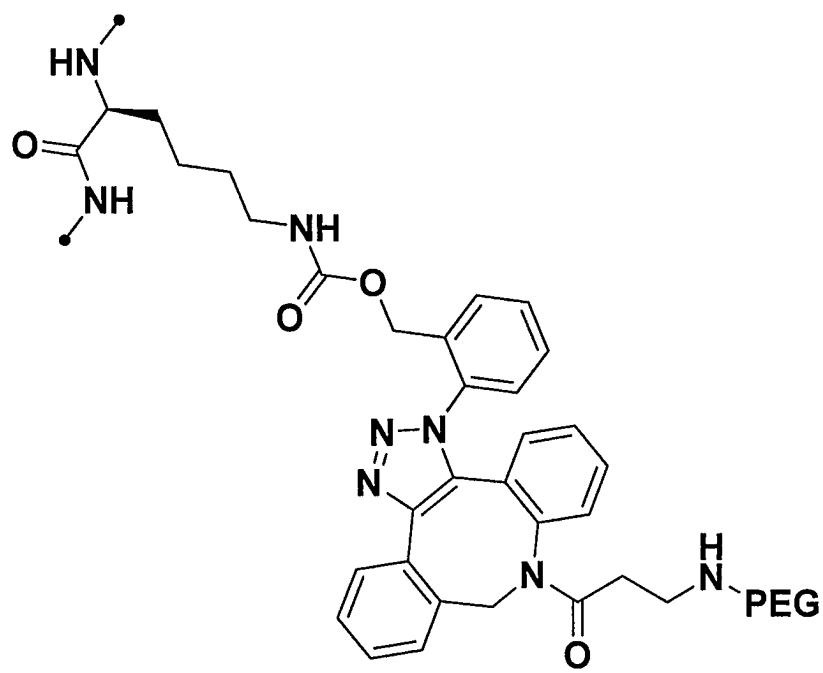


10

(式 1 1)

【 0 2 8 4】

【化 7 2】



20

30

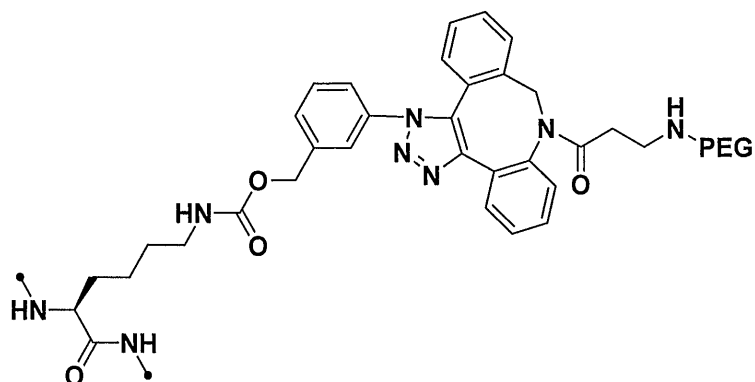
(式 1 2)

【 0 2 8 5】

40

50

【化 7 3】

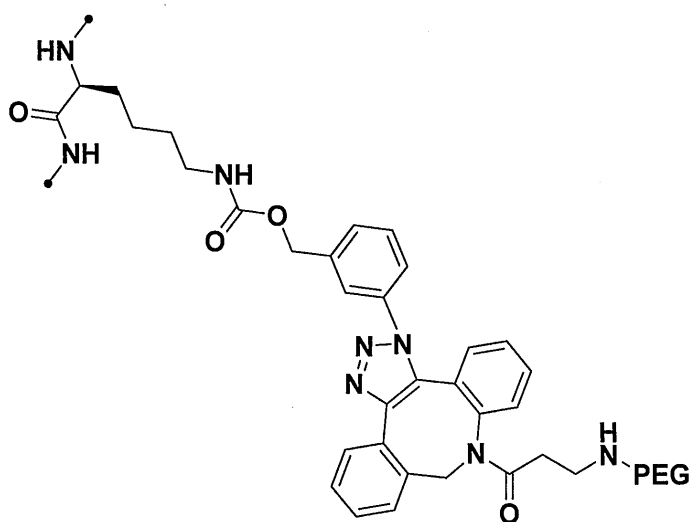


(式 Y 4)

10

【 0 2 8 6】

【化 7 4】



(式 Y 5)

20

30

【 0 2 8 7】

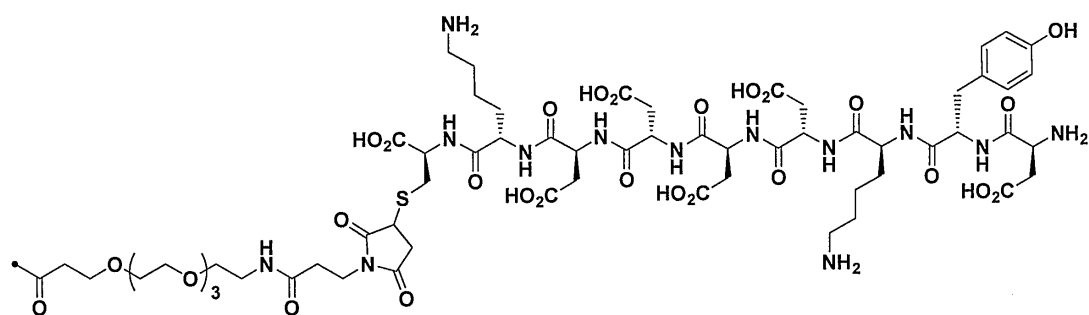
式中 PEG としては、PEG の平均分子量や構造により多様な PEG を用いることができる。具体的には例えば、下記（式 13）、平均分子量 20 kDa である場合の下記式（14）、平均分子量 30 kDa である場合の下記式（14）、平均分子量 40 kDa である場合の下記（式 X0）、平均分子量 50 kDa である場合の下記（式 15）、平均分子量 40 kDa である場合の下記（式 16）、平均分子量 80 kDa である場合の下記（式 16）、平均分子量 40 kDa である場合の下記（式 X1）、平均分子量 80 kDa である場合の下記（式 X2）または平均分子量 40 kDa である場合の下記（式 X3）で表される構造が挙げられるが、これらに限定されない。また、式中 PEG が下記（式 X3）で表される場合、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_3$ の 4 分岐鎖に限らず、2 分岐鎖または 3 分岐鎖のものも同様に用いることができる。

40

【 0 2 8 8】

50

【化 7 5】

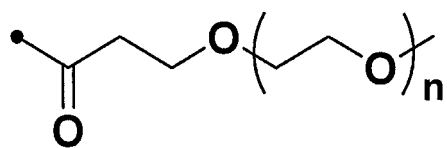


10

(式 1 3)

【 0 2 8 9】

【化 7 6】

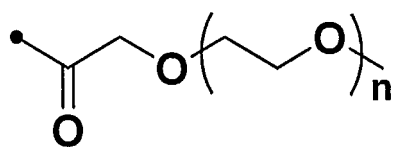


20

(式 1 4)

【 0 2 9 0】

【化 7 7】

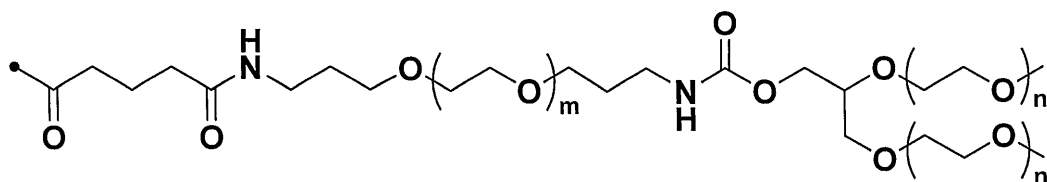


30

(式 X 0)

【 0 2 9 1】

【化 7 8】



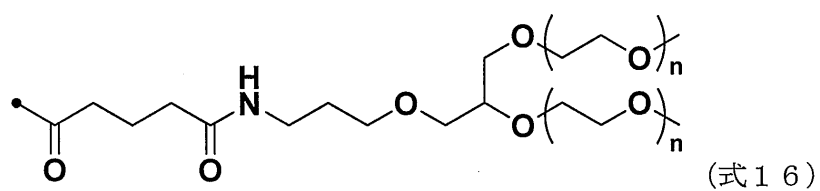
40

(式 1 5)

【 0 2 9 2】

50

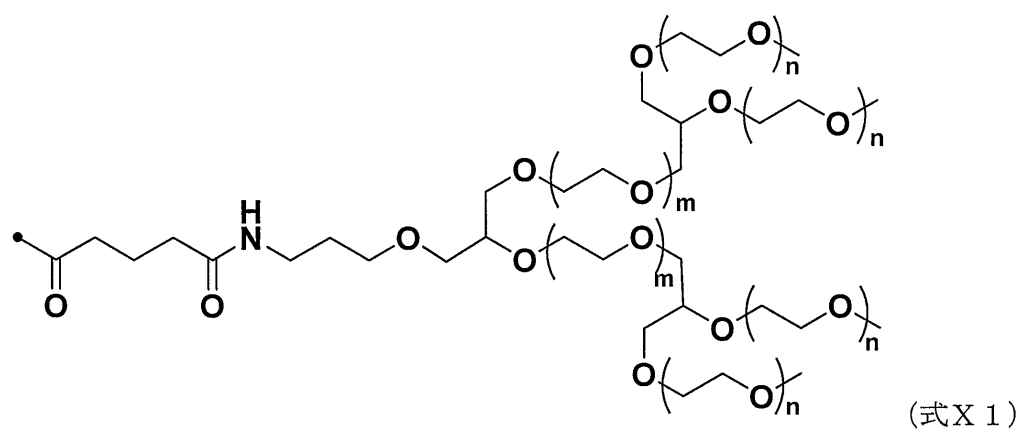
【化 7 9】



【 0 2 9 3】

10

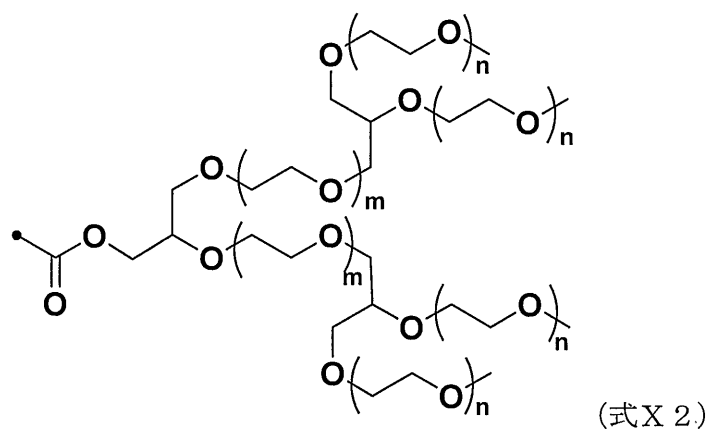
【化 8 0】



20

【 0 2 9 4】

【化 8 1】



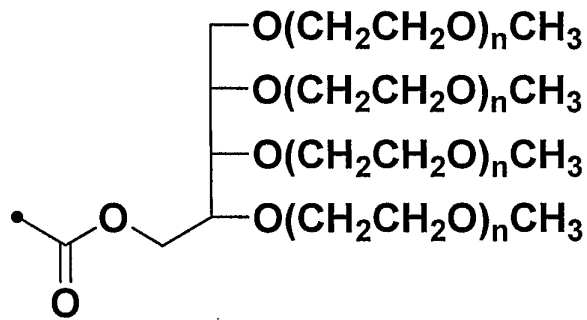
30

【 0 2 9 5】

40

50

【化 8 2】



(式 X 3)

10

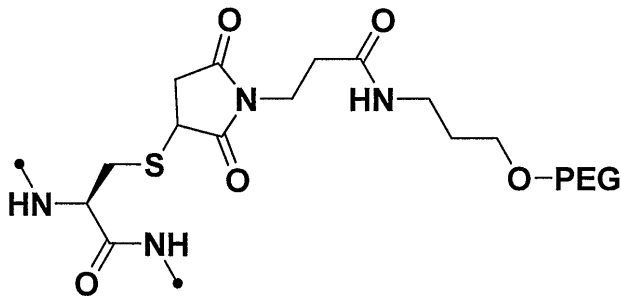
【 0 2 9 6】

P E Gが結合したシステイン残基由来の基とは、具体的には例えば、システイン残基のチオール基にマレイミドを反応させてできたリンカーを介してP E Gが結合した下記（式 Y 6）および／または（式 Y 7）および／または（式 Y 8）で表される構造、システイン残基のチオール基にハロアセチル基を反応させてできたリンカーを介してP E Gが結合した下記（式 Y 9）で表される構造などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 9 7】

【化 8 3】

20

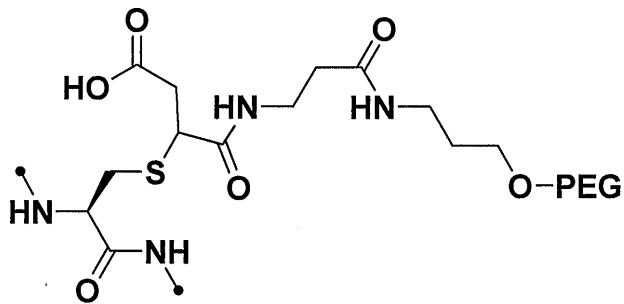


(式 Y 6)

30

【 0 2 9 8】

【化 8 4】



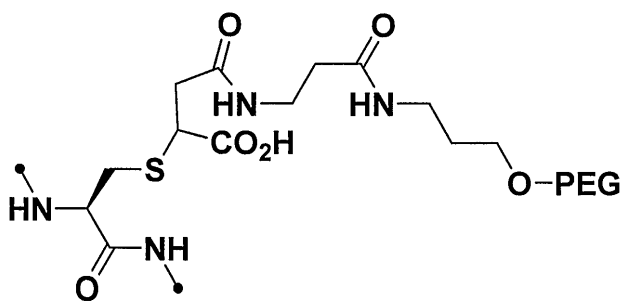
(式 Y 7)

40

【 0 2 9 9】

50

【化 8 5】

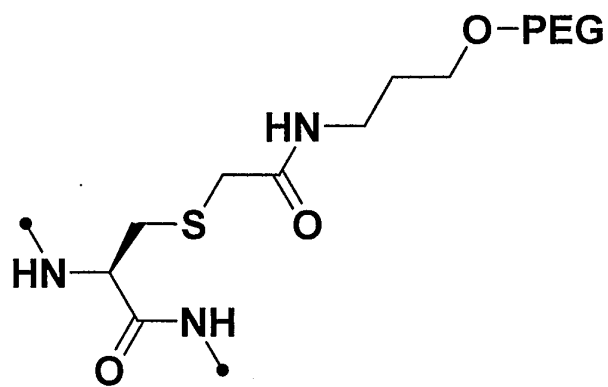


(式 Y 8)

10

【 0 3 0 0】

【化 8 6】



(式 Y 9)

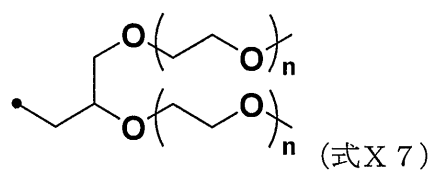
20

【 0 3 0 1】

式中 PEG とは、具体的には例えば、平均分子量 40 kDa である場合の (式 X 7) または平均分子量 80 kDa である場合の (式 X 7) または平均分子量 80 kDa である場合の (式 X 8) で表される構造が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 3 0 2】

【化 8 7】



(式 X 7)

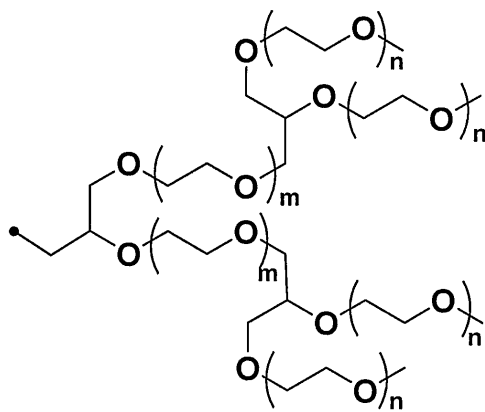
30

【 0 3 0 3】

40

50

【化 8 8】



(式 X 8)

10

【0304】

本発明の I L - 2 改変体の一実施形態としては、以下に記載する I L - 2 改変体が好ましい。

【0305】

本発明の I L - 2 改変体の一実施形態としては、例えば I L - 2 に 1 つの P E G が結合した、以下に記載する I L - 2 改変体が挙げられる。

20

【0306】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、4 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0307】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、5 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0308】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、6 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

30

【0309】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、7 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0310】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、8 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換された I L - 2 改変体。

【0311】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、60 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0312】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、78 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

40

【0313】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、79 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0314】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、99 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【0315】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、100 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合

50

したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【 0 3 1 6 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、1 0 1 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【 0 3 1 7 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、1 2 9 番目のアミノ酸残基が、P E G が結合したアミノ酸残基に置換されている I L - 2 改変体。

【 0 3 1 8 】

上記の I L - 2 改変体において、結合する P E G の大きさとしては、平均分子量 2 0 k D a 以上の P E G が好ましく、例えば平均分子量 2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、または 8 0 k D a の P E G が挙げられる。

【 0 3 1 9 】

本発明の I L - 2 改変体の一実施形態としては、例えば I L - 2 に 1 つの P E G が結合した、以下に記載する I L - 2 改変体も挙げられる。

【 0 3 2 0 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、4 番目のアミノ酸残基が、平均分子量 2 0 k D a または平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【 0 3 2 1 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、5 番目のアミノ酸残基が、平均分子量 2 0 k D a または平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【 0 3 2 2 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、6 番目のアミノ酸残基が、平均分子量 2 0 k D a または平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【 0 3 2 3 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、7 番目のアミノ酸残基が、平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【 0 3 2 4 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、8 番目のアミノ酸残基が、平均分子量 2 0 k D a または平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【 0 3 2 5 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、6 0 番目のアミノ酸残基が、平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【 0 3 2 6 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、7 8 番目のアミノ酸残基に平均分子量 2 0 k D a または平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4)、平均分子量 4 0 k D a である場合の (式 X 0)、平均分子量 5 0 k D a である場合の (式 1 5)、平均分子量 4 0 k D a または 8 0 k D a である場合の (式 1 6)、平均分子量 4 0 k D a である場合の (式 X 1)、平均分子量 8 0 k D a である場合の (式 X 2) または平均分子量 4 0 k D a である場合の (式 X 3) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【 0 3 2 7 】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、7 9 番目のアミノ酸残基が、平均分子量 2 0 k D a または平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

10

20

30

40

50

【0328】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、99番目のアミノ酸残基が、平均分子量30kDaである場合の(式14)で表されるPEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基に置換されたIL-2改変体。

【0329】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、100番目のアミノ酸残基が、平均分子量20kDaである場合の(式14)で表されるPEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基に置換されたIL-2改変体。

【0330】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、101番目のアミノ酸残基が、平均分子量20kDaまたは平均分子量30kDaである場合の(式14)で表されるPEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基に置換されたIL-2改変体。

10

【0331】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、129番目のアミノ酸残基に(式13)、あるいは平均分子量20kDaまたは平均分子量30kDaである場合の(式14)、平均分子量40kDaである場合の(式X0)、平均分子量40kDaまたは80kDaである場合の(式16)、平均分子量40kDaである場合の(式X1)、平均分子量80kDaである場合の(式X2)、平均分子量50kDaである場合の(式15)または平均分子量40kDaである場合の(式X3)で表されるPEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基に置換されたIL-2改変体。

20

【0332】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、129番目のアミノ酸残基が、40kDaである場合の(式16)で表されるPEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基に置換されたIL-2改変体。

【0333】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、129番目のアミノ酸残基が、平均分子量40kDaまたは80kDaである場合の(式X7)および/または(式X8)で表されるPEGが結合したシステイン残基由来の基に置換されたIL-2改変体。

【0334】

本発明のIL-2改変体の一実施形態としては、IL-2に少なくとも2つのPEGが結合した以下に記載するIL-2改変体が好ましい。

30

【0335】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、4番目および78番目のアミノ酸残基が、それぞれPEGが結合したアミノ酸残基に置換されたIL-2改変体。

【0336】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、5番目および78番目のアミノ酸残基が、それぞれPEGが結合したアミノ酸残基に置換されたIL-2改変体。

【0337】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、8番目および78番目のアミノ酸残基が、それぞれPEGが結合したアミノ酸残基に置換されたIL-2改変体。

40

【0338】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、78番目および79番目のアミノ酸残基が、それぞれPEGが結合したアミノ酸残基に置換されたIL-2改変体。

【0339】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、78番目および99番目のアミノ酸残基が、それぞれPEGが結合したアミノ酸残基に置換されたIL-2改変体。

【0340】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、78番目および129番目のアミノ酸残基が、それぞれPEGが結合したアミノ酸残基に置換されたIL-2改変体。

【0341】

50

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、4 番目および 1 2 9 番目のアミノ酸残基が、それぞれ P E G が結合したアミノ酸残基に置換された I L - 2 改変体。

【0342】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、5 番目および 1 2 9 番目のアミノ酸残基が、それぞれ P E G が結合したアミノ酸残基に置換された I L - 2 改変体。

【0343】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、8 番目および 1 2 9 番目のアミノ酸残基が、それぞれ P E G が結合したアミノ酸残基に置換された I L - 2 改変体。

【0344】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、7 9 番目および 1 2 9 番目のアミノ酸残基が、それぞれ P E G が結合したアミノ酸残基に置換された I L - 2 改変体。

10

【0345】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、9 9 番目および 1 2 9 番目のアミノ酸残基が、それぞれ P E G が結合したアミノ酸残基に置換された I L - 2 改変体。

【0346】

上記の I L - 2 改変体において、結合する P E G の大きさとしては、平均分子量 2 0 k D a 以上の P E G が好ましく、例えば平均分子量 2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、もしくは 8 0 k D a の P E G が挙げられる。

【0347】

本発明の I L - 2 改変体の一実施形態としては、I L - 2 に少なくとも 2 つの P E G が結合した、以下に記載する I L - 2 改変体も好ましい。

20

【0348】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、4 番目および 7 8 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0349】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、4 番目および 7 8 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 4 0 k D a である場合の (式 X 0) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0350】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、4 番目および 7 8 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 5 0 k D a である場合の (式 1 5) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

30

【0351】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、5 番目および 7 8 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0352】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、5 番目および 7 8 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 4 0 k D a である場合の (式 X 0) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

40

【0353】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、8 番目および 7 8 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4)、平均分子量 4 0 k D a である場合の (式 X 0) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0354】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、7 8 番目および 7 9 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 3 0 k D a である場合の (式 1 4) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

50

【0355】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、78 番目および 99 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 30 k D a である場合の (式 14) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0356】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、78 番目および 129 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 30 k D a である場合の (式 14) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0357】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、4 番目および 129 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 30 k D a である場合の (式 14)、平均分子量 40 k D a である場合の (式 X0) または平均分子量 50 k D a である場合の (式 15) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

10

【0358】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、5 番目および 129 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 30 k D a である場合の (式 14)、平均分子量 40 k D a である場合の (式 X0) または平均分子量 50 k D a である場合の (式 15) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0359】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、8 番目および 129 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 30 k D a である場合の (式 14)、平均分子量 40 k D a である場合の (式 X0) または平均分子量 50 k D a である場合の (式 15) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

20

【0360】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、79 番目および 129 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 30 k D a である場合の (式 14) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

【0361】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、99 番目および 129 番目のアミノ酸残基が、それぞれ平均分子量 30 k D a である場合の (式 14) で表される P E G が結合した o - A z - Z - L y s 残基由来の基に置換された I L - 2 改変体。

30

【0362】

本実施形態において、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損したアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損しかつメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列もしくは配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損したアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端アラニン残基が欠損しかつメチオニン残基が結合したアミノ酸配列において、125 番目のアミノ酸残基をセリン残基またはアラニン残基に置換したアミノ酸配列が好ましい。

40

【0363】

[P E G 結合 I L - 2 改変体の製造法]

P E G 結合 I L - 2 改変体の製造方法としては、化学合成法と発現法が挙げられる。P E G 結合 I L - 2 改変体は、化学合成法および発現法の組み合わせによって製造されてもよい。以下、各方法について説明する。

【0364】

(化学合成法による P E G 結合 I L - 2 改変体の製造)

化学合成法による P E G 結合 I L - 2 改変体の製造方法としては、例えば、野生型 I L

50

ー 2 のアミノ酸配列における P E G 導入位置のアミノ酸残基をタンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基へと置換したペプチドを化学合成した後に、フォールディングさせて得られる I L - 2 改変体に対し、P E G を結合させて P E G 結合 I L - 2 改変体を製造する手法、および P E G 結合ペプチドフラグメントを化学合成した後にフォールディングさせることにより P E G 結合 I L - 2 改変体を製造する方法が挙げられる。

【 0 3 6 5 】

P E G 結合ペプチドフラグメントは、ペプチドフラグメントにおけるタンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基へ P E G を導入する方法により製造することができる。

【 0 3 6 6 】

P E G 結合ペプチドフラグメントを化学合成した後にフォールディングさせる方法としては、少なくとも一つ以上の P E G 結合ペプチドフラグメントとペプチドフラグメントを順次連結させた後にフォールディングする方法、または化学合成した I L - 2 全長ペプチドフラグメントに対して P E G を導入した後にフォールディングさせる方法等が挙げられる。

【 0 3 6 7 】

ペプチドフラグメントを合成する方法、およびペプチドフラグメントを順次連結させた後にフォールディングさせる方法としては、例えば、（化学合成法による糖鎖結合 I L - 2 改変体の製造）の項において上記した方法と同様の方法が挙げられる。

【 0 3 6 8 】

野生型 I L - 2 のアミノ酸配列における P E G 導入位置のアミノ酸残基をタンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基へと置換したペプチドを合成したのち、フォールディングにより得られる I L - 2 改変体に対し、P E G を導入する方法としては、例えば、米国特許第 5 2 0 6 3 4 4 号明細書、国際公開第 2 0 1 2 / 0 6 5 0 8 6 号に記載の方法が挙げられる。また、ペプチドフラグメントにおけるタンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基へ P E G を導入する方法としては[Biomaterials 22 (2001) 405-417]、[Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 25831-25864]、[J. Pharm. Sci., 105 (2016) 460-475]に記載の方法が挙げられる。

【 0 3 6 9 】

タンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基としては、例えば、チオール基を有するアミノ酸残基並びにアジド基を有するアミノ酸残基が挙げられる。チオール基を有するアミノ酸残基としては、例えば、システイン、アセチルシステイン、ホモシステインなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 3 7 0 】

アジド基を有するアミノ酸残基としては、例えば、o - A z - Z - L y s 残基、m - A z - Z - L y s 残基、N⁶ - アジドリジン、p - アジドフェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されない。他には、国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 0 1 5 6 号、[Nature. 2017 Nov 29;551(7682):644-647.]、国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 8 8 7 4 号、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 6 0 3 0 号明細書、[Bioconj. Chem., 2014, 25 (2), pp351-361]、国際公開第 2 0 1 4 / 0 4 4 8 7 2 号、[Bioconj. Chem. 2015 Nov 18;26(11):2249-60]、国際公開第 2 0 1 4 / 1 2 4 2 5 8 号、[Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28;108(26):10437-42]に記載される非天然アミノ酸残基でもよい。P E G と上記非天然アミノ酸残基とは、リンカーを介して結合していてもよい。

【 0 3 7 1 】

上記リンカーとは、炭素数 1 ~ 2 0 の炭化水素基であり、炭素が酸素、窒素、硫黄などで修飾されていてもよく、また炭素が酸素、窒素、硫黄に置換されていてもよい。当該リンカーは P E G や非天然アミノ酸残基の種類に応じて適宜変更することができる。

【 0 3 7 2 】

化学合成法としては、具体的には例えば、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列における P E G 導入位置のアミノ酸残基を、システインなどチオール基を有するアミノ酸残基および／または o - A z - Z - L y s 残基などアジド基を有するアミノ酸残基へと置換したペプチドを化学合成したのち、フォールディングにより得られる I L - 2 改変体に対し、P E G を導入して P E G 結合 I L - 2 改変体を製造する方法が挙げられる。システイン残基を導入した I L - 2 改変体に P E G を結合させる方法としては、米国特許第 5 2 0 6 3 4 4 号明細書に記載の方法などが挙げられる。

【 0 3 7 3 】

また、具体的には例えば、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列における P E G 導入位置のアミノ酸残基を、システインまたは非天然アミノ酸残基へと置換したペプチドを化学合成したのち、フォールディングにより得られる I L - 2 改変体に対し、P E G を導入して P E G 結合 I L - 2 改変体を製造する方法が挙げられる。

【 0 3 7 4 】

P E G 結合 I L - 2 改変体の合成には、下記（式 X X 2）で表す P E G 試薬を用いることができる。

【 0 3 7 5 】

【化 8 9 】



【 0 3 7 6 】

式中、X は、チオール基と反応性を有する官能基、アジド基と反応性を有する官能基、N 末端アミノ基と選択的に反応する官能基を示す。

【 0 3 7 7 】

チオールと反応性を有する官能基としては、具体的には例えば、チオール基、マレイミド基、アクリル基、ヨードアセチル基、ブロモアセチル基、クロロアセチル基などが挙げられ、好ましくはヨードアセチル基、マレイミド基が良い。

【 0 3 7 8 】

アジドと反応性を有する官能基としては、具体的には例えば、アセチレン基、D B C O 基、D B N 基、中員環構造上にヘテロ原子を含むシクロアルキン（Angew. Chem. Int. E d. 2015, 54, 1190-1194）、チオエステル基などが挙げられ、好ましくは D B C O が挙げられる。

【 0 3 7 9 】

N 末端アミノ基と選択的に反応する官能基としては、具体的には例えばアルデヒドなどが挙げられる。

【 0 3 8 0 】

式中、L i n k e r としては、炭素数 1 ～ 2 0 の炭化水素基であり、炭素が酸素、窒素、硫黄などで修飾されていてもよく、炭素が酸素、窒素、硫黄に置換されていてもよい。

【 0 3 8 1 】

式中、n は 0 または 1 を表す。

【 0 3 8 2 】

式中、P E G とは、「- (C H ₂ C H ₂ O) _m -」（m は 2 以上）で表されるエチレングリコールが重合した構造を含む水溶性ポリマーである、ポリ（エチレングリコール）分子である。P E G の分子量は、例えば、P E G 4、平均分子量 2 0 k D a、3 0 k D a、4 0 k D a、5 0 k D a、6 0 k D a、7 0 k D a、8 0 k D a、9 0 k D a、1 0 0 k D a、または 2 0 0 k D a 等が挙げられるが、特に限定されない。また P E G の形状としては、直鎖状でもよいし、分岐鎖状でもよいが、これらに限定されない。

【 0 3 8 3 】

用いる P E G 試薬によって、立体異性体、光学異性体、幾何異性体などが形成される場

10

20

30

40

50

合があるが、これらの異性体は公知の方法で分離して用いてもよく、混合物として用いてもよい。得られる I L - 2 改変体は巨大分子であるためこれら部分構造の異性体の構造的相違はほぼ影響しないものと考えられる。

【0384】

上記 P E G 試薬は、市販の P E G 試薬以外にも、市販の P E G 試薬から調製した P E G 試薬を使用することもできる。例えば、末端にカルボキシル基や N - ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのカルボン酸等価体を有する P E G 試薬に対し、チオール基またはアジド基と反応性を有するアミンを縮合させることで、P E G 試薬を調製することができる。また、末端にアミノ基を有する P E G 試薬に対し、チオール基またはアジド基と反応性を有するカルボキシル基や N - ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのカルボン酸等価体を縮合することなどによっても合成することができるが、これらに限定されない。

10

【0385】

(発現法による P E G 結合 I L - 2 改変体の製造)

発現法による P E G 結合 I L - 2 改変体の製造方法としては、例えば、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列における P E G 導入位置のアミノ酸残基をタンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基に置換した I L - 2 改変体が大腸菌などの宿主細胞により発現させた後に、該 I L - 2 改変体における該アミノ酸残基へ化学修飾によって P E G を結合させることにより P E G 結合 I L - 2 改変体を製造する方法が挙げられる。

【0386】

20

具体的には、例えば、(発現法による糖鎖結合 I L - 2 改変体の製造)の項において上記した方法と同様にして、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列における P E G 導入位置に、タンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基への置換が導入されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む発現カセットを適切な発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを大腸菌などの宿主細胞に導入して形質転換体を得て、該形質転換体に I L - 2 改変体を発現させて、該 I L - 2 改変体のシステイン残基または非天然アミノ酸残基に化学修飾によって P E G を結合させることにより、P E G 結合 I L - 2 改変体を得る方法が挙げられる。

【0387】

大腸菌を宿主細胞とする場合、発現効率または作製したタンパク質の精製等のために、野生型 I L - 2 の N 末端にリンカーを導入して発現カセットを構成してもよい。該リンカーとしては、例えば、メチオニン残基、8 個のポリヒスチジン、およびメチオニン残基を含む 8 個のポリヒスチジン等が挙げられる。

30

【0388】

I L - 2 のアミノ酸残基をシステイン残基に置換した I L - 2 改変体の調製方法としては、例えば、米国特許第 5 2 0 6 3 4 4 号明細書、国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 5 3 8 5 号等に記載の方法が挙げられる。

【0389】

I L - 2 のアミノ酸残基をタンパク質の部位特異的な P E G 化を可能とする化学的反応性を有する非天然アミノ酸残基に置換した I L - 2 改変体の調製方法としては、国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 0 1 5 6 号、[Nature. 2017 Nov 29;551(7682):644-647.]、国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 8 8 7 4 号、米国特許出願公開 2 0 1 4 / 0 0 4 6 0 3 0 号明細書、[Bioconj. Chem., 2014, 25 (2), pp 351-361]、国際公開第 2 0 1 4 / 0 4 4 8 7 2 号、[Bioconj. Chem. 2015 Nov 18;26(11):2249-60]、国際公開第 2 0 1 4 / 1 2 4 2 5 8 号、[Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28;108(26):10437-42]、に記載される方法が挙げられる。

40

【0390】

また、I L - 2 のアミノ酸残基を o - A z - Z - L y s 残基または m - A z - Z - L y s 残基 o - A z - Z - L y s 残基に置換した I L - 2 改変体の製造方法、および当該 I L - 2 改変体に P E G を結合させる方法としては、例えば、国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 0 1

50

56号に記載の方法が挙げられる。

【0391】

IL-2のアミノ酸配列におけるPEG導入位置のアミノ酸残基をタンパク質の部位特異的なPEG化を可能とする化学的反応性を有するアミノ酸残基に置換したIL-2改変体対しPEGを導入する方法としては、日本国特許第5206344号公報、国際公開第2012/065086号、国際公開第2017/030156号、[Nature, 2017 Nov 29;551(7682):644-647.]、国際公開第2013/068874号、米国出願公開第2014/0046030号明細書、[Bioconj. Chem., 2014, 25 (2), pp 351-361]、国際公開第2014/044872号、[Bioconj. Chem. 2015 Nov 18;26(11):2249-60]、国際公開第2014/124258号、[Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28;108(26):10437-42]に記載の方法などに従いPEGを導入することができる。

10

【0392】

〔糖鎖結合IL-2改変体またはPEG結合IL-2改変体に、さらにPEGまたは糖鎖を結合させたIL-2改変体、およびその製造方法〕

上述した糖鎖結合IL-2改変体は、さらにPEGが結合していてもよい。また、上述したPEG結合IL-2改変体も、さらに糖鎖が結合していてもよい。これらIL-2改変体は、上述の〔糖鎖結合IL-2改変体の製造方法〕、および〔PEG結合IL-2改変体の製造方法〕を組み合わせることで製造することができる。また、国際公開第2012/065086号などに従い、N末端のアミノ基に選択的にPEGを導入することもできる。

【0393】

PEG結合IL-2改変体に対してさらに糖鎖を導入する場合、野生型IL-2のアミノ酸配列における、11、12、13、15、16、18、19、20、84、87、88、91、92、108、115、119、122、123および130番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1のアミノ酸残基に糖鎖が結合しているアミノ酸配列を含むIL-2改変体が好ましく、12、115および119番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基に糖鎖が結合しているIL-2改変体がより好ましい。

20

【0394】

糖鎖結合IL-2改変体に対してさらにPEGを導入する場合、野生型IL-2のアミノ酸配列における、1、3、4、5、6、7、8、51、60、78、79、99、100、101および129番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、PEGが結合したアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を含むIL-2改変体が好ましく、1、3、51および78番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が、PEGが結合したアミノ酸残基に置換されているアミノ酸配列を含むIL-2改変体がより好ましい。

30

【0395】

PEGが結合したアミノ酸残基としては、例えばPEGが結合したシステイン残基由来の基、N末端アミノ酸残基由来の基および非天然アミノ酸残基が挙げられる。

【0396】

システイン残基由来の基またはN末端アミノ酸残基由来の基とは、システイン残基の側鎖チオール基またはN末端アミノ酸残基の主鎖アミノ基に化学修飾などによりPEGが結合した基をいう。PEGと、システイン残基由来の基またはN末端アミノ酸残基由来の基とは、リンカーを介して結合していてもよい。当該リンカーはPEGや非天然アミノ酸残基の種類に応じて適宜変更することができる。

40

【0397】

PEGが結合した非天然アミノ酸残基としては、例えばチオール基を有するアミノ酸残基由来の基またはアジド基を有するアミノ酸残基由来の基に化学修飾などによりPEGが結合した基などが挙げられる。チオール基を有するアミノ酸残基由来の基としては、例えば、PEGが結合したアセチルシステイン残基由来の基、PEGが結合したホモシステイン残基由来の基などが挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0398】

PEGが結合したアジド基を有するアミノ酸残基由来の基としては、例えば、PEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基、PEGが結合したm-Az-Z-Lys残基由来の基、PEGが結合したN⁶-ジアゾリジン残基由来の基、PEGが結合したp-アジドフェニルアラニン残基由来の基などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0399】

非天然アミノ酸残基としては、他に、国際公開第2017/030156号、[Nature. 2017 Nov 29;551(7682):644-647.]、国際公開第2013/068874号、米国出願公開第2014/0046030号明細書、[Bioconj. Chem., 2014, 25 (2), pp 351-361]、国際公開第2014/044872号、[Bioconj. Chem. 2015 Nov 18;26(11):2249-60]、国際公開第2014/124258号、[Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28;108(26):10437-42]等に記載される非天然アミノ酸残基でもよい。PEGと上記非天然アミノ酸残基とは、リンカーを介して結合していてもよい。当該リンカーはPEGや非天然アミノ酸残基の種類に応じて適宜変更することができる。

【0400】

野生型IL-2のアミノ酸配列における1番目のアミノ酸残基を、PEGが結合したアミノ酸残基に置換する場合、PEGが結合したN末端アミノ酸残基由来の基、PEGが結合したシステイン残基由来の基、PEGが結合したアセチルシステイン残基由来の基、PEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基、PEGが結合したm-Az-Z-Lys残基由来の基が好ましく、PEGが結合したN末端アミノ酸残基由来の基、PEGが結合したアセチルシステイン残基由来の基がより好ましい。

【0401】

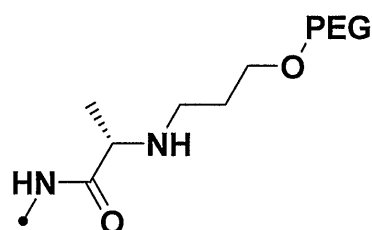
野生型IL-2のアミノ酸配列における3、4、5、6、7、8、51、60、78、79、99、100、101および129番目のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基をPEGが結合したアミノ酸残基に置換する場合、PEGが結合したシステイン残基由来の基、PEGが結合したo-Az-Z-Lys残基由来の基、PEGが結合したm-Az-Z-Lys残基由来の基が好ましく、PEGが結合したシステイン残基由来の基がより好ましい。

【0402】

PEGが結合したN末端アミノ酸残基由来の基とは、具体的には例えば、アラニン残基の主鎖アミノ基に対してアルデヒドを反応させてできたリンカーを介してPEGが結合された下記(式Z0)で表される構造などが挙げられる。

【0403】

【化90】



(式Z0)

【0404】

式中PEGとは、具体的には例えば、平均分子量20kDaである場合の下記(式X00)で表される構造が挙げられるがこれらに限定されない。

【0405】

10

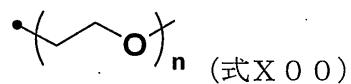
20

30

40

50

【化 9 1】

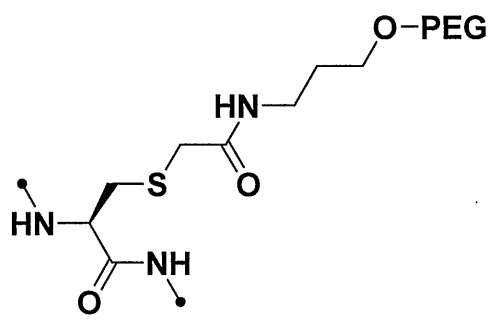


【 0 4 0 6】

P E Gが結合したシステイン残基由来の基とは、具体的には例えば、システイン残基の側鎖チオール基に対してハロアセチル基を反応させてできたリンカーを介してP E Gが結合された下記（式X 4）で表される構造、マレイミドを反応させてできたリンカーを介してP E Gが結合された下記（式X 5）および／または（式X 6）および／または（式X 7）などが挙げられる。

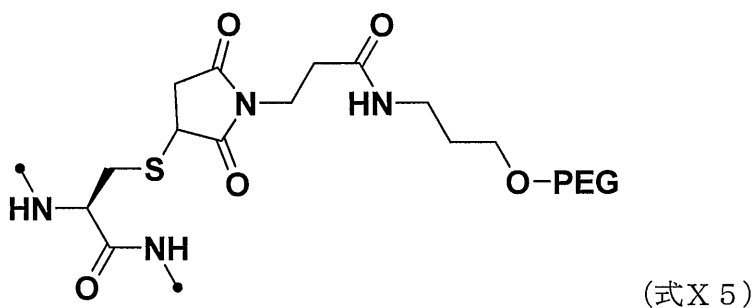
【 0 4 0 7】

【化 9 2】



【 0 4 0 8】

【化 9 3】



【 0 4 0 9】

10

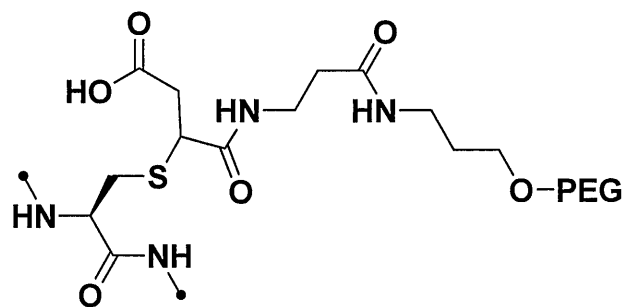
20

30

40

50

【化 9 4】

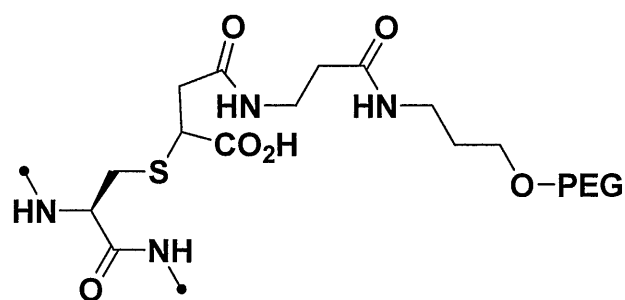


(式 X 6)

10

【 0 4 1 0】

【化 9 5】



(式 X 7)

20

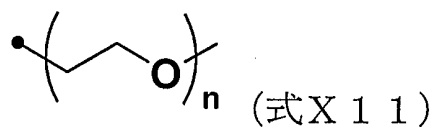
【 0 4 1 1】

式中 PEG として具体的には、平均分子量 20 kDa である場合の下記 (式 X 1 1)、平均分子量が 40 kDa である場合の下記 (式 X 1 1)、平均分子量が 40 kDa である場合の下記 (式 X 1 3)、平均分子量が 80 kDa である場合の下記 (式 X 1 3)、平均分子量が 40 kDa である場合の下記 (式 X 1 4)、平均分子量が 80 kDa である場合の下記 (式 X 1 4)、平均分子量が 50 kDa である場合の下記 (式 X 1 5) で表される構造が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【 0 4 1 2】

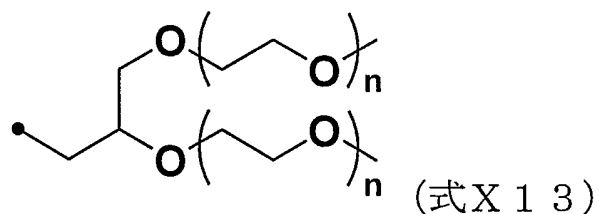
【化 9 6】



(式 X 1 1)

【 0 4 1 3】

【化 9 7】



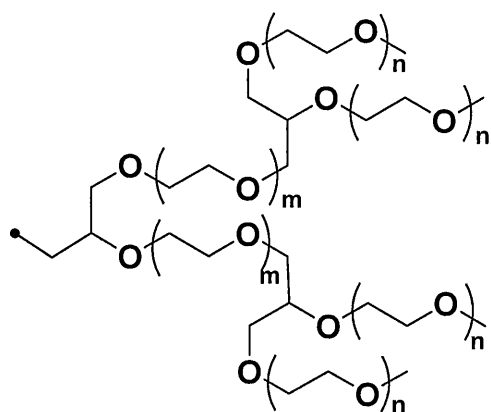
(式 X 1 3)

40

50

【 0 4 1 4 】

【 化 9 8 】

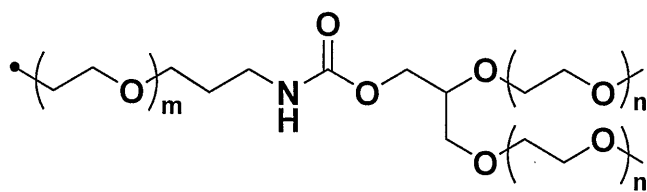


(式X 1 4)

10

【 0 4 1 5 】

【 化 9 9 】



(式X 1 5)

20

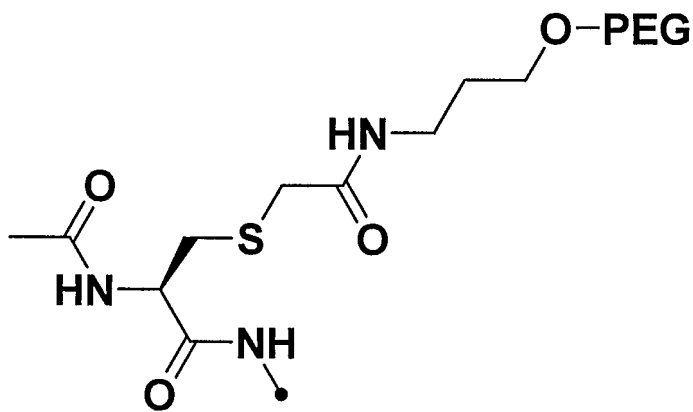
【 0 4 1 6 】

P E Gが結合したアセチルシステイン残基由来の基とは、具体的には例えば、アセチルシステイン残基の側鎖チオール基に対してハロアセチル基を反応させてできたリンカーを介してP E Gが結合された下記（式X X 3）で表される構造、マレイミドを反応させてできたリンカーを介してP E Gが結合された下記（式X 8）および／または（式X 9）および／または（式X 1 0）などが挙げられる。

30

【 0 4 1 7 】

【 化 1 0 0 】



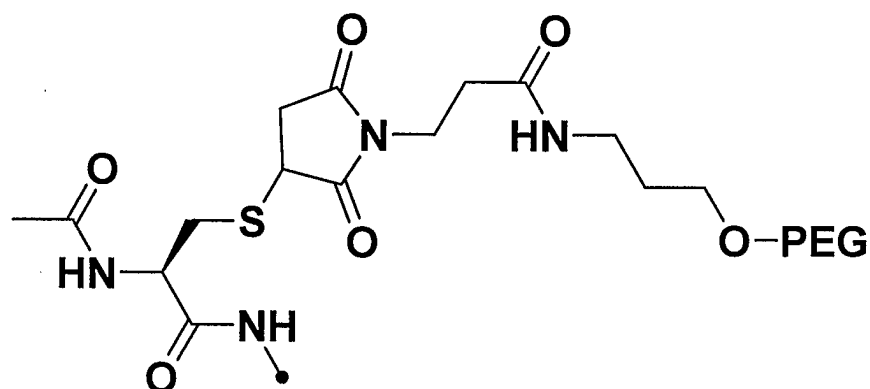
(式X X3)

40

【 0 4 1 8 】

50

【化 1 0 1】

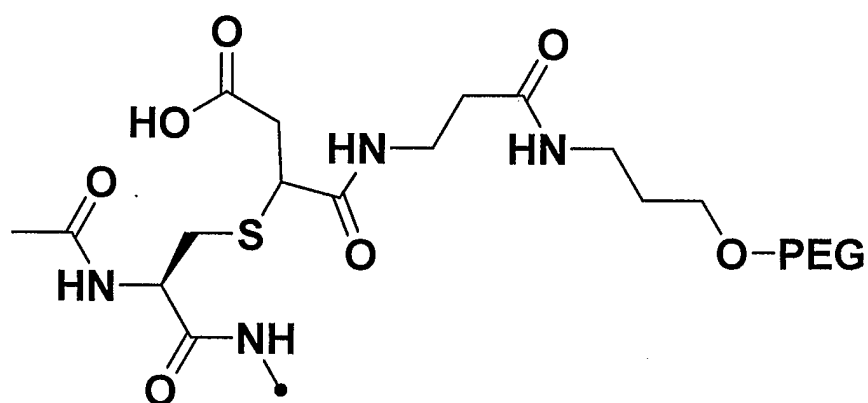


(式 X 8)

10

【 0 4 1 9】

【化 1 0 2】

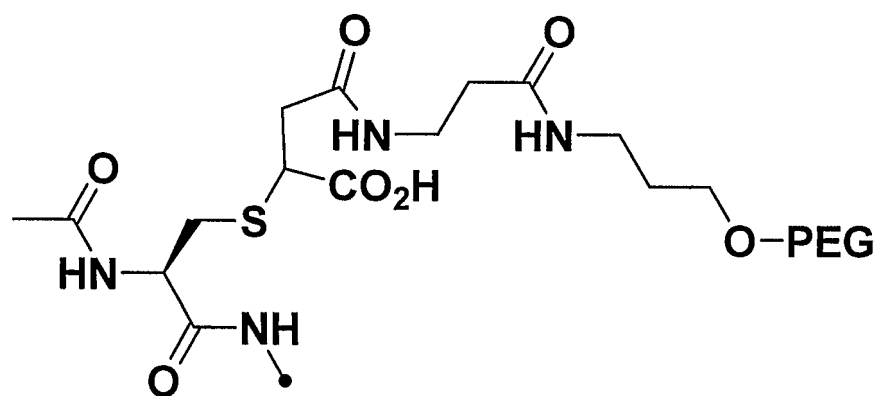


(式 X 9)

20

【 0 4 2 0】

【化 1 0 3】



(式 X 1 0)

30

40

【 0 4 2 1】

式中 PEG とは、具体的には例えば、平均分子量が 40 kDa である場合の上記 (式 X 1 1)、平均分子量が 40 kDa である場合の上記 (式 X 1 3)、平均分子量が 80 kDa である場合の上記 (式 X 1 3)、平均分子量が 80 kDa である場合の上記 (式 X 1 4)、平均分子量が 50 kDa である場合の上記 (式 X 1 5) で表される構造が挙げられる

50

がこれらに限定されない。

【0422】

本発明のIL-2変体の一実施形態としては、以下に記載するIL-2変体が好ましい。

【0423】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、11番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ1番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0424】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ1番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

10

【0425】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、19番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ1番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0426】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、38番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ1番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

20

【0427】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、91番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ1番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0428】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目および91番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ1番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0429】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、91番目および119番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ1番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

30

【0430】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目および91番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ3番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0431】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、15番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ3番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

40

【0432】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目および119番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ3番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0433】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目および91番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ51番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2変体。

【0434】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したア

50

ミノ酸残基に置換され、かつ78番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2改変体。

【0435】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目および119番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ78番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2改変体。

【0436】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、15番目のアミノ酸残基が糖鎖が結合したアミノ酸残基に置換され、かつ78番目のアミノ酸残基がPEGが結合したアミノ酸残基に置換されているIL-2改変体。

【0437】

上述本発明のPEG化、糖鎖結合IL-2改変体に結合させる糖鎖、PEGは、上述種々のものを組み合わせて用いることができる。

【0438】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、11番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式7)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式X0)に示すPEGが結合したN末端アミノ酸残基由来の基に置換されており、かつ(式X0)のPEGの構造が平均分子量20kDaである場合の(式X00)で示される構造である、IL-2改変体。

【0439】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式7)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式X0)に示すPEGが結合したN末端アミノ酸残基由来の基に置換されており、かつ(式X0)のPEGの構造が平均分子量20kDaである場合の(式X00)で示される構造である、IL-2改変体。

【0440】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、38番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式7)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式X0)に示すPEGが結合したN末端アミノ酸残基由来の基に置換されており、かつ(式X0)のPEGの構造が平均分子量20kDaである場合の(式X00)で示される構造である、IL-2改変体。

【0441】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式7)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式X0)に示すPEGが結合したN末端アミノ酸残基由来の基に置換されており、かつ(式X0)のPEGの構造が平均分子量20kDaである場合の(式X00)で示される構造である、IL-2改変体。

【0442】

・野生型IL-2のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基および91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)のSaccharideの構造が(式8)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式XX3)で表されるPEGが結合したアセチルシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式XX3)のPEGの構造が平均分子量40kDaである場合の(式X13)または平均分子量50kDaである場合の(式X15)で示される構造である、IL-2改変体。

【0443】

10

20

30

40

50

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基および91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式X8)および/または(式X9)および/または(式X10)で表される P E G が結合したアセチルシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X8)および/または(式X9)および/または(式X10)の P E G の構造が平均分子量 80 k D a である場合の(式X13)、または平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)、または平均分子量 80 k D a である場合の(式X14)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0444】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、19番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式XX3)で表される P E G が結合したアセチルシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式XX3)の P E G の構造が平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)、または平均分子量 40 k D a である場合の(式X13)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0445】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、91番目および119番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ1番目のアミノ酸残基が(式XX3)で表される P E G が結合したアセチルシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式XX3)の P E G の構造が平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0446】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基および91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 20 k D a である場合の(式X11)、または平均分子量 40 k D a である場合の(式X11)、または平均分子量 40 k D a である場合の(式X13)、または平均分子量 40 k D a である場合の(式X14)、または平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0447】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基および91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)の P E G の構造が平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0448】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式4)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)の P E G の構造が平均分子量 80 k D a である場合の(式X14)

10

20

30

40

50

で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0449】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式4)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)で示される構造である、I L - 2 改変体。

10

【0450】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、15番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 40 k D a である場合の(式X13)または平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0451】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、15番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)の P E G の構造が平均分子量 80 k D a である場合の(式X13)で示される構造である、I L - 2 改変体。

20

【0452】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基および119番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X5)および/または(式X6)および/または(式X7)の P E G の構造が平均分子量 80 k D a である場合の(式X13)、または均分子量 80 k D a である場合の(式X14)で示される構造である、I L - 2 改変体。

30

【0453】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基および119番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ3番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)で示される構造である、I L - 2 改変体。

40

【0454】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基および91番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ51番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 40 k D a である場合の(式X11)、または平均分子量 50 k D a である場合の(式X15)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0455】

50

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ78番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 40 k D a である場合の(式X11)、または平均分子量 40 k D a である場合の(式X13)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0456】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ78番目の(式X5)および／または(式X6)および／または(式X7)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X5)および／または(式X6)および／または(式X7)の P E G の構造が平均分子量 40 k D a または 80 k D a である場合の(式X13)、または均分子量 80 k D a である場合の(式X14)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0457】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目および119番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ78番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 40 k D a である場合の(式X13)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0458】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、12番目および119番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ78番目の(式X5)および／または(式X6)および／または(式X7)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X5)および／または(式X6)および／または(式X7)の P E G の構造が平均分子量 80 k D a である場合の(式X13)、または均分子量 80 k D a である場合の(式X14)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0459】

・野生型 I L - 2 のアミノ酸配列において、15番目のアミノ酸残基が(式1)に示す糖鎖が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式1)の S a c c h a r i d e の構造が(式8)で表される構造であり、かつ78番目のアミノ酸残基が(式X4)で表される P E G が結合したシステイン残基由来の基に置換されており、かつ(式X4)の P E G の構造が平均分子量 40 k D a である場合の(式X12)で示される構造である、I L - 2 改変体。

【0460】

本実施形態において、野生型 I L - 2 のアミノ酸配列は、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端アラニン残基が欠損したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端アラニン残基が欠損しメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、または配列番号1で表されるアミノ酸配列もしくは配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が結合したアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端アラニン残基が欠損したアミノ酸配列、および配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端アラニン残基が欠損しメチオニン残基が結合したアミノ酸配列において、125番目のアミノ酸残基をセリン残基またはアラニン残基に置換したアミノ酸配列が好ましい。

【0461】

本発明のIL-2改変体には、一般的に体内動態を改善することが知られている動態改善素子を結合させることで、血中半減期を制御することがきる。動態改善素子としては、糖鎖、ペプチド、タンパク質、脂質などがあげられ、[Therapeutic Proteins (Roland Kontermann編、Wiley Blackwell、2012年)]に記載の方法を組合せて用いることができる。具体的には、本発明のIL-2改変体のTreg細胞増殖活性の選択性に影響を与えないように、シアリル化、HESylation、O-グリコシル化、PEGミミックとしてのペプチド、タンパク質の融合、抗体の定常領域又はFc領域の融合、アルブミンなどの血清蛋白質との融合（脂質導入してアルブミンと融合させる方法も含む）、またはリン脂質、ナノ粒子との結合、ナノ粒子への封中などの方法によって血中半減期を制御することができる。

10

【0462】

【IL-2改変体が有する生物活性の評価】

IL-2改変体の生物活性は、当該技術分野における公知の任意の適した方法によって評価することができる。評価方法には後述する実施例において記載のものを含む。IL-2改変体の生物活性を評価する方法としては、具体的には例えば、以下の(a)～(e)の方法が挙げられる。これらの方法は、IL-2改変体の治療効果、効能および薬力学的特性の測定にも使用できる。

【0463】

(a) IL-2改変体により刺激されるTreg細胞の増殖活性を測定する方法

IL-2改変体または野生型IL-2を添加した培地でTreg細胞を培養し、Treg細胞の増殖率を測定する。他に、Treg細胞の増殖活性を測定する方法としては、例えば、フローサイトメトリーにより、混合細胞集団内のTreg細胞数の増大を測定する方法、およびCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺マーカー表現型またはCD4⁺CD25⁺CD127^{low}マーカー表現型の存在比率を測定する方法；分離したTreg細胞へのトリチウム化チミジンの取り込みにより測定する方法；Ki-67などの増殖に関連する細胞周期タンパク質のTreg細胞内の発現の増大を測定する方法；Treg細胞内のカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)などの生体蛍光色素の細胞分裂に関連する希釈をフローサイトメトリーにより測定する方法が挙げられる。

20

【0464】

(b) IL-2改変体により刺激されるNK細胞の増殖活性を測定する方法

IL-2改変体または野生型IL-2を添加した培地でNK細胞を培養し、NK細胞の増殖率を測定する。他に、NK細胞の増殖活性を測定する方法としては、例えば、フローサイトメトリーにより、混合細胞集団内のNK細胞数の増大を測定する方法、およびCD56⁺マーカー表現型の存在比率を測定する方法；分離したNK細胞へのトリチウム化チミジンの取り込みにより測定する方法；Ki-67などの増殖に関連する細胞周期タンパク質のNK細胞内の発現の増大を測定する方法；NK細胞内のCFSEなどの生体蛍光色素の細胞分裂に関連する希釈をフローサイトメトリーにより測定する方法が挙げられる。

30

【0465】

本発明のIL-2改変体は、野生型IL-2と比較して、Treg増殖活性が高い、および/またはNK細胞増殖活性が低いことが好ましい。野生型IL-2の代わりに、野生型IL-2と同等のTreg増殖活性および/またはNK細胞増殖活性を有するIL-2改変体を用いてもよい。

40

【0466】

(c) IL-2改変体により刺激されたTregによるレスポンドーT細胞(Tresp)の増殖阻害活性を測定する方法

IL-2改変体または野生型IL-2を添加した培地でTregを培養し、これと適当なTCR刺激存在下でTresp(CD4⁺Tresp、CD8⁺Tresp)と共培養したときのTrespの増殖率を測定し、野生型IL-2と比較してIL-2改変体によるTrespの増殖阻害率を評価する。本発明のIL-2改変体は、野生型IL-2と比較して、少なくとも同等のTrespの増殖阻害活性を有するTregを増殖させること

50

が好ましい。野生型 I L - 2 の代わりに、野生型 I L - 2 と同等の T r e s p の増殖阻害活性を有する T r e g を増殖させる I L - 2 改変体を用いてもよい。

【0467】

(d) E x v i v o アッセイ

T e f f やNK細胞の機能的エフェクター分子である I L - 4、I L - 6、I F N γ または T N F α 等の炎症性サイトカインについて、I L - 2 改変体または野生型 I L - 2 を添加した培地で P B M C を培養し、培養上清中のサイトカイン産生量を測定する。また、同様の方法で抗炎症性サイトカインの産生量を測定してもよい。本発明の I L - 2 改変体は、野生型 I L - 2 と比較して、炎症性サイトカインの産生量を減少させる、および/または、抗炎症性サイトカインの産生量が増加させることが好ましい。野生型 I L - 2 の代

10

【0468】

(e) T r e g / T e f f 比の測定

I L - 2 改変体または野生型 I L - 2 を添加した培地で培養した P M B C を抗ヒト C D 4 抗体、抗ヒト C D 2 5 抗体、抗ヒト F o x p 3 抗体と反応させ、フローサイトメトリーによる C D 4 陽性画分の中で C D 2 5 + F O X P 3 ^{h i g h} 画分を T r e g、C D 2 5 + F O X P 3 ^{l o w} 画分をエフェクター T 細胞 (T e f f) とし、その存在比 [T r e g (%) / T e f f (%)] (T r e g / T e f f 比) を算出する。データの解析は市販のデータ解析ソフト (例えば、T r e e S t a r 社製 F l o w j o, v e r s i o n 7. 6. 5) により行う。本発明の I L - 2 改変体は、野生型 I L - 2 と比較して、T r e g / T e f f 比が向上していることが好ましい。野生型 I L - 2 の代わりに、野生型 I L - 2 と同等の T r e g / T e f f 比を有する I L - 2 改変体を用いてもよい。

20

【0469】

[組成物]

本発明の一実施形態は、有効量の本発明の I L - 2 改変体を含む組成物である。組成物の形態としては、例えば、医薬組成物および試薬が挙げられる。

【0470】

後述する実施例において示すように、本発明の I L - 2 改変体により T r e g を選択的に活性化させることから、本発明の I L - 2 改変体を含む組成物は、免疫抑制作用を有する組成物として好適に用いることができる。また、本発明の一実施形態として、本発明の I L - 2 改変体を含む免疫疾患の治療剤が提供される。

30

【0471】

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

40

50

【0472】

本発明における組成物は、公知の製剤学的方法により製剤化することができる。例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トロッチ剤、舌下剤、咀嚼剤、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、塗布剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、経皮吸収型製剤、ローション剤、吸引剤、エアゾール剤、注射剤および坐剤などとして、経口的または非経口的に使用することができる。

【0473】

これら製剤化においては、薬理学上許容される担体、具体的には例えば、滅菌水や生理食塩水、植物油、溶剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、芳香剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等と適宜組み合わせることができる。

【0474】

また、本発明における組成物の投与にはシリンジを使用してもよいが、他のデバイスを使用してもよい。デバイスとしては、例えばインジェクターペン、オートインジェクターデバイス、無針デバイス、または皮下パッチデバイス等が挙げられる。

【0475】

本発明の組成物は、ヒトを含む動物を対象として使用することができるが、ヒト以外の動物としては特に制限はなく、種々の家畜、家禽、ペット、実験用動物などを対象とすることができる。具体的には、例えば、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サルなどが挙げられるが、これらに制限されない。また、健康状態であってもよく、罹患状態であってもよい。ただし、本発明の組成物が医薬組成物である場合には、罹患状態の動物を対象として使用する。

【0476】

組成物におけるIL-2 変体の有効量は、例えば、治療の状況および目的に依存する。適切な投与量は、IL-2 変体を使用される適応症、投与のルート、並びに投与する対象のサイズ（体重、体表面または器官サイズ）および／または状態（年齢および健康状態）に依存して調整し得る。

【0477】

例えば、1 回当たりの投与量または摂取量は、一般に、 $1 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重 $\sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重であり、好ましくは、 $0.01 \mu \text{g} / \text{kg}$ 体重 $\sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重である。

【0478】

本発明の組成物の製品（医薬品、試薬）またはその説明書は、免疫を抑制するために用いられる等の旨の表示を付したものであり得る。ここで「製品または説明書に表示を付した」とは、製品の本体、容器、包装などに表示を付したこと、あるいは製品の情報を開示する説明書、添付文書、宣伝物、その他の印刷物などに表示を付したことを意味する。

【0479】

[IL-2 R への選択性]

本発明の一実施形態は、IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ に対するIL-2 の選択性を向上させる方法である。本実施形態においては、上記した方法によりIL-2 に糖鎖またはPEG を結合させて改変することにより、IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ に対するIL-2 の選択性を向上できる。

【0480】

IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ に対するIL-2 の選択性が向上しているとき、IL-2 R α サブユニットに対するIL-2 変体の親和性が、野生型IL-2 の親和性よりも向上している場合と、IL-2 R β および γ サブユニットの少なくとも一方に対するIL-2 変体の親和性が、野生型IL-2 の親和性よりも低下している場合とがあり得る。

【0481】

本発明の一実施形態は、IL-2 R α サブユニットに対するIL-2 の親和性を向上さ

10

20

30

40

50

せる方法である。「IL-2 R α サブユニットに対するIL-2の親和性が向上する」とは、野生型IL-2と比較して、IL-2改変体のIL-2 R α サブユニットに対する親和性が向上していることをいう。本実施形態においては、上記した方法によりIL-2に糖鎖またはPEGを結合させて改変することにより、野生型IL-2よりも、作製されたIL-2改変体のIL-2 R α サブユニットに対する親和性を向上させ、IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ に対するIL-2の選択性を向上させることができる。

【0482】

IL-2 R α サブユニットに対するIL-2の親和性は、IL-2 R α (CD25) に対するIL-2の結合性をBiacoreにより測定し、steady stateモデルを用いて解離定数K_Dを求めることにより評価することができる。BiacoreによるIL-2 R α に対するIL-2の結合性は、実施例において後述する方法により測定できる。本実施形態においては、IL-2 R α に対するIL-2改変体のK_Dは、野生型IL-2の改変体よりも低いことが好ましい。野生型IL-2の代わりに、野生型IL-2と同等のIL-2 R α への親和性を有するIL-2改変体を用いてもよい。

【0483】

本発明の一実施形態は、IL-2 R β および γ サブユニットの少なくとも一方に対するIL-2の親和性を低下させる方法である。「IL-2 R β および γ サブユニットの少なくとも一方に対するIL-2の親和性が低下する」とは、野生型IL-2と比較して、IL-2改変体のIL-2 R β および γ サブユニットの少なくとも一方に対する親和性が低下していることをいう。本実施形態においては、上記した方法によりIL-2に糖鎖またはPEGを結合させて改変することにより、野生型IL-2と比較して、作製されたIL-2改変体のIL-2 R β および γ サブユニットの少なくとも一方に対する親和性を低下させ、IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ に対するIL-2の選択性を向上できる。

【0484】

例えば、IL-2 R $\beta\gamma$ サブユニットに対するIL-2の親和性は、IL-2のIL-2 R $\beta\gamma$ に対する結合性をBiacoreにより測定し、1:1 binding modelを用いて解離定数K_Dを求めることにより評価することができる。BiacoreによるIL-2 R $\beta\gamma$ に対するIL-2の結合性は、実施例において後述する方法により測定できる。本実施形態においては、IL-2 R $\beta\gamma$ に対するIL-2のK_Dは野生型IL-2と比較して高いことが好ましい。野生型IL-2の代わりに、野生型IL-2と同等のIL-2 R $\beta\gamma$ サブユニットへの親和性を有するIL-2改変体を用いることができる。

【0485】

〔制御性T細胞を選択的に活性化させる方法〕

本発明の一実施形態は、本発明のIL-2改変体を用いて制御性T細胞を選択的に活性化させる方法である。本実施形態においては、本発明のIL-2改変体を被験対象に投与して、制御性T細胞を選択的に活性化させることができる。

【実施例】

【0486】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0487】

〔実施例1〕糖鎖結合IL-2改変体の合成

表1～5に示す各種IL-2改変体を下記に記載の方法で作製した。

10

20

30

40

50

【表 1】

作製した糖鎖結合 I L - 2 改変体

改変体の名称	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	125位変異
T3C-2	3	T	C-lactose	—
T3C-9	3	T	C-asialo	—
T3C-11	3	T	C-disialo	—
S4C-2	4	S	C-lactose	—
S4C-9	4	S	C-asialo	—
S4C-11	4	S	C-disialo	—
S5C-2	5	S	C-lactose	—
S5C-9	5	S	C-asialo	—
S5C-11	5	S	C-disialo	—
Q11C-2	11	Q	C-lactose	—
Q11C-9	11	Q	C-asialo	—
Q11C-11	11	Q	C-disialo	—
L12C-2	12	L	C-lactose	—
L12C-9	12	L	C-asialo	—
L12C-11	12	L	C-disialo	—
Q13C-2	13	Q	C-lactose	S
Q13C-11	13	Q	C-disialo	S
E15C-2	15	E	C-lactose	S
E15C-11	15	E	C-disialo	S
E15C-17	15	E	C-tetrasialo	S
H16C-2	16	H	C-lactose	—
H16C-3	16	H	C-trisaccharide	S
H16C-5	16	H	C-pentasaccharide	S
H16C-9	16	H	C-asialo	—
H16C-11	16	H	C-disialo	—
L18C-2	18	L	C-lactose	—
L18C-9	18	L	C-asialo	—
L18C-11	18	L	C-disialo	—
L19C-2	19	L	C-lactose	—
L19C-9	19	L	C-asialo	—
L19C-11	19	L	C-disialo	—
L19C-11*	19	L	C-disialo	S
L19N-11	19	L	N-disialo	S
L19C-17	19	L	C-tetrasialo	S

【 0 4 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 2】

作製した糖鎖結合 I L - 2 改変体

改変体の名称	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	125位変異
D20C-2	20	D	C-lactose	S
D20C-11	20	D	C-disialo	S
R38C-2	38	R	C-lactose	—
R38C-9	38	R	C-asialo	—
R38C-11	38	R	C-disialo	—
D84C-2	84	D	C-lactose	S
D84C-11	84	D	C-disialo	S
S87C-2	87	S	C-lactose	S
S87C-11	87	S	C-disialo	S
N88C-2	88	N	C-lactose	—
N88C-9	88	N	C-asialo	—
N88C-11	88	N	C-disialo	—
N88C-1	88	N	C-GlcNAc	S
N88C-1*	88	N	C-glucose	S
N88-1	88	N	N-GlcNAc	S
V91C-2	91	V	C-lactose	—
V91C-9	91	V	C-asialo	—
V91C-11	91	V	C-disialo	—
I92C-2	92	I	C-lactose	S
I92C-11	92	I	C-disialo	S
E95C-2	95	E	C-lactose	S
A108C-2	108	A	C-lactose	S
A108C-9	108	A	C-asialo	S
V115C-2	115	V	C-lactose	S
V115C-9	115	V	C-asialo	S
N119C-2	119	N	C-lactose	S
N119C-9	119	N	C-asialo	S
N119C-11	119	N	C-disialo	S
I122C-2	122	I	C-lactose	S
I122C-9	122	I	C-asialo	S
T123C-11	123	T	C-disialo	S
S127C-11	127	S	C-disialo	S
S130C-2	130	S	C-lactose	S
S130C-9	130	S	C-asialo	S

10

20

30

【 0 4 8 9 】

40

50

【表 3】

作製した糖鎖結合 I L-2 改変体

改変体の名称	糖鎖結合位置1				糖鎖結合位置2				糖鎖結合位置3			
	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基
												125位変異
K8C-11 / L19C-11	8	K	C-disialo	19	L	C-disialo	—	—	—	—	—	S
L12C-11 / H16C-2	12	L	C-disialo	16	H	C-lactose	—	—	—	—	—	S
L12C-11 / H16C-2 / L19C-11	12	L	C-disialo	16	H	C-lactose	19	L	C-disialo	—	—	S
L12C-11 / L19C-11	12	L	C-disialo	19	L	C-disialo	—	—	—	—	—	S
L12C-11 / N88C-2	12	L	C-disialo	88	N	C-lactose	—	—	—	—	—	S
L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
L12N-11 / V91N-11	12	L	N-disialo	91	V	N-disialo	—	—	—	—	—	S
L12C-11 / V115C-11	12	L	C-disialo	115	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
L12C-11 / N119C-11	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	—	—	—	—	—	S
Q13C-11 / V91C-11	13	Q	C-disialo	91	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
Q13C-11 / V115C-11	13	Q	C-disialo	115	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
Q13C-11 / N119C-11	13	Q	C-disialo	119	N	C-disialo	—	—	—	—	—	S
E15C-11 / V91C-11	15	E	C-disialo	91	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
E15C-11 / N119C-11	15	E	C-disialo	119	N	C-disialo	—	—	—	—	—	S
E15C-11 / T123C-11	15	E	C-disialo	123	T	C-disialo	—	—	—	—	—	S
H16C-2 / L19C-11	16	H	C-lactose	19	L	C-disialo	—	—	—	—	—	S
H16C-2 / V91C-11	16	H	C-lactose	91	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
L19C-11 / M23C-11	19	L	C-disialo	23	M	C-disialo	—	—	—	—	—	S
L19C-11 / V91C-11	19	L	C-disialo	91	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
L19C-11 / V115C-11	19	L	C-disialo	115	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
V91C-11 / V115C-11	91	V	C-disialo	115	V	C-disialo	—	—	—	—	—	S
V91C-11 / N119C-11	91	V	C-disialo	119	N	C-disialo	—	—	—	—	—	S

【0 4 9 0】

10

20

30

40

50

【表 4】

変換した糖鎖結合 I L - 2 変換体	変換体 の名称	糖鎖結合位置1		糖鎖結合位置2		糖鎖結合位置3		糖鎖結合位置4		糖鎖結合位置5		置換後の アミノ酸残基	125位 変異
		糖鎖結合 位置	置換前の アミノ酸残基	糖鎖結合 位置	置換前の アミノ酸残基	糖鎖結合 位置	置換前の アミノ酸残基	糖鎖結合 位置	置換前の アミノ酸残基	糖鎖結合 位置	置換前の アミノ酸残基		
A1C-11 / T3C-11 / S5C-11 / L12C-11 / V91C-11		1	A	3	T	5	S	12	L	91	V	C-disialo	S
T3C-11 / L12C-11 / T51C-11 / V91C-11 / E100C-11		3	T	12	L	51	T	91	V	100	E	C-disialo	S
T3C-11 / L12C-11 / K76C-11 / V91C-11 / E100C-11		3	T	12	L	76	K	91	V	100	E	C-disialo	S
T3C-11 / L12C-11 / K32C-11 / K76C-11 / V91C-11		3	T	12	L	32	K	76	K	91	V	C-disialo	S
L12C-11 / V91C-11 / E100C- 11 / T102C-11 / M104C-11		12	L	91	V	100	E	102	T	104	M	C-disialo	S

【 0 4 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 5】

作製した糖鎖結合 I L - 2 改変体												
改変体の名称	糖鎖結合位置1				糖鎖結合位置2				Cys変異位置			
	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	Cys変異位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	125位変異
A1C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	1	A	1	A	AcC	S
A1C / E15C-11	15	E	C-disialo	—	—	—	1	A	1	A	AcC	S
A1C / L19C-11	19	L	C-disialo	—	—	—	1	A	1	A	AcC	S
A1C / V91C-11 / N119C-11	91	V	C-disialo	119	N	C-disialo	1	A	1	A	AcC	S
T3C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	3	T	3	T	C	S
T3C / L12C-11 / V91C-2	12	L	C-disialo	91	V	C-lactose	3	T	3	T	C	S
T3C / L12C-11 / N119C-11	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	3	T	3	T	C	S
T3C / L19C-11	19	L	C-disialo	—	—	—	3	T	3	T	C	S
T51C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	51	T	51	T	C	S
F78C / L12C-11	12	L	C-disialo	—	—	—	78	F	78	F	C	S
F78C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	78	F	78	F	C	S
F78C / E15C-11	15	E	C-disialo	—	—	—	78	F	78	F	C	S

【0492】

〈表 1～5 の説明〉

- ・糖鎖結合位置：野生型成熟ヒト I L - 2 のアミノ酸配列（配列番号 1）（以下、単に野生型 I L - 2 と記載する）の N 末端からの位置
- ・C y s 変異位置：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端からの位置
- ・125 位変異：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 125 番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は－、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合は S と記載する。

【0493】

10

20

30

40

50

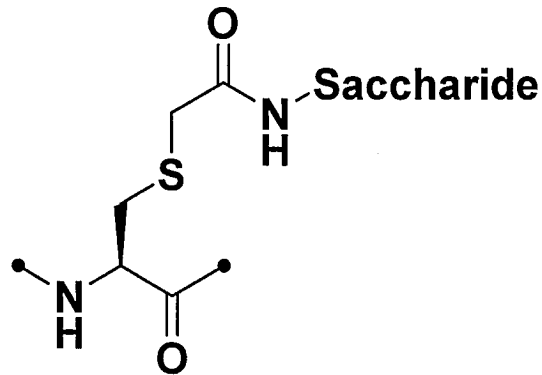
表中、糖鎖結合位置の置換後のアミノ酸残基の列に記載した構造について以下に示す。

【0494】

C-糖 (GlcNAc、glucose、lactose、trisaccharide、pentasaccharide、asialo、disialo、tetrasialo) とは、システインの側鎖チオールに CH_2CONH リンカーを介して糖鎖が導入された下記 (式1) で表される構造であることを示す。

【0495】

【化104】



【0496】

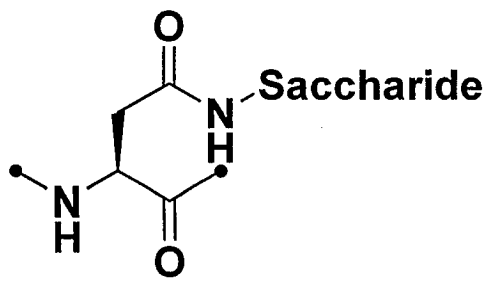
上記 (式1) 中、Saccharideは糖鎖示す。

【0497】

N-糖 (GlcNAc、disialo) とは、アスパラギンの側鎖アミドに糖鎖が導入された下記 (式2) で表される構造であることを示す。

【0498】

【化105】



【0499】

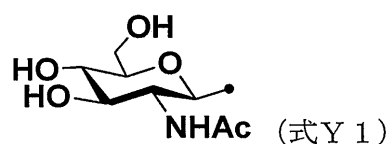
上記 (式2) 中、Saccharideは糖鎖示す。

【0500】

GlcNAcとは下記 (式Y1) で表される構造を示す。

【0501】

【化106】

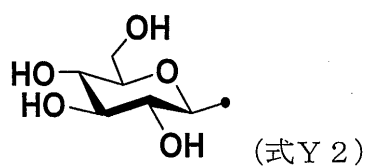


【0502】

G l u c o s e とは下記（式 Y 2）で表される構造を示す。

【0503】

【化107】

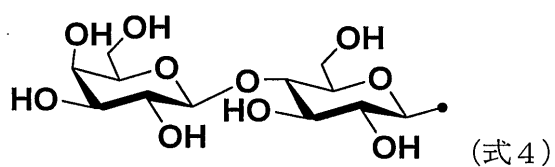


【0504】

l a c t o s e とは下記（式 4）で表される構造を示す。

【0505】

【化108】

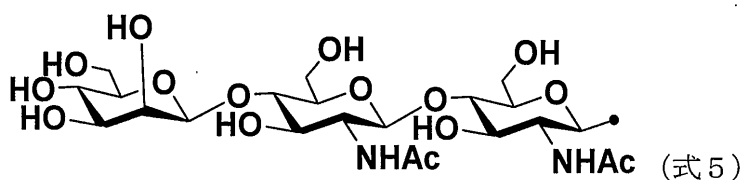


【0506】

t r i s a c c h a r i d e とは下記（式 5）で表される構造を示す。

【0507】

【化109】

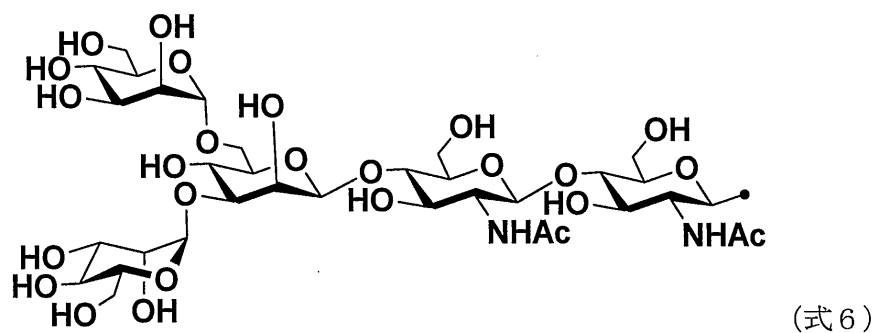


【0508】

p e n t a s a c c h a r i d e とは下記（式 6）で表される構造を示す。

【0509】

【化110】



【0510】

a s i a l o とは下記（式 7）で表される構造を示す。

【0511】

10

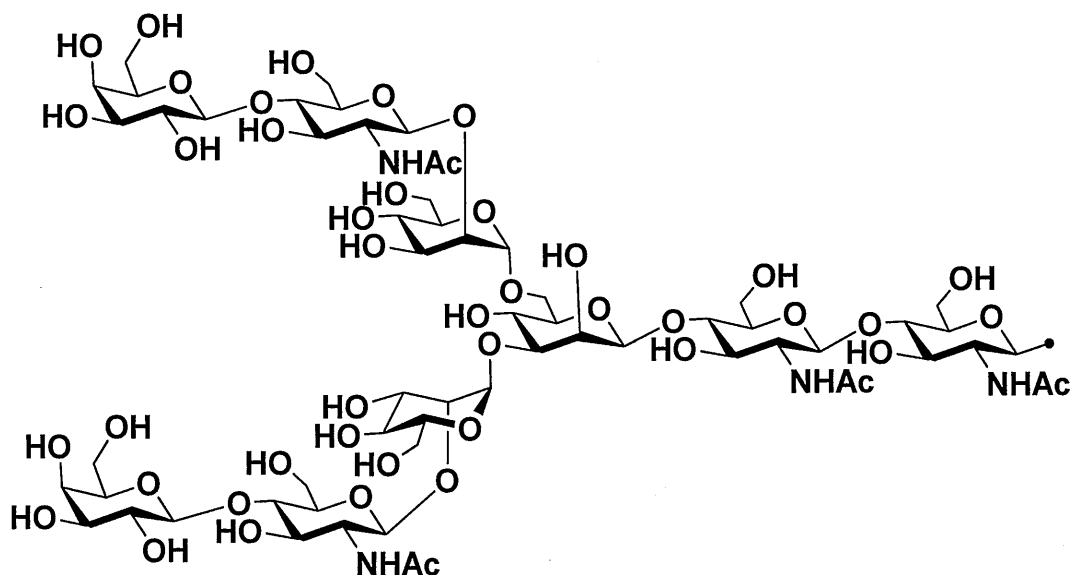
20

30

40

50

【化 1 1 1】



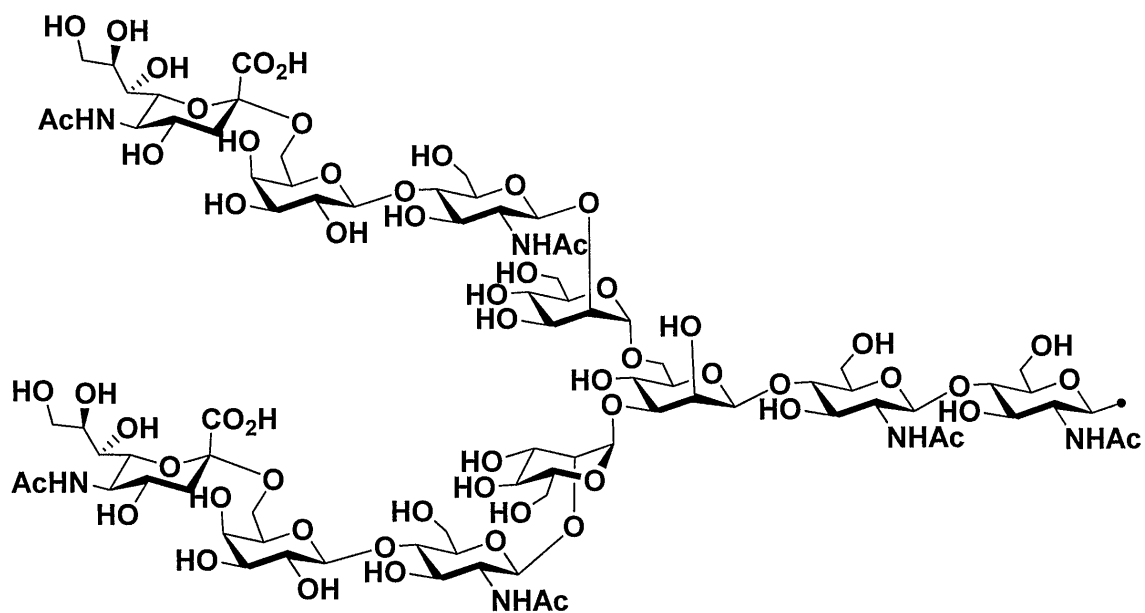
(式 7)

【0 5 1 2】

disialoとは下記(式 8)で表される構造を示す。

【0 5 1 3】

【化 1 1 2】



(式 8)

【0 5 1 4】

tetrasialoとは下記(式 Y 3)で表される構造を示す。

【0 5 1 5】

10

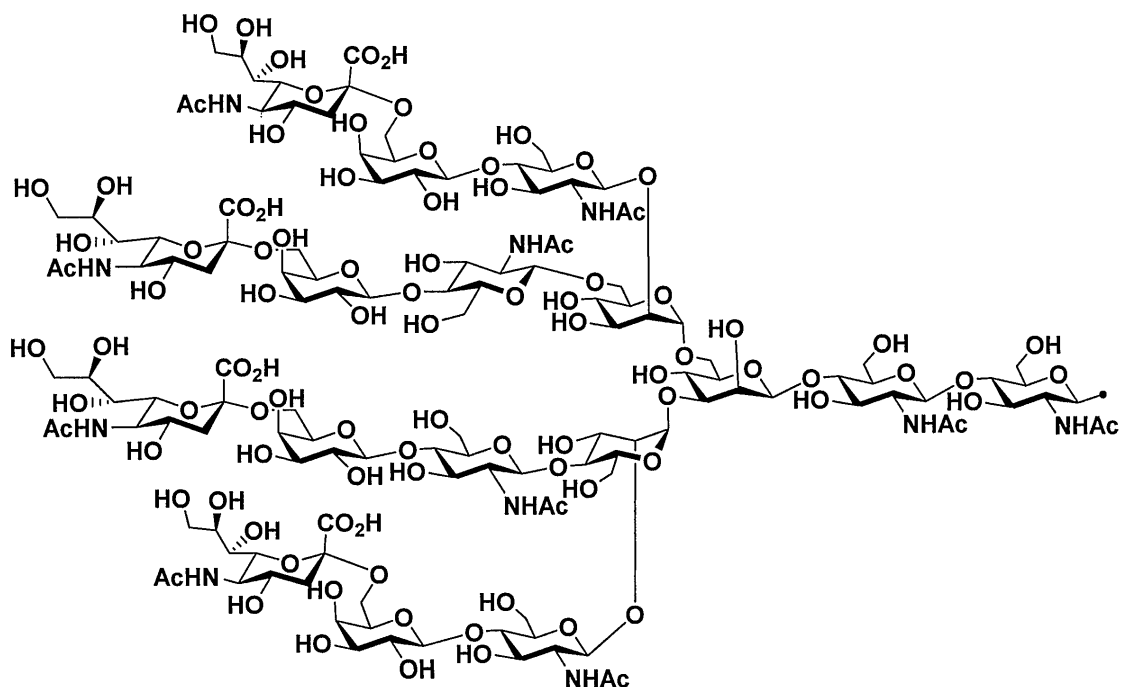
20

30

40

50

【化 1 1 3】



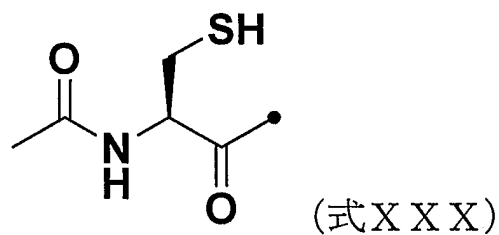
(式 Y 3)

【 0 5 1 6】

・表中、C y s 変異位置の置換後のアミノ酸残基の列に記載した A c C とは下記（式 X X X）で表される構造を示す。

【 0 5 1 7】

【化 1 1 4】



(式 X X X)

【 0 5 1 8】

【表 6】

作製した I L - 2 または I L - 2 改変体

IL-2または IL-2改変体名	変異位置	置換前の アミノ酸残基	置換後の アミノ酸残基	125位変異
野生型IL-2	—	—	—	—
L19C	19	L	C	S
L19C-acetamide	19	L	C-acetamide	S
L19N	19	L	N	S
N88C-acetamide	88	N	C-acetamide	S

【 0 5 1 9】

〈表 6 の説明〉

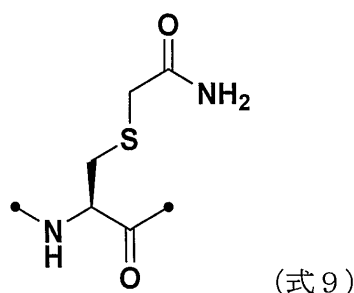
- ・変異位置：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端からの位置
- ・125位変異：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から125番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は－、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合はSと記載する。

【0520】

表中、置換後のアミノ酸残基の列に記載したC-acetamideとは、下記（式9）で表される構造であることを示す。

【0521】

【化115】



10

【0522】

（工程1）ペプチドセグメント1の合成

IL-2アミノ酸配列1-57のペプチドチオエステルまたは糖鎖結合ペプチドチオエステルを以下の方法にて調製した。

【0523】

（工程1-1a-1）ペプチドヒドラジドの合成

[Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 6978-6981] に記載される方法に従い得られるトリチルヒドラジン樹脂に、Fmoc-Gln(Trt)-OH（5当量）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（5当量）、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（5当量）を用いてDMF中で1残基目のアミノ酸残基を樹脂へ担持した。定法に従い、DMF中での、Fmocアミノ酸（5.3当量）、HCTU（5当量）、N-メチルモルホリン（5当量）または2,4,6-トリメチルピリジン（5当量）を用いたアミノ酸の伸長と、20%ピペリジン-DMF溶液による脱保護を繰り返すことで、2残基目以降のアミノ酸を伸長した。伸長したペプチドは、トリフルオロ酢酸（TFA）、トリイソプロピルシラン（TIPS）、水を用いて樹脂からの脱離と側鎖保護基を除去した後、氷冷したエーテル中に滴下し、生じた沈殿を遠心分離によって回収した。逆相HPLCカラム〔プロテオナビ（商品名）、資生堂社製〕にて精製し、ペプチドヒドラジドを合成した。

20

30

【0524】

この際、システインへ糖鎖を導入する場合には糖鎖を導入する位置をシステインへと変異させたペプチドヒドラジドを調製した。また、2種類の糖鎖を導入する場合は、一方をシステイン、もう一方をS-アセタミドメチルシステインへと変異させたペプチドヒドラジドを調製した。

40

【0525】

また、アミノ酸配列3位または51位をシステインへと変異させたIL-2改変体を調製する際には、糖鎖を導入する位置をシステイン、アミノ酸配列3位または51位をS-アセタミドメチルシステインへと変異させたペプチドヒドラジドを調製した。

【0526】

また、アミノ酸配列1位をアセチルシステインへと変異させたアナログを調製する際には、糖鎖を導入する位置をシステイン、アミノ酸配列1位をS-アセタミドメチルシステインへと変異させたペプチドを樹脂上で伸長した後、N末端アミノ基を無水酢酸、ピリジンを用いてアセチル化し、上記方法に従い樹脂からの脱離と側鎖保護基の除去、精製を行

50

い、1位をアセチルシステインへと変異させたペプチドヒドラジドを調製した。

【0527】

(工程1-1a-2) Cys-糖鎖結合ペプチドヒドラジドまたはCys-アセタミド結合ペプチドヒドラジドの合成

(工程1-1a-1) にて得られるペプチドヒドラジドへのプロモアセチル糖鎖(国際公開第2005/010053号に記載される方法に従い調製)を用いた糖鎖導入は、[Tetrahedron Lett., 2004, 45, 3287-3290, Carbohydr. Res. 2009, 344, 762-770]に記載される方法で実施し、目的の糖鎖結合ペプチドヒドラジドを合成した。

【0528】

プロモアセチル糖鎖の代わりに、プロモアセタミドを用いて、上記と同様の手法にてCys-アセタミド結合ペプチドヒドラジドを合成した。

【0529】

(工程1-1b) Asn-糖鎖結合ペプチドヒドラジドの合成

[Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 6978-6981]に記載される方法に従い得られるトリチルヒドラジン樹脂に、Fmoc-Gln(Trt)-OH(5当量)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(5当量)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(5当量)を用いてDMF中で1残基目のアミノ酸残基を樹脂へ担持した。定法に従い、DMF中での、Fmocアミノ酸(5.3当量)、HCTU(5当量)、N-メチルモルホリン(5当量)を用いたアミノ酸の伸長と、20%ピペリジン-DMF溶液による脱保護を繰り返すことで、2残基目以降の糖鎖結合Asn以外のアミノ酸を伸長した。

【0530】

糖鎖結合Asn(国際公開2004/005330号に記載される方法に従い調製)は、国際公開第2004/005330号に記載される方法で伸長した。伸長したペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)、トリイソプロピルシラン(TIPS)、水を用いて樹脂からの脱離と側鎖保護基を除去した後、氷冷したエーテル中に滴下し、生じた沈殿を遠心分離によって回収した。逆相HPLCカラム[プロテオナヴィ(商品名)、資生堂社製]にて精製し、Asn-糖鎖結合ペプチドヒドラジドを合成した。

【0531】

(工程1-2a) ペプチドチオエステルまたは糖鎖結合ペプチドチオエステルの合成

(工程1-1a-1) にて得られるペプチドヒドラジドまたは(工程1-1a-2) にて得られるCys-糖鎖結合ペプチドヒドラジドまたは(工程1-1b) にて得られるAsn-糖鎖結合ペプチドヒドラジドを6mol/L グアニジン塩酸塩、200mmol/L リン酸緩衝液(pH3)に溶解し-20℃に冷却した後、200mmol/L 亜硝酸ナトリウム、6mol/L グアニジン塩酸塩、200mmol/L リン酸緩衝液(pH7)を加え5分間攪拌した。400mmol/L 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム、6mol/L グアニジン塩酸塩、200mmol/L リン酸緩衝液(pH6)を加え-15℃で1時間半攪拌した後、逆相HPLCカラム[プロテオナヴィ(商品名)、資生堂社製]にて精製し、ペプチドチオエステルまたは糖鎖結合ペプチドチオエステルを得た。

【0532】

(工程1-2b) 2種類の糖鎖結合ペプチドチオエステルの合成

2種類の糖鎖を導入する場合、(工程1-1a-2) にて得られる糖鎖結合ペプチドヒドラジドの反応溶液に、酢酸に懸濁させた酢酸銀を加え6時間攪拌しS-アセタミドメチル基を除去した。ジチオトレイトールを加えた後、遠心分離して得られる上清をゲル濾過(Superdex G-75)によって4mol/L グアニジン塩酸塩、5mmol/L リン酸緩衝液(pH5)へと溶媒交換した。溶出液に、6mol/L グアニジン塩酸塩、200mmol/L リン酸緩衝液(pH3)を加え、2mol/L 塩酸を用いてpH3に調整した後、-15℃に冷却した。

【0533】

6mol/L グアニジン塩酸塩、200mmol/L 亜硝酸ナトリウム、50mmol

10

20

30

40

50

l/l リン酸緩衝液 (pH 7) を加えて、 -15°C で 5 分間攪拌した後、 6 mol/l グアニジン塩酸塩、 400 mmol/l 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム、 200 mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6) を加え、 -15°C で 1 時間半攪拌し、逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、糖鎖結合ペプチドチオエステルを得た。

【0534】

得られた糖鎖結合ペプチドチオエステルに対し、(工程 1-1a-2) に記載の方法に従い、2 種類目の糖鎖を導入し、逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、2 種類の糖鎖結合ペプチドチオエステルを得た。

【0535】

(工程 2) ペプチドセグメント 2 の合成

IL-2 アミノ酸配列 58-104 のペプチドヒドラジドまたは糖鎖結合ペプチドヒドラジドを以下の方法にて調製した。

【0536】

(工程 2-1a-1) ペプチドヒドラジドの合成

[Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 6978-6981] に記載される方法に従い得られるトリチルヒドラジン樹脂に、Fmoc-Met-OH (5 当量)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (5 当量)、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド (5 当量) を用いて DMF 中で 1 残基目のアミノ酸残基を樹脂へ担持した。

【0537】

定法に従い、DMF 中での、Fmoc アミノ酸 (5.3 当量)、HCTU (5 当量)、N-メチルモルホリン (5 当量) または 2, 4, 6-トリメチルピリジン (5 当量) を用いたアミノ酸の伸長と、20% ピペリジン-DMF 溶液による脱保護を繰り返すことで、2 残基目以降のアミノ酸を伸長した。

【0538】

伸長したペプチドは、トリフルオロ酢酸 (TFA)、トリイソプロピルシラン (TIPS)、水を用いて樹脂からの脱離と側鎖保護基を除去した後、氷冷したエーテル中に滴下し、生じた沈殿を遠心分離によって回収した。逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、ペプチドヒドラジドを合成した。

【0539】

この際、糖鎖を導入する場合には糖鎖を導入する位置をシステインへと変異し、さらにアミノ酸配列 58 をチオプロリンへと変異させたペプチドヒドラジドを調製した。アミノ酸配列 78 位をシステインへと変異させたアナログを調製する際には、アミノ酸配列 78 位をシステインへと変異させたペプチドヒドラジドを調製した。アミノ酸配列 91 位に糖鎖を導入し、アミノ酸配列 78 位をシステインへと変異したアナログを調製する際は、アミノ酸配列 91 位をシステイン、アミノ酸配列 78 位を S-アセタミドメチルシステインへと変異させたペプチドヒドラジドを調製した。

【0540】

(工程 2-1a-2) Cys-糖鎖結合ペプチドヒドラジドまたは Cys-アセタミド結合ペプチドヒドラジドの合成の合成

(工程 2-1a-1) にて得られるペプチドヒドラジドへのプロモアセチル糖鎖 (国際公開第 2005/010053 号に記載される方法で調製) を用いた糖鎖導入を、[Tetrahedron Lett., 2004, 45, 3287-3290, Carbohydr. Res. 2009, 344, 762-770] に記載される方法に従い実施した反応溶液に対し、プロモアセチル糖鎖に対して 10 当量の 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウムを加えた後、 8 mol/l グアニジン塩酸塩水溶液、 2 mol/l 塩酸、メトキシアミン塩酸塩を加えて pH 4 に調整し、室温にて 20 分反応させた。逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、Cys-糖鎖結合ペプチドヒドラジドを合成した。

【0541】

プロモアセチル糖鎖の代わりに、プロモアセタミドを用いて、上記と同様の手法にて C

10

20

30

40

50

y s-ブロモアセタミド結合ペプチドヒドラジドを合成した。

【0542】

(工程2-1b) A s n-糖鎖結合ペプチドヒドラジドの合成

(工程1-1b)と同様の手法にてA s n-糖鎖結合ペプチドヒドラジドを調製した。

【0543】

(工程3) ペプチドセグメント3の合成

I L-2アミノ酸配列105-133のペプチドまたは糖鎖結合ペプチドを以下の方法にて調製した。

【0544】

(工程3-1) 可溶化タグ(H-C(N p y s) R R R R R-NH₂)の調整

R i n k-アミド樹脂に、DMF中でのF m o cアミノ酸(5.3当量)、H C T U(5当量)、N-メチルモルホリン(5当量)を用いたアミノ酸の伸長と、20%ピペリジン-DMF溶液による脱保護を繰り返すことでアミノ酸を伸長した。伸長したペプチドは、トリフルオロ酢酸(T F A)、トリイソプロピルシラン(T I P S)、水を用いて樹脂からの脱離と側鎖保護基を除去した後、氷冷したエーテル中に滴下し、生じた沈殿を遠心分離によって回収し、可溶化タグ(H-C(N p y s) R R R R R-NH₂)を調製した。

【0545】

(工程3-2) 可溶化タグ導入ペプチドの合成

I L-2アミノ酸配列105-133のペプチドを以下の方法にて調製した。

H M P B-C h e m M a t r i x樹脂に、F m o c-Thr(t B u)-OH(5当量)、1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(5当量)、1-メチルイミダゾール(3.5当量)を用いて1残基目のアミノ酸残基を樹脂に担持した。定法に従い、DMF中での、F m o cアミノ酸(5.3当量)、H C T U(5当量)、N-メチルモルホリン(5当量)または2,4,6-トリメチルピリジン(5当量)を用いたアミノ酸の伸長と、20%ピペリジン-DMF溶液による脱保護を繰り返すことで、2残基目以降のアミノ酸を伸長した。

【0546】

伸長したペプチドは、トリフルオロ酢酸(T F A)、トリイソプロピルシラン(T I P S)、水を用いて樹脂からの脱離と側鎖保護基を除去した後、氷冷したエーテル中に滴下し、生じた沈殿を遠心分離によって回収しペプチドの粗精製物を得た。この際、システインへ糖鎖を導入する場合には糖鎖を導入する位置をシステインへと変異し、さらにアミノ酸配列105をチオプロリンへと変異させたペプチドを調製した。

【0547】

(工程3-1)にて得られる可溶化タグ(ペプチド粗生成物に対して3当量)を6.8 m o l/L グアニジン塩酸塩、310 m m o l/L リン酸緩衝液(p H 7)に溶解し、5当量の無水酢酸を加え室温下1時間攪拌した。10当量のアルギニン塩酸塩を加えた後、8 m o l/L グアニジン塩酸塩、250 m m o l/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩水溶液(p H 8)に溶解した上記ペプチド粗生成物を加え室温下1時間攪拌した。逆相H P L Cカラム[プロテオナヴィ(商品名)、資生堂社製]にて精製し、可溶化タグ導入ペプチドを合成した。

【0548】

(工程3-3) 可溶化タグ導入ペプチドへの糖鎖導入

(工程3-2)にて得られる可溶化タグ導入ペプチドを8 m o l/L グアニジン塩酸塩、5 m m o l/L トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、200 m m o l/L リン酸緩衝液(p H 6)に溶解し、ブロモアセチル糖鎖(5当量、国際公開第2005/010053号に記載される方法で調製)の6 m o l/L グアニジン塩酸塩、200 m m o l/L リン酸緩衝液(p H 7)溶液を加え5時間反応させた。

【0549】

ブロモアセチル糖鎖に対して4当量の2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウムを加え1時間攪拌した後、6 m o l/L グアニジン塩酸塩、200 m m o l/L リン酸緩衝

10

20

30

40

50

液 (pH 7) に溶解したメトキシアミン塩酸塩 (300 当量) を加え、 2mol/L 塩酸を用いて pH 4 に調整し 1 時間反応させた。逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、糖鎖結合ペプチドを合成した。

【0550】

(工程 4) IL-2 改変体、糖鎖結合 IL-2 改変体の合成

(工程 4-1) ペプチドセグメント 1 と 2 の連結反応

上記 (工程 1) にて得られるペプチドセグメント 1 と上記 (工程 2) にて得られるペプチドセグメント 2 (1.1 当量) とを、 8mol/L グアニジン塩酸塩、 100mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン、 100mM アスコルビン酸、 50mmol/L 4-メルカプトフェニル酢酸、 200mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解し、反応させた後、逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、ペプチドセグメント 1 と 2 の連結体を合成した。

10

【0551】

(工程 4-2) ペプチドセグメント 1 と 2 の連結体のチオエステル化

上記 (工程 4-1) にて得られるペプチドセグメント 1 と 2 の連結体を、(工程 1-2 a) と同様の手法にてチオエステル化した。

【0552】

(工程 4-3) ペプチドセグメント 3 との連結

上記 (工程 4-2) にて得られるペプチドチオエステルと上記 (工程 3) にて得られるペプチドセグメント 3 (1 当量) とを、 8mol/L グアニジン塩酸塩、 100mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン、 100mM アスコルビン酸、 50mmol/L 4-メルカプトフェニル酢酸、 200mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解し、反応させた後、逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、ペプチドセグメント 1、2 および 3 の連結体を合成した。

20

【0553】

(工程 4-4) アセタミドメチル基の脱保護

上記 (工程 4-3) にて得られるペプチドセグメント 1、2 および 3 の連結体のシステインがアセタミドメチル基で保護されている場合、以下に示す方法でアセタミドメチル基を除去した。

【0554】

ペプチドセグメント 1、2 および 3 の連結体を、 6mol/L 尿素、 5mmol/L リン酸緩衝液 (pH 5) に溶解し、酢酸に懸濁させた酢酸銀 (420 当量) を加え 5 時間攪拌した。過剰量のジチオトレイトールを加えた後、遠心分離して得られる上清を逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、脱アセタミドメチル体を取得した。

30

【0555】

(工程 4-5) シアル酸ベンジルエステルの脱保護

上記 (工程 4-3) にて得られるペプチドセグメント 1、2 および 3 の連結体の糖鎖上のシアル酸側鎖カルボン酸がベンジル基で保護されている場合、国際公開第 2004/005330 号に記載される方法に従い、ベンジル基を除去した後、逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、脱ベンジル体を取得した。

40

【0556】

(工程 4-6) IL-2 改変体、糖鎖結合 IL-2 改変体の合成

(工程 4-3) または (工程 4-4) または (工程 4-5) で合成したペプチドセグメント 1、2 および 3 の連結体を、 6mol/L グアニジン塩酸塩、 100mmol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩 (pH 8) に溶解した後、 100mmol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩、 10mmol/L 還元型グルタチオン、 1mmol/L 酸化型グルタチオン (pH 8) を加え、室温下 18 時間攪拌した。逆相 HPLC カラム [プロテオナヴィ (商品名)、資生堂社製] にて精製し、IL-2 改変体、糖鎖結合 IL-2 改変体を取得した。

50

【0557】

得られたIL-2改変体、糖鎖結合IL-2改変体は、質量分析にて計算値と実測値が一致していること、および／または、CDスペクトルが野生型IL-2と一致すること、および／または、SDS-PAGEで検出されるバンドが想定分子量のバンドの位置であることを確認できたことから、品質および純度が問題ないことを確認した。

【0558】

【実施例2】N末PEG化、糖鎖結合IL-2改変体の合成

表7に示すN末PEG化、糖鎖結合IL-2を下記に記載の方法で作製した。

【0559】

【表7】

10

作製したN末PEG化、糖鎖結合IL-2改変体

改変体の名称	PEG結合位置			糖鎖結合位置			125位変異
	PEG結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	
A1-Li20(CHO) / Q11C-9	1	A	A-Li20(CHO)	11	Q	C-asialo	—
A1-Li20(CHO) / L12C-9	1	A	A-Li20(CHO)	12	L	C-asialo	—
A1-Li20(CHO) / R38C-9	1	A	A-Li20(CHO)	38	R	C-asialo	—
A1-Li20(CHO) / V91C-9	1	A	A-Li20(CHO)	91	V	C-asialo	—

【0560】

20

<表7の説明>

- ・糖鎖結合位置、PEG結合位置：野生型成熟ヒトIL-2のアミノ酸配列（配列番号1）（以下、単に野生型IL-2とも記載する）のN末端からの位置
- ・125位変異：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から125番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は—、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合はSと記載する。
- ・表中、糖鎖結合位置の置換後のアミノ酸残基の列に記載した構造について以下に示す。

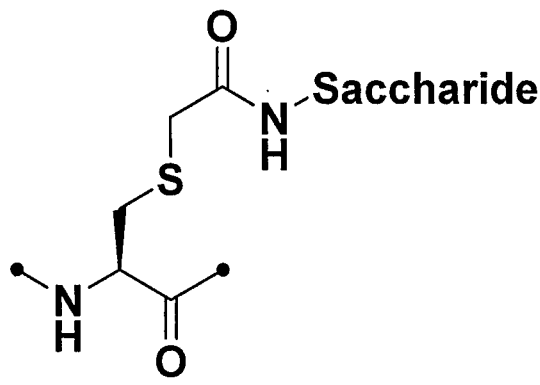
【0561】

C-糖（asialo）とは、システインの側鎖チオールに CH_2CONH リンカーを介して糖鎖が導入された下記（式1）で表される構造であることを示す。

30

【0562】

【化116】



40

(式1)

【0563】

上記（式X1）において、Saccharideは糖鎖を示す。

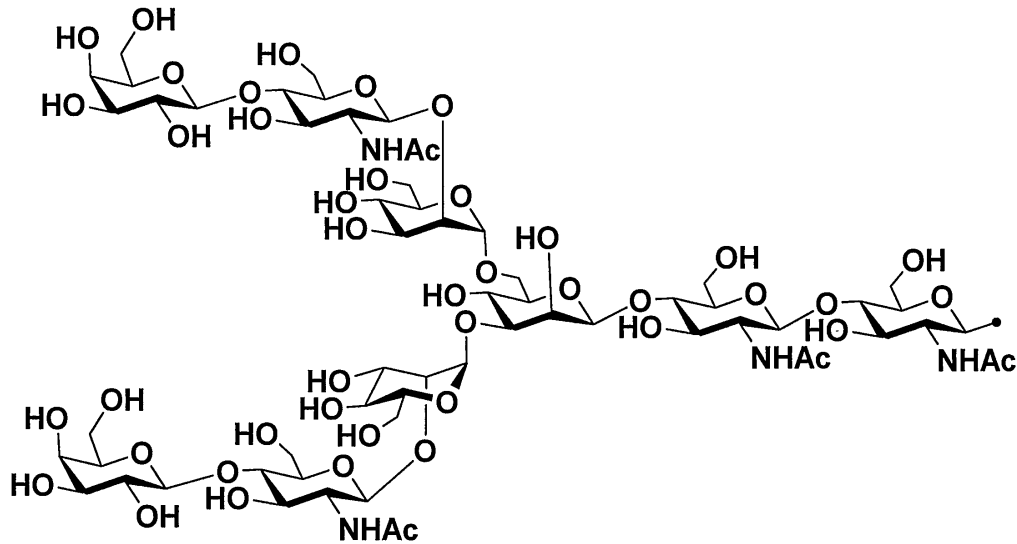
【0564】

asialoとは下記（式7）で表される構造を示す。

【0565】

50

【化 1 1 7】



(式 7)

【0 5 6 6】

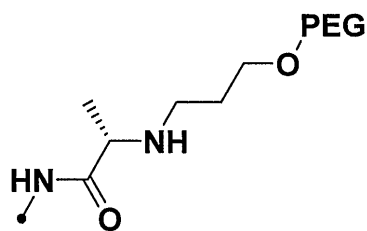
表中、PEG 結合位置の置換後のアミノ酸残基の列に記載した構造について以下に示す。

【0 5 6 7】

A1-PEG (CHO) [Li20 (CHO)] とは、アラニン主鎖アミノ基に (CH₂)₃ リンカーを介して PEG が導入された下記 (式 Z 0) で表される構造であることを示す。

【0 5 6 8】

【化 1 1 8】



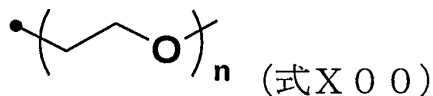
(式 Z 0)

【0 5 6 9】

Li20 とは、上記 (式 Z 0) 中、PEG が平均分子量約 20 kDa の下記 (式 X 0 0) で表される構造であることを示す。

【0 5 7 0】

【化 1 1 9】



(式 X 0 0)

【0 5 7 1】

糖鎖結合 IL-2 改変体の 1 mM EDTA, 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 5.5) に、室温下で PEG-アルデヒド (10 当量、PJK-241; Creative PEG Works) の 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 5.5) を加え室温下 30 分撹拌した後、NaBH₃(CN) (1000 当量) を加え 3 時間撹拌した。

【0572】

Amicon Ultra-0.5 (10 kDa) を用いた限外濾過により0.05%トリフルオロ酢酸、2%アセトニトリル水溶液に溶媒置換した後、サイズ排除クロマトグラフィー（カラム；Waters製、XBridge BEH450A、3.5 μm、7.8×150mmとXBridge BEH200A、3.5 μm、7.8×150mmを連結）にて精製し、N末PEG化、糖鎖結合IL-2改変体を合成した。

【0573】

精製したN末PEG化、糖鎖結合IL-2改変体の純度をSDS-PAGEにて確認した。その結果すべての改変体において、PEGの分子量が増加した単一のバンドが認められ、高純度のN末PEG化、糖鎖結合IL-2改変体が得られたことが確認できた。

【0574】

【実施例3】Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体の合成

表8に示すCys-PEG化、糖鎖結合IL-2を下記に記載の方法で作製した。

【0575】

【表8】

作製したCys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体

改変体の名称	PEG結合位置			糖鎖結合位置1			糖鎖結合位置2			125位変異
	PEG結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	糖鎖結合位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	
A1C-Li40(IAc) / L12C-11 / V91C-11	1	A	AcC-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-V80(Mal) / L12C-11 / V91C-11	1	A	AcC-V80(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-11	1	A	AcC-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-Y50(Mal) / L12C-11 / V91C-11	1	A	AcC-Y50(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-W80(Mal) / L12C-11 / V91C-11	1	A	AcC-W80(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-Y50(IAc) / L19C-11	1	A	AcC-Y50(IAc)	19	L	C-disialo	—	—	—	S
A1C-V40(IAc) / L19C-11	1	A	AcC-V40(IAc)	19	L	C-disialo	—	—	—	S
A1C-Y50(IAc) / V91C-11 / N119C-11	1	A	AcC-Y50(IAc)	91	V	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T3C-W80(Mal) / L12C-11 / V91C-2	3	T	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-lactose	S
T3C-Li20(IAc) / L12C-11 / V91C-11	3	T	C-Li20(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-Li40(IAc) / L12C-11 / V91C-11	3	T	C-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-V40(IAc) / L12C-11 / V91C-11	3	T	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-W40(IAc) / L12C-11 / V91C-11	3	T	C-W40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-2	3	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-lactose	S
T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-11	3	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-Y50(Mal) / L12C-11 / V91C-11	3	T	C-Y50(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-V40(IAc) / E15C-11	3	T	C-V40(IAc)	15	E	C-disialo	—	—	—	S
T3C-V80(Mal) / E15C-11	3	T	C-V80(Mal)	15	E	C-disialo	—	—	—	S
T3C-Y50(IAc) / E15C-11	3	T	C-Y50(IAc)	15	E	C-disialo	—	—	—	S
T3C-W80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	3	T	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T3C-W80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	3	T	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / N119C-11	3	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T51C-Li40(IAc) / L12C-11 / V91C-11	51	T	C-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T51C-V40(IAc) / L12C-11 / V91C-11	51	T	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T51C-W40(IAc) / L12C-11 / V91C-11	51	T	C-W40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T51C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-11	51	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
F78C-Li40(IAc) / L12C-11	78	F	C-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-V40(IAc) / L12C-11	78	F	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-V40(Mal) / L12C-11	78	F	C-V40(Mal)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-V80(Mal) / L12C-11	78	F	C-V80(Mal)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-W80(Mal) / L12C-11	78	F	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-V40(IAc) / L12C-11 / N119C-11	78	F	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
F78C-V80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	78	F	C-V80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
F78C-W80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	78	F	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
F78C-Li40(IAc) / E15C-11	78	F	C-Li40(IAc)	15	E	C-disialo	—	—	—	S

10

20

30

40

50

【0576】

〈表8の説明〉

・PEG結合位置、糖鎖結合位置1および2：野生型成熟ヒトIL-2のアミノ酸配列（配列番号1）（以下、単に野生型IL-2とも記載する）のN末端からの位置

・125位変異：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から125番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は－、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合はSと記載する。

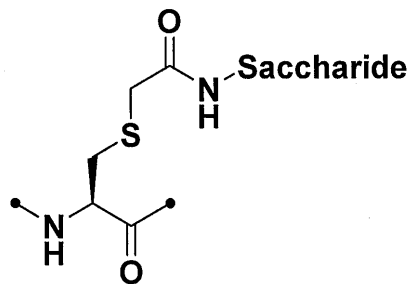
・表中、糖鎖結合位置の置換後のアミノ酸残基の列に記載した構造について以下に示す。

【0577】

C-糖（lactose、disialo）とは、システインの側鎖チオールに CH_2CONH リンカーを介して糖鎖が導入された下記（式1）で表される構造であることを示す。

【0578】

【化120】



(式1)

【0579】

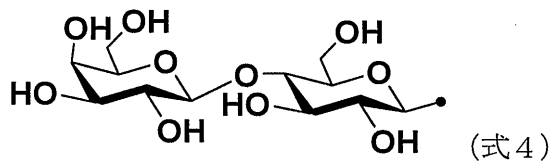
上記（式1）において、Saccharideは糖鎖示す。

【0580】

lactoseとは下記（式4）で表される構造を示す。

【0581】

【化121】



(式4)

【0582】

disialoとは下記（式8）で表される構造を示す。

【0583】

10

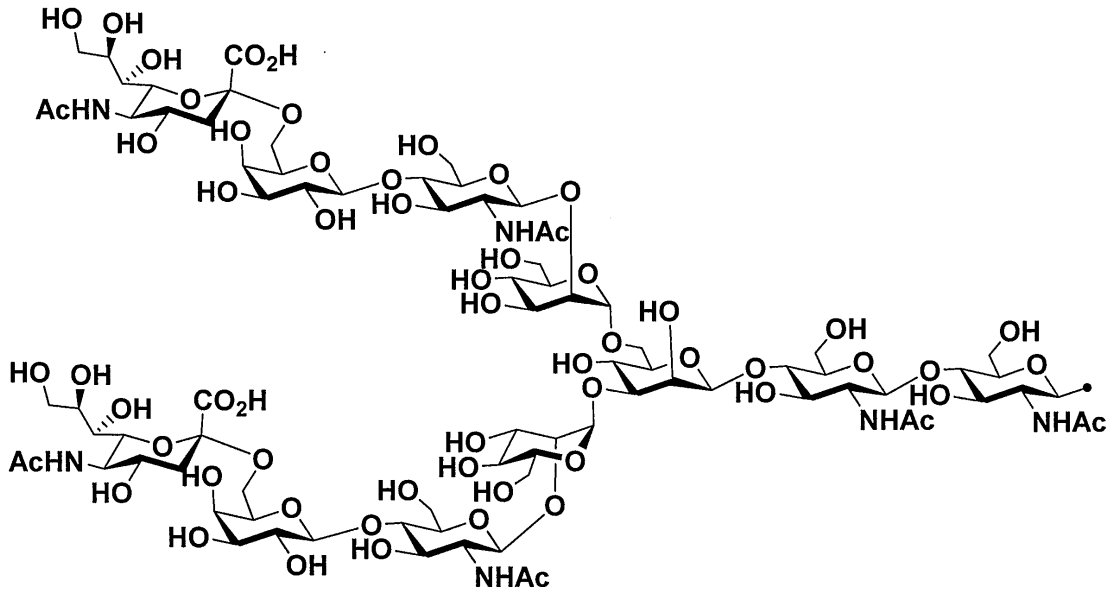
20

30

40

50

【化 1 2 2】



(式 8)

【0 5 8 4】

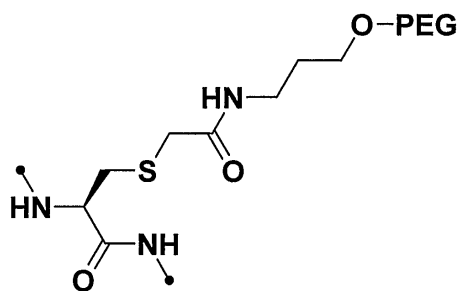
表中、PEG 結合位置の置換後のアミノ酸残基の列に記載した構造について以下に示す。

【0 5 8 5】

C-PEG (IAc) [Li20 (IAc)、Li40 (IAc)、V40 (IAc)、W40 (IAc)、Y50 (IAc)] とは、システイン側鎖に $\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{O}$ リンカーを介して PEG が導入された下記 (式 X 4) で表される構造であることを示す。

【0 5 8 6】

【化 1 2 3】



(式 X 4)

【0 5 8 7】

C-PEG (Mal) [V40 (Mal)、V80 (Mal)、W80 (Mal)、Y50 (Mal)] とは、システイン側鎖に 3-(3-チオ-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)-プロピルオキシリンカーを介して PEG が導入された下記 (式 X 5) で表される構造であることを示す。この際、C-PEG (Mal) はジオキソピロリジン環が開環した (式 X 6) または (式 X 7) で表される構造であっても良い。

【0 5 8 8】

10

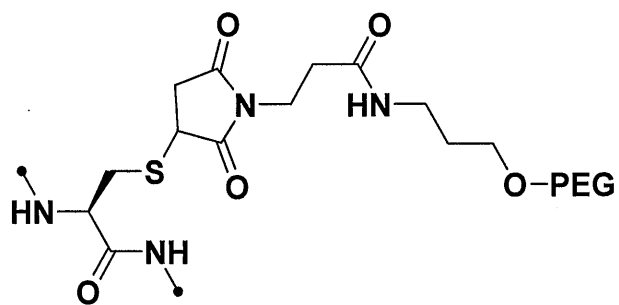
20

30

40

50

【化 1 2 4】

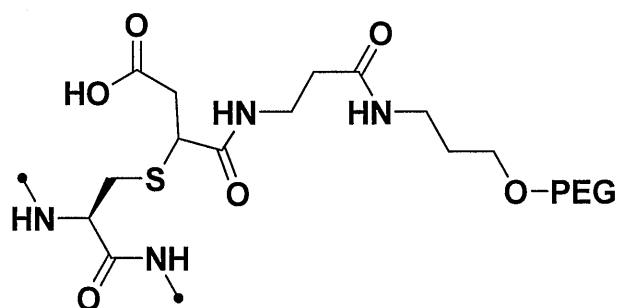


(式 X 5)

10

【 0 5 8 9】

【化 1 2 5】

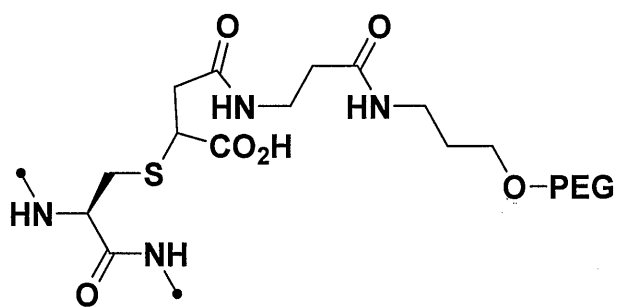


(式 X 6)

20

【 0 5 9 0】

【化 1 2 6】



(式 X 7)

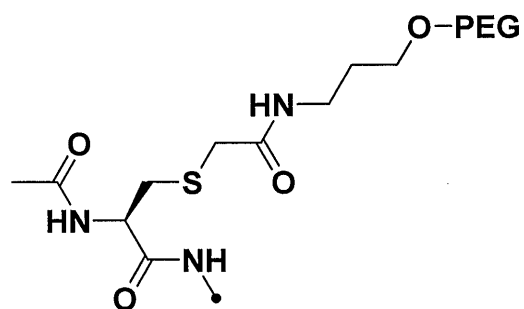
30

【 0 5 9 1】

AcC-PEG (IAc) [Li40 (IAc)、Y50 (IAc)] とは、アセチルシステイン側鎖にCH₂CONH(CH₂)₃Oリンカーを介してPEGが導入された下記(式XX3)で表される構造であることを示す。

【 0 5 9 2】

【化 1 2 7】



(式 XX 3)

40

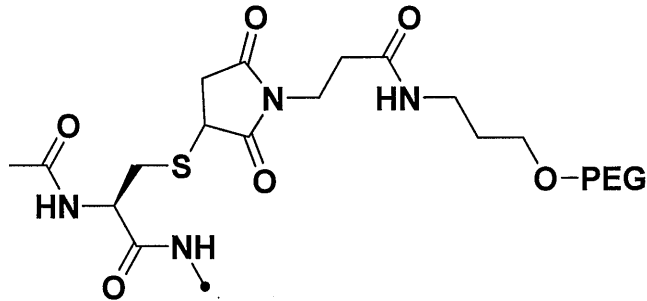
50

【0593】

AcC-PEG (Mal) [V80 (Mal)、W80 (Mal)、Y50 (Mal)]とは、N-アセチルシステイン側鎖に3-(3-チオ-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)-プロピルオキシリンカーを介してPEGが導入された下記(式X8)で表される構造であることを示す。この際、AcC-PEG (Mal)はジオキソピロリジン環が開環した(式X9)または(式X10)で表される構造であってもよい。

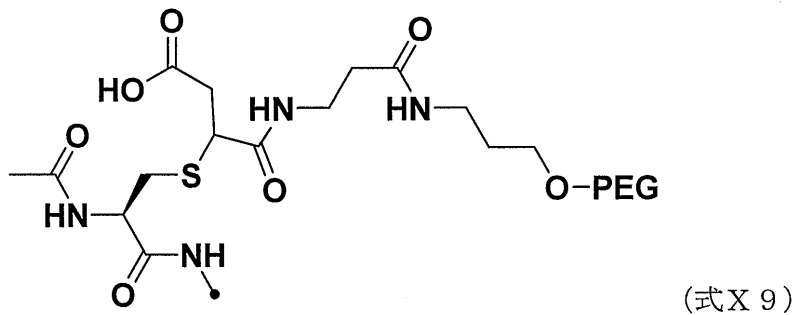
【0594】

【化128】



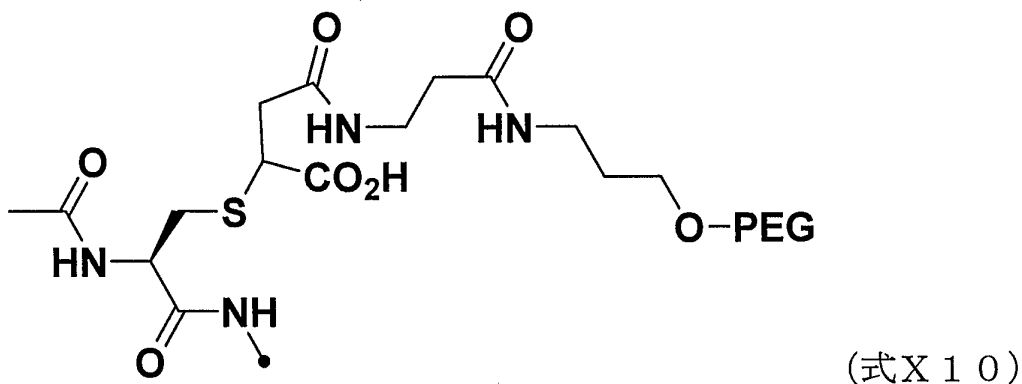
【0595】

【化129】



【0596】

【化130】



【0597】

Li20とは、上記(式X4)～(式X10)中、PEGが平均分子量約20kDaの下記(式X11)で表される構造であることを示し、

【0598】

10

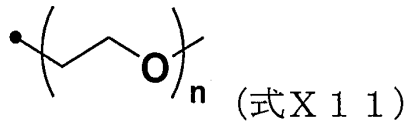
20

30

40

50

【化 1 3 1】



【0 5 9 9】

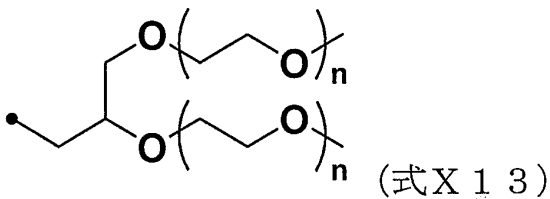
L i 4 0 とは、上記（式 X 4）～（式 X 1 0）中、P E G が平均分子量約 4 0 k D a の上記（式 X 1 1）で表される構造であることを示し、

【0 6 0 0】

V 4 0 とは、上記（式 X 4）～（式 X 1 0）中、P E G が平均分子量約 4 0 k D a の下記（式 X 1 3）で表される構造であることを示し、

【0 6 0 1】

【化 1 3 2】



【0 6 0 2】

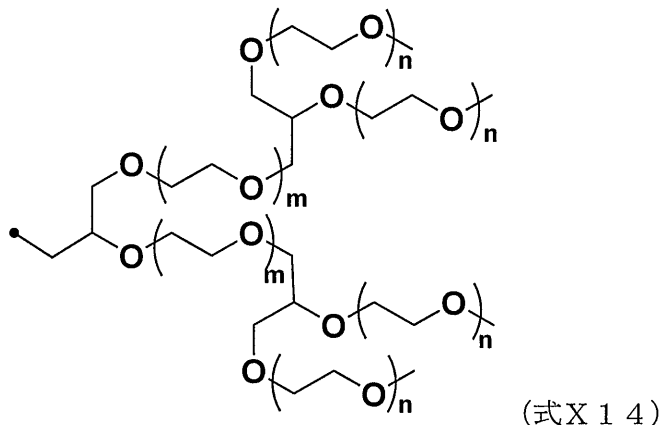
V 8 0 とは、上記（式 X 4）～（式 X 1 0）中、P E G が平均分子量約 8 0 k D a の上記（式 X 1 3）で表される構造であることを示し、

【0 6 0 3】

W 4 0 とは、上記（式 X 4）～（式 X 1 0）中、P E G が $(CH_2CH_2O)_m$ の平均分子量が 5 k D a であり、 $(CH_2CH_2O)_n$ の平均分子量が 7. 5 k D a である下記（式 X 1 4）で表される構造であることを示し、

【0 6 0 4】

【化 1 3 3】



【0 6 0 5】

W 8 0 とは、上記（式 X 4）～（式 X 1 0）中、P E G が $(CH_2CH_2O)_m$ の平均分子量が 5 k D a であり、 $(CH_2CH_2O)_n$ の平均分子量が 1 7. 5 k D a である上記（式 X 1 4）で表される構造であることを示し、

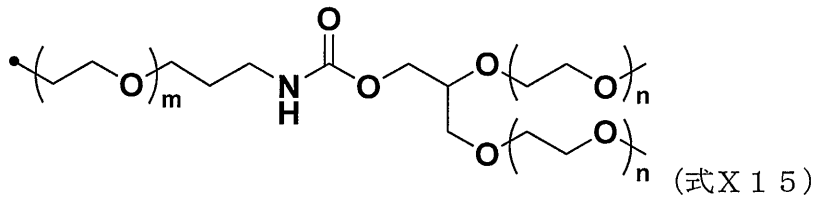
【0 6 0 6】

Y 5 0 とは、上記（式 X 4）～（式 X 1 0）中、P E G が $(CH_2CH_2O)_m$ の平均分子量が 1 0 k D a であり、 $(CH_2CH_2O)_n$ の平均分子量が 2 0 k D a である下記（式

X 1 5) で表される構造であることを示す。

【0607】

【化134】



【0608】

(工程1) PEG-ハロアセチルの調製

PEG-アミン (SUNBRIGHT GL2-400PA; 日油株式会社または SUNBRIGHT GL3-400PA100U; 日油株式会社または SUNBRIGHT GL4-400PA; 日油株式会社) をクロロホルムに溶解し、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride (5当量)、4-ジメチルアミノピリジン (5当量)、ヨード酢酸 (5当量) を加え室温下90時間攪拌した。エーテル/イソプロパノール=1/1を加え、析出した固体をろ取した。残渣を水に溶解し、Amicon Ultra-0.5 (10kDa) を用いた限外濾過によりヨード酢酸を除去し、凍結乾燥することでPEG-IACを合成した。

【0609】

(工程2) Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体の合成

表5に示す糖鎖結合IL-2改変体の 1mmol/L EDTA、20mmol/L リン酸緩衝液 (pH5.5) に、室温下でPEG-ハロアセチル (5当量、上記工程1で合成した化合物または SUNBRIGHT ME-200IA; 日油株式会社または SUNBRIGHT ME-400IA; 日油株式会社) またはPEG-マレイミド (5.0nmol、SUNBRIGHT GL2-800MA; 日油株式会社または SUNBRIGHT GL4-400MA100U; 日油株式会社または SUNBRIGHT GL4-800MA; 日油株式会社) の 1mmol/L EDTA、20mmol/L リン酸緩衝液 (pH5.5) を加えた後、0.1mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7.2~7.4 に調整し、2時間攪拌した。サイズ排除クロマトグラフィー (カラム; Waters製、XBridge BEH450A、3.5μm、7.8×150mmと XBridge BEH200A、3.5μm、7.8×150mmを連結) にて精製し、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体を合成した。

【0610】

精製したCys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体の純度をSDS-PAGEにて確認した。その結果すべての改変体において、PEGの分子量が増加した単一のバンドが認められ、高純度のCys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体を得られたことが確認できた。

【0611】

【実施例4】大腸菌用8His-IL-2およびo-Az-Z-Lys導入ヒトIL-2およびm-Az-Z-Lys導入8His-IL-2発現ベクターの調製

表9に示す大腸菌用8His-IL-2発現ベクターおよびo-Az-Z-Lys導入8His-IL-2発現ベクターおよびm-Az-Z-Lys導入8His-IL-2発現ベクターを以下の方法により作製した。

【0612】

10

20

30

40

50

【表 9】

作製した大腸菌用 8His-IL-2 発現ベクターおよび o-Az-Z-Lys 導入 8His-IL-2 発現ベクターおよび m-Az-Z-Lys 導入 8His-IL-2 発現ベクター

変体名	Az-Z-Lys 導入位置	置換前の アミノ酸残基	置換後の アミノ酸残基	1位 修飾	125位 変異	塩基配列
8His-IL-2	—	—	—	MMMMMMMMHA	S	配列番号3
8His-S4 (oAzZK)	4	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号4
8His-S5 (oAzZK)	5	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号5
8His-S6 (oAzZK)	6	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号6
8His-T7 (oAzZK)	7	T	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号7
8His-K8 (oAzZK)	8	K	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号8
8His-E60 (oAzZK)	60	E	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号9
8His-F78 (oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号10
8His-H79 (oAzZK)	79	F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号11
8His-R81 (oAzZK)	81	R	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号12
8His-L94 (oAzZK)	94	L	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号13
8His-S99 (oAzZK)	99	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号14
8His-E100 (oAzZK)	100	E	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号15
8His-T101 (oAzZK)	101	T	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号16
8His-Q126 (oAzZK)	126	Q	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号17
8His-I129 (oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号18
8His-I129 (mAzZK)	129	I	m-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号18
8His-S4 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号27
8His-S5 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号28
8His-K8 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号29
8His-F78 (oAzZK) / H79 (oAzZK)	78, 79	F, H	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号30
8His-F78 (oAzZK) / S99 (oAzZK)	78, 99	F, S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号31
8His-F78 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	78, 129	F, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号32
8His-S4 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号33
8His-S5 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号34
8His-K8 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号35
8His-H79 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	79, 129	H, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号36
8His-S99 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	99, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S	配列番号37

【0613】

〈表 9 の説明〉

- ・ Az-Z-Lys 導入位置：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端からの位置
- ・ 1 位修飾：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のアラニン残基の修飾を表す。MMMMMMMMHA とは、N 末端アラニン残基にメチオニンおよびポリヒスチジン配列 (HHHHHHHH) タグが結合していることを表す。
- ・ 125 位変異：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 125 番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は—、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合は S と記載する。

【0614】

表中、置換後のアミノ酸残基の列に記載した o-Az-Z-Lys とは下記 (式 10) で表される構造を示し、

【0615】

10

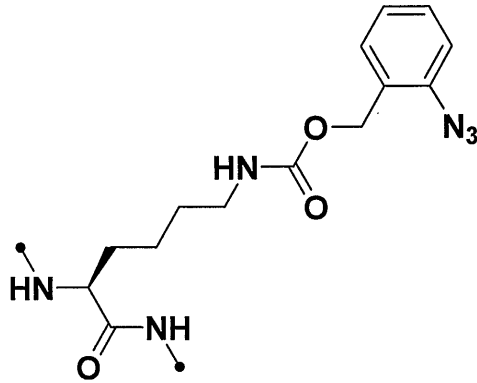
20

30

40

50

【化 1 3 5】



(式 1 0)

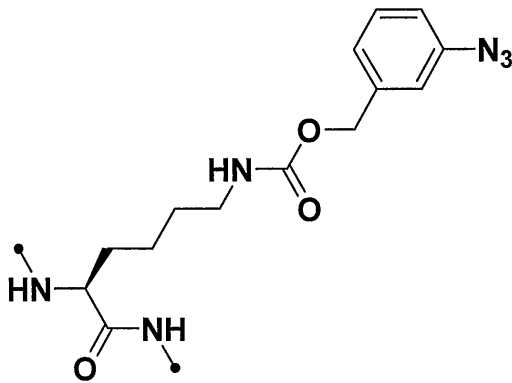
10

【0 6 1 6】

m-Az-Z-Lys とは下記 (式 X X 1) で表される構造を示す。

【0 6 1 7】

【化 1 3 6】



(式 X X 1)

20

【0 6 1 8】

IL-2としては、配列番号1で表される野生型成熟ヒトIL-2アミノ酸配列の125番目のアミノ酸残基をシステインからセリンに置換し、かつN末端にメチオニンおよびポリヒスチジン配列(HHHHHHHH)タグが結合したアミノ酸配列からなる8His-IL-2(アミノ酸配列:配列番号2、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列:配列番号3)をもとにして、上記発現ベクターを作製した。

30

【0 6 1 9】

pFLAG-CTS(SIGMA社製)のlacリプレッサー遺伝子lacIの直下流に、ピロリジンtRNAの塩基配列およびピロリジルtRNA合成酵素(以下Pyl tRNA、tRNA^{Pyl}とも記載する)をコードする塩基配列が挿入されたpFLAG-CTS-Pyl TS(国際公開第2017/030156号)のNdeI制限酵素サイトとSalI制限酵素サイトの間に、8His-IL-2をコードする塩基配列(配列番号3)を挿入することで、大腸菌用の8His-IL-2発現ベクター(以下pFLAG-CTS-Pyl TS_8His-hIL-2と記載する)を作製した。

40

【0 6 2 0】

8His-IL-2の塩基配列を基にして、o-Az-Z-Lysまたはm-Az-Z-Lysを導入する部位に相当するコドンアンバー(TAG)コドンに置換した塩基配列(配列番号4~18、27~37)をPCR法または人工遺伝子合成(日本ジーンウィズ株式会社)にて作製した。得られた塩基配列を、pFLAG-CTS-Pyl TS_8His-hIL-2の8His-IL-2の塩基配列と置換した。

【0 6 2 1】

【実施例5】8His-IL-2およびo-Az-Z-Lys導入IL-2およびm-A

50

z-Z-Lys導入8His-IL-2の調製

表10に示す8His-IL-2およびo-Az-Z-Lys導入8His-IL-2およびm-Az-Z-Lys導入8His-IL-2を以下の方法により作製した。

【0622】

【表10】

調製した8His-IL-2およびo-Az-Z-Lys導入IL-2およびm-Az-Z-Lys導入8His-IL-2

改変体名	Az-Z-Lys 導入位置	置換前の アミノ酸 残基	置換後の アミノ酸残基	1位 修飾	125位 変異
8His-IL-2	—	—	—	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK)	4	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK)	5	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S6(oAzZK)	6	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-T7(oAzZK)	7	T	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK)	8	K	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-E60(oAzZK)	60	E	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-H79(oAzZK)	79	F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-R81(oAzZK)	81	R	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-L94(oAzZK)	94	L	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S99(oAzZK)	99	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-E100(oAzZK)	100	E	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-T101(oAzZK)	101	T	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-Q126(oAzZK)	126	Q	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(mAzZK)	129	I	m-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK) / F78(oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK) / F78(oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK) / F78(oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK) / H79(oAzZK)	78, 79	F, H	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK) / S99(oAzZK)	78, 99	F, S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK) / I129(oAzZK)	78, 129	F, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK) / I129(oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK) / I129(oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK) / I129(oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-H79(oAzZK) / I129(oAzZK)	79, 129	H, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S99(oAzZK) / I129(oAzZK)	99, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S

【0623】

〈表10の説明〉

- ・Az-Z-Lys導入位置：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端からの位置
- ・1位修飾：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から1番目のアラニン残基の修飾を表す。MMMMMMMMHAとは、N末端アラニン残基にメチオニンおよびポリヒスチジン配列（HHHHHHHH）タグが結合していることを表す。
- ・125位変異：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から125番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は—、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合はSと記載する。

【0624】

表中、置換後のアミノ酸残基の列に記載したo-Az-Z-Lysとは下記（式10）で表される構造を示し、

【0625】

10

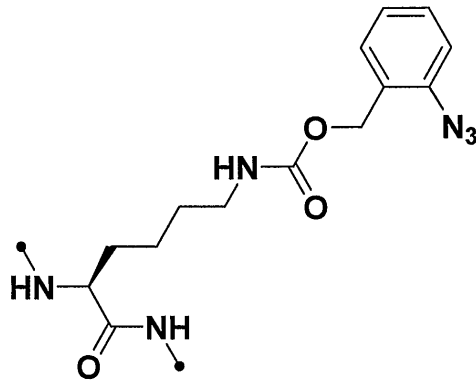
20

30

40

50

【化 1 3 7】



(式 1 0)

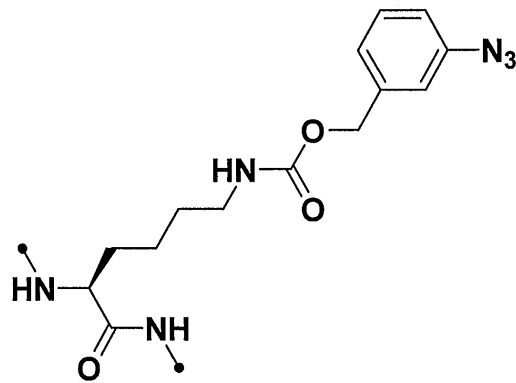
10

【 0 6 2 6】

m-Az-Z-Lys とは下記 (式 X X 1) で表される構造を示す。

【 0 6 2 7】

【化 1 3 8】



(式 X X 1)

20

【 0 6 2 8】

実施例 4 で作製した大腸菌用 8 H i s - I L - 2 発現ベクターおよび o - A z - Z - L y s 導入 8 H i s - I L - 2 発現ベクターまたは m - A z - Z - L y s 導入 8 H i s - I L - 2 発現ベクターを大腸菌 B - 9 5 . d e l A [Sci Rep, 2015. 5(9699)] に導入した。8 H i s - I L - 2 発現ベクターおよび各種 o - A z - Z - L y s 導入 8 H i s - I L - 2 発現ベクターまたは m - A z - Z - L y s 導入 8 H i s - I L - 2 発現ベクター 1 0 0 n g を 1 0 0 μ L のコンピテントセルに加えて緩やかに混和し、氷上で 3 0 分間静置した。

30

【 0 6 2 9】

続いて、4 2 ° C の温浴に 3 0 秒間加温した後、再度氷上に 2 分間静置した。L B 培地 5 0 0 μ L を加えて 3 7 ° C に設定したインキュベータにて 6 0 分間振とう培養を行った後、終濃度 1 0 0 μ g / m L のアンピシリン (和光純薬社製) を含む L B プレート (1 . 5 w / v % アガロース) に全量をプレーティングした。3 7 ° C に設定したインキュベータで一晩培養を行った後、プレートで生育してくる大腸菌を遺伝子導入株として選抜した。

40

【 0 6 3 0】

得られた遺伝子導入株を全量回収し、終濃度 1 m M の o - A z - Z - L y s または m - A z - Z - L y s (国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 0 1 5 6 号に記載の方法に従い G V K B i o s c i e n c e s 社にて合成)、終濃度 1 0 0 μ g / m L のアンピシリンを添加した 8 0 0 m L の S u p e r B r o t h [M O P S (ナカライテスク社製) 1 w / v %、T r y p t o n e (D I F C O 社製) 3 w / v %、Y e a s t E x t r a c t (D I F C O 社製) 2 w / v %] に播種し、3 7 ° C に設定したバイオシェーカーで、1 6 5 r p m で振とう培養した。

【 0 6 3 1】

50

菌体溶液の600nmの吸光度の値が1.5～2.0になった段階で終濃度1.0mmol/Lのイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)(ナカライテスク社製)を添加し、42℃に設定したバイオシェーカーで、165rpmで3時間振とう培養して各ヒトIL-2を発現させた。

【0632】

培養後の菌体溶液を遠心分離[CR21E(日立製作所社製)、7000rpm、4℃、5分間]することで大腸菌菌体を回収後、40mLのB-PER Bacterial Protein Extraction Reagent(Thermo Scientific社製)を添加し溶菌させ、遠心分離(12000×g、4℃、5分間)することで封入体を得た。

【0633】

得られた封入体を32mLのInclusion Body Solubilization Reagent(Thermo Scientific社製)にて溶解後、再度遠心分離(12000×g、4℃、30分間)し、上清を回収した。

【0634】

封入体可溶化液を6mol/L グアニジン塩酸塩(和光純薬社製)を含む100mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で3倍容量に希釈後、TALON Metal Affinity Resin(Clontech社製)に添加した。6mol/L グアニジン塩酸塩を含む100mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で洗浄後、250mmol/L イミダゾールおよび6mol/L グアニジン塩酸塩を含む100mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で溶出した。280nmの吸光度を測定することで、溶出液のタンパク質濃度を測定した。

【0635】

リフォールディングバッファー[1mmol/L 酸化型グルタチオン(Sigma Aldrich社製)を含む100mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH8.0)]で上記溶出液を3倍希釈し、4℃にて一晩静置した。その後、Amicon Ultra-4(3kDa)(メルクミリポア社製)で濃縮した。

【0636】

AKTA FPLC(GEヘルスケア社製)にSuperdex75 10/300GL(GEヘルスケア社製)を接続し、移動相として2mol/L グアニジン塩酸塩を含む100mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を送液した。上記濃縮液をSECカラムに添加し、単量体画分を回収した。

【0637】

得られた画分はD-PBS(ナカライテスク社製)で2倍希釈し室温にて6時間静置後、Amicon Ultra-4(3kDa)を用いた限界ろ過によりD-PBSにバッファー置換した。

【0638】

作製したすべてのo-Az-Z-Lys導入8His-IL-2またはm-Az-Z-Lys導入8His-IL-2は、SDS-PAGEにて8His-IL-2と同じ分子量のバンドであること確認した。

【0639】

【実施例6】大腸菌用o-Az-Z-Lys導入IL-2発現ベクターの調製

表11に示す大腸菌用o-Az-Z-Lys導入IL-2発現ベクターを以下の方法により作製した。

【0640】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

作製した大腸菌用 o-Az-Z-Lys 導入 IL-2 発現ベクター

改変体名	Az-Z-Lys 導入位置	置換前の アミノ酸残基	置換後の アミノ酸残基	1位 修飾	125位 変異	塩基配列
F78(oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号42
I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号43
desAla-I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	M	S	配列番号44
S4(oAzZK) / F78(oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号45
S5(oAzZK) / F78(oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号46
K8(oAzZK) / F78(oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号47
S4(oAzZK) / I129(oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号48
S5(oAzZK) / I129(oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号49
K8(oAzZK) / I129(oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MA	S	配列番号50

【0641】

〈表 1 1 の説明〉

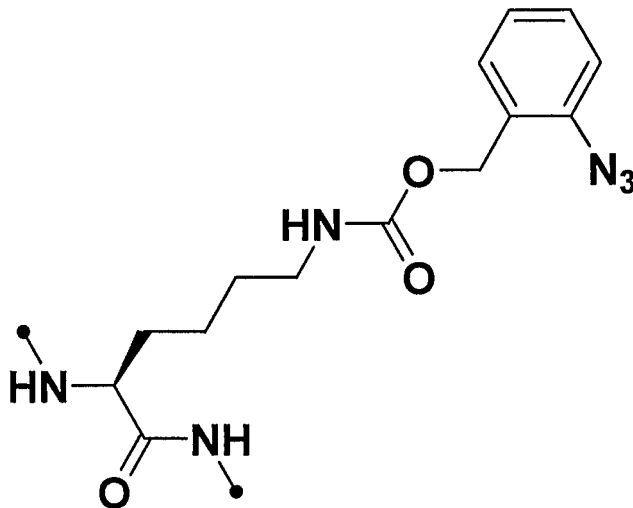
- ・ Az-Z-Lys 導入位置：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端からの位置
- ・ 1 位修飾：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のアラニン残基の修飾を表す。MA とは、N 末端アラニン残基にメチオニンが結合していることを表す。M とは、アラニンからメチオニンにアミノ酸残基を置換する変異を加えていることを表す。
- ・ 125 位変異：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 125 番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は－、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合は S と記載する。

【0642】

表中、置換後のアミノ酸残基の列に記載した o-Az-Z-Lys とは下記（式 10）で表される構造をいう。

【0643】

【化 1 3 9】



(式 1 0)

【0644】

IL-2 としては、配列番号 1 で表される野生型成熟ヒト IL-2 アミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をシステインからセリンに置換し、かつ N 末端にメチオニン結合したアミノ酸配列からなる IL-2（アミノ酸配列：配列番号 38、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列：配列番号 39）、または配列番号 1 で表される野生型成熟ヒト IL-2 アミノ酸配列の 125 番目のアミノ酸残基をシステインからセリンに置換し、1 番目のアラニン残基を欠損し、かつ N 末端にメチオニン結合したアミノ酸配列（アミノ酸配列：

配列番号 40、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列：配列番号 41）からなる IL-2 をもとにして、上記発現ベクターを作製した。

【0645】

pFLAG-CTS-PyL TS の NdeI 制限酵素サイトと SalI 制限酵素サイトの間に、o-Az-Z-Lys を導入する部位に相当するコドンアンバー (TAG) コドンに置換した塩基配列（配列番号 42～50）を挿入することで、大腸菌用の各種 o-Az-Z-Lys 導入 IL-2 発現ベクター（以下 pFLAG-CTS-PyL TS_h IL-2 と記載する）を作製した。

【0646】

【実施例 7】 o-Az-Z-Lys 導入 IL-2 の調製

表 12 に示す IL-2 の任意のアミノ酸残基を o-Az-Z-Lys 残基に置換した o-Az-Z-Lys 導入 IL-2 は以下の方法で作製した。

【0647】

【表 12】

調製した o-Az-Z-Lys 導入 IL-2

改変体名	oAzZK 導入位置	置換前の アミノ酸残基	置換後の アミノ酸残基	1位 修飾	125位 変異
F78(oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MA	S
I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MA	S
desAla-I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	M	S
S4(oAzZK) / F78(oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S
S5(oAzZK) / F78(oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S
K8(oAzZK) / F78(oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MA	S
S4(oAzZK) / I129(oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S
S5(oAzZK) / I129(oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S
K8(oAzZK) / I129(oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MA	S

【0648】

<表 12 の説明>

・ o-Az-Z-Lys K 導入位置：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端からの位置

・ 1 位修飾：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のアラニン残基の修飾を表す。MA とは、N 末端アラニン残基にメチオニンが結合していることを表す。M とは、アラニンからメチオニンにアミノ酸残基を置換する変異を加えていることを示す。

・ 125 位変異：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 125 番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。変異を加えていない場合は－、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合は S と記載する。

【0649】

表中、置換後のアミノ酸残基の列に記載した o-Az-Z-Lys とは下記（式 10）で表される構造をいう。

【0650】

10

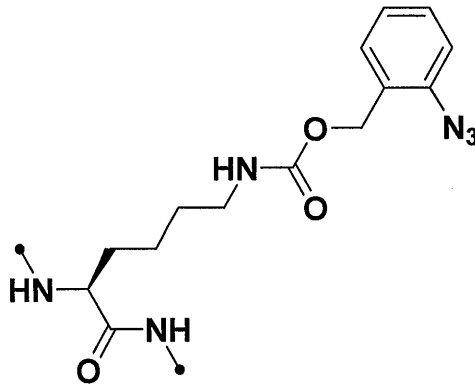
20

30

40

50

【化 1 4 0】



(式 1 0)

10

【0 6 5 1】

実施例 6 で作製した大腸菌用 α -Az-Z-Lys 導入 IL-2 発現ベクターを大腸菌 B-95. de l A [Sci Rep, 2015. 5(9699)] に導入し、実施例 5 に記載の方法にて封入体可溶化液を調製した。

【0 6 5 2】

AKTA FPLC に HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR (GEヘルスケア社製) を接続し、移動相として 2 mol/L グアニジン塩酸塩を含む 100 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を送液した。上記封入体可溶化液を SEC カラムに添加し、単量体画分を回収した。

20

【0 6 5 3】

酸化型グルタチオンを 2 mmol/L になるよう添加し、 4°C にて一晩静置した。その後、Amicon Ultra-4 (3 kDa) (メルクミリポア社製) で濃縮し NAP カラム (GEヘルスケア社製) を用いて 0.4 mol/L アルギニン塩酸塩、 5 w/v % トレハロースを含む 10 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) にバッファー置換した。

【0 6 5 4】

作製した α -Az-Z-Lys 導入 IL-2 は、SDS-PAGE にてアミノ酸配列から予想される分子量を有することを確認した。

30

【0 6 5 5】

[実施例 8] α -Az-Z-Lys 導入 8His-IL-2 または m -Az-Z-Lys 導入 8His-IL-2 または α -Az-Z-Lys 導入 IL-2 の PEG 化

表 13 ~ 15 に示す α -Az-Z-Lys 導入 8His-IL-2 または m -Az-Z-Lys 導入 8His-IL-2 または α -Az-Z-Lys 導入 IL-2 の PEG 化体 (以下 PEG 結合 IL-2 改変体と記載する) を以下の方法で調製した。

【0 6 5 6】

40

50

【表 13】

作製したPEG結合IL-2改変体

改変体名	PEG導入位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	1位修飾	125位変異
8His-S4(oAzZK)-PEG4	4	S	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-S4(oAzZK)-Li20	4	S	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-S4(oAzZK)-Li30	4	S	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-S5(oAzZK)-PEG4	5	S	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-S5(oAzZK)-Li20	5	S	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-S5(oAzZK)-Li30	5	S	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-S6(oAzZK)-PEG4	6	S	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-S6(oAzZK)-Li20	6	S	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-S6(oAzZK)-Li30	6	S	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-T7(oAzZK)-PEG4	7	T	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-T7(oAzZK)-Li20	7	T	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-T7(oAzZK)-Li30	7	T	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-K8(oAzZK)-PEG4	8	K	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-K8(oAzZK)-Li20	8	K	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-K8(oAzZK)-Li30	8	K	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-E60(oAzZK)-PEG4	60	E	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-E60(oAzZK)-Li20	60	E	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-E60(oAzZK)-Li30	60	E	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-F78(oAzZK)-PEG4	78	F	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-F78(oAzZK)-Li20	78	F	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-F78(oAzZK)-Li30	78	F	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-F78(oAzZK)-Li40	78	F	(oAzZK)-Li40	MHHHHHHHHA	S
8His-F78(oAzZK)-Y50	78	F	(oAzZK)-Y50	MHHHHHHHHA	S
8His-F78(oAzZK)-V40	78	F	(oAzZK)-V40	MHHHHHHHHA	S
8His-F78(oAzZK)-W40	78	F	(oAzZK)-W40	MHHHHHHHHA	S
F78(oAzZK)-IIII40	78	F	(oAzZK)-IIII40	MA	S
F78(oAzZK)-Li40	78	F	(oAzZK)-Li40	MA	S
F78(oAzZK)-V40	78	F	(oAzZK)-V40	MA	S
F78(oAzZK)-V80	78	F	(oAzZK)-V80	MA	S
F78(oAzZK)-W40	78	F	(oAzZK)-W40	MA	S
F78(oAzZK)-W80	78	F	(oAzZK)-W80	MA	S
8His-H79(oAzZK)-PEG4	79	F	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-H79(oAzZK)-Li20	79	F	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-H79(oAzZK)-Li30	79	F	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S

【0657】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

作製したPEG結合IL-2改変体

改変体名	PEG導入	置換前の	置換後の	1位	125位
	位置	アミノ酸 残基	アミノ酸残基	修飾	変異
8His-R81(oAzZK)-PEG4	81	R	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-R81(oAzZK)-Li20	81	R	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-R81(oAzZK)-Li30	81	R	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-L94(oAzZK)-PEG4	94	L	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-L94(oAzZK)-Li20	94	L	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-L94(oAzZK)-Li30	94	L	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-S99(oAzZK)-PEG4	99	S	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-S99(oAzZK)-Li20	99	S	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-S99(oAzZK)-Li30	99	S	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-E100(oAzZK)-PEG4	100	E	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-E100(oAzZK)-Li20	100	E	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-E100(oAzZK)-Li30	100	E	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-T101(oAzZK)-PEG4	101	T	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-T101(oAzZK)-Li20	101	T	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-T101(oAzZK)-Li30	101	T	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-Q126(oAzZK)-PEG4	126	Q	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-Q126(oAzZK)-Li20	126	Q	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-Q126(oAzZK)-Li30	126	Q	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(oAzZK)-PEG4	129	I	(oAzZK)-PEG4	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(oAzZK)-Li20	129	I	(oAzZK)-Li20	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(oAzZK)-Li30	129	I	(oAzZK)-Li30	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(oAzZK)-Li40	129	I	(oAzZK)-Li40	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(oAzZK)-V40	129	I	(oAzZK)-V40	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(mAzZK)-V40	129	I	(mAzZK)-V40	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(oAzZK)-W40	129	I	(oAzZK)-W40	MHHHHHHHHA	S
8His-I129(oAzZK)-Y50	129	I	(oAzZK)-Y50	MHHHHHHHHA	S
I129(oAzZK)-IIII40	129	I	(oAzZK)-IIII40	MA	S
I129(oAzZK)-Li30	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	S
I129(oAzZK)-Li40	129	I	(oAzZK)-Li40	MA	S
I129(oAzZK)-V40	129	I	(oAzZK)-V40	MA	S
I129(oAzZK)-V80	129	I	(oAzZK)-V80	MA	S
I129(oAzZK)-W40	129	I	(oAzZK)-W40	MA	S
I129(oAzZK)-W80	129	I	(oAzZK)-W80	MA	S
desAla-I129(oAzZK)-V40	129	I	(oAzZK)-V40	M	S
desAla-I129(oAzZK)-W80	129	I	(oAzZK)-W80	M	S
desAla-I129(oAzZK)-V80	129	I	(oAzZK)-V80	M	S

【0658】

10

20

30

40

50

【表 15】

変換した PEG 結合 I L - 2 改変体	PEG導入位置 1		PEG導入位置 2		置換後の アミノ酸残基	1位 修飾	125位 変異
	改変体名	PEG導入 位置	置換前の アミノ酸残基	PEG導入 位置	置換前の アミノ酸残基		
	8His-S4(oAzZK)-Li30 / F78(oAzZK)-Li30	4	S	78	F	MHNNNNHNA	S
	S4(oAzZK)-Li40 / F78(oAzZK)-Li40	4	S	78	F	MA	S
	S4(oAzZK)-Y50 / F78(oAzZK)-Y50	4	S	78	F	MA	S
	8His-S5(oAzZK)-Li30 / F78(oAzZK)-Li30	5	S	78	F	MHNNNNHNA	S
	S5(oAzZK)-Li40 / F78(oAzZK)-Li40	5	S	78	F	MA	S
	8His-K8(oAzZK)-Li30 / F78(oAzZK)-Li30	8	K	78	F	MHNNNNHNA	S
	K8(oAzZK)-Li40 / F78(oAzZK)-Li40	8	K	78	F	MA	S
	8His-F78(oAzZK)-Li30 / H79(oAzZK)-Li30	78	F	79	H	MHNNNNHNA	S
	8His-F78(oAzZK)-Li30 / S99(oAzZK)-Li30	78	F	99	S	MHNNNNHNA	S
	8His-F78(oAzZK)-Li30 / I129(oAzZK)-Li30	78	F	129	I	MHNNNNHNA	S
	8His-S4(oAzZK)-Li30 / I129(oAzZK)-Li30	4	S	129	I	MHNNNNHNA	S
	8His-S4(oAzZK)-Y50 / I129(oAzZK)-Y50	4	S	129	I	MHNNNNHNA	S
	S4(oAzZK)-Li40 / I129(oAzZK)-Li40	4	S	129	I	MA	S
	S4(oAzZK)-Y50 / I129(oAzZK)-Y50	4	S	129	I	MA	S
	8His-S5(oAzZK)-Li30 / I129(oAzZK)-Li30	5	S	129	I	MHNNNNHNA	S
	S5(oAzZK)-Li40 / I129(oAzZK)-Li40	5	S	129	I	MA	S
	S5(oAzZK)-Y50 / I129(oAzZK)-Y50	5	S	129	I	MA	S
	8His-K8(oAzZK)-Li30 / I129(oAzZK)-Li30	8	K	129	I	MHNNNNHNA	S
	8His-K8(oAzZK)-Y50 / I129(oAzZK)-Y50	8	K	129	I	MHNNNNHNA	S
	K8(oAzZK)-Li40 / I129(oAzZK)-Li40	8	K	129	I	MA	S
	K8(oAzZK)-Y50 / I129(oAzZK)-Y50	8	K	129	I	MA	S
	8His-H79(oAzZK)-Li30 / I129(oAzZK)-Li30	79	H	129	I	MHNNNNHNA	S
	8His-S99(oAzZK)-Li30 / I129(oAzZK)-Li30	99	S	129	I	MHNNNNHNA	S

【0659】

〈表 13、14 および 15 の説明〉

- ・ PEG 導入位置：配列番号 1 の N 末端からの位置
- ・ 1 位修飾：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のアラニン残基の修飾を表す。MA とは、N 末端アラニン残基にメチオニンが結合していることを表し、MH
HHHHHHHNA とは、N 末端アラニン残基にメチオニンおよびポリヒスチジン配列（H
HHHHHHH）タグが結合していることを表す。
- ・ 125 位変異：配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 125 番目のアミノ酸
残基の変異の有無を示す。アミノ酸残基の変異を加えていない場合は－、システインから

10

20

30

40

50

セリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合はSと記載する。

【0660】

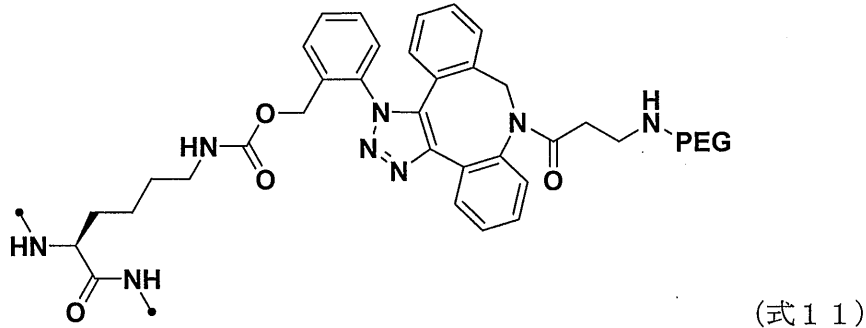
表中、置換後のアミノ酸残基の列に記載した構造について以下に示す。

【0661】

(oAzzK) - PEG (PEG4、Li20、Li30、Li40、V40、V80、W40、W80、Y50、IIII40) とは、リジンの側鎖アミノ基に、リンカーを介してPEGが導入された下記(式11)または式(12)で表される構造であることを示し、

【0662】

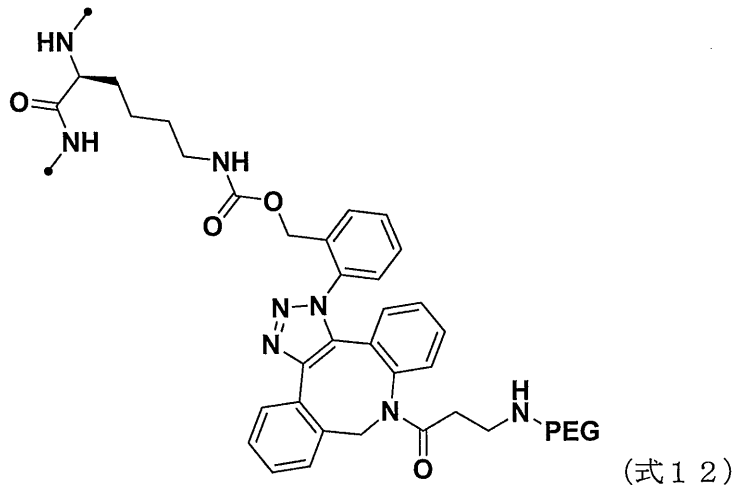
【化141】



(式11)

【0663】

【化142】



(式12)

【0664】

(mAzzK) - PEG (V40) とは、リジンの側鎖アミノ基に、リンカーを介してPEGが導入された下記(式XX4)または(式XX5)で表される構造であることを示す。

【0665】

10

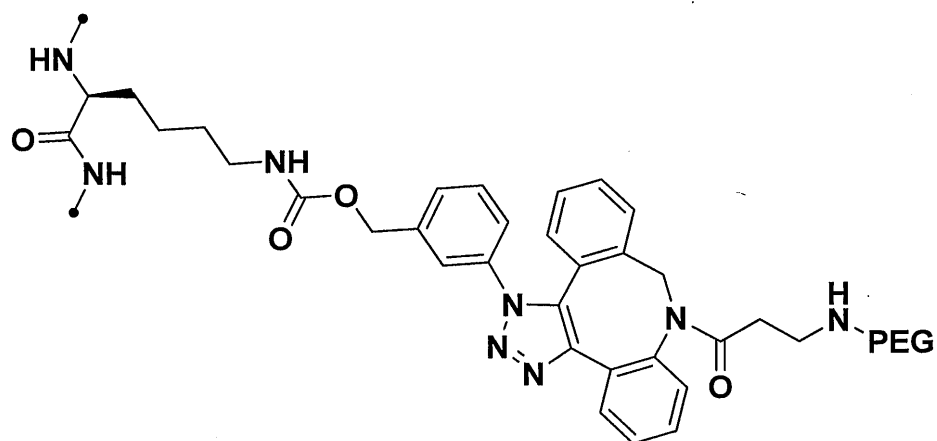
20

30

40

50

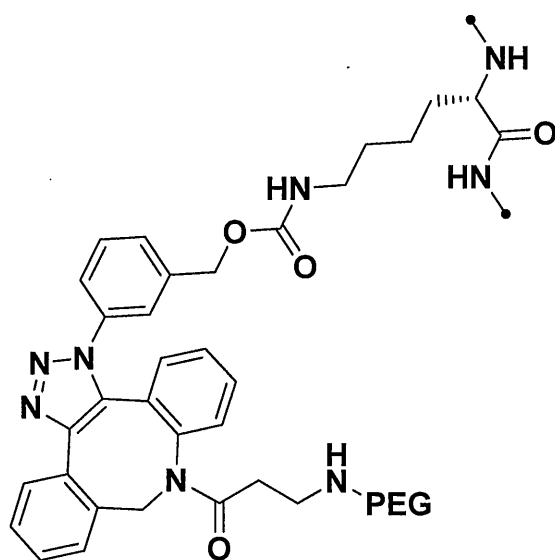
【化 1 4 3】



(式XX4)

【0 6 6 6】

【化 1 4 4】



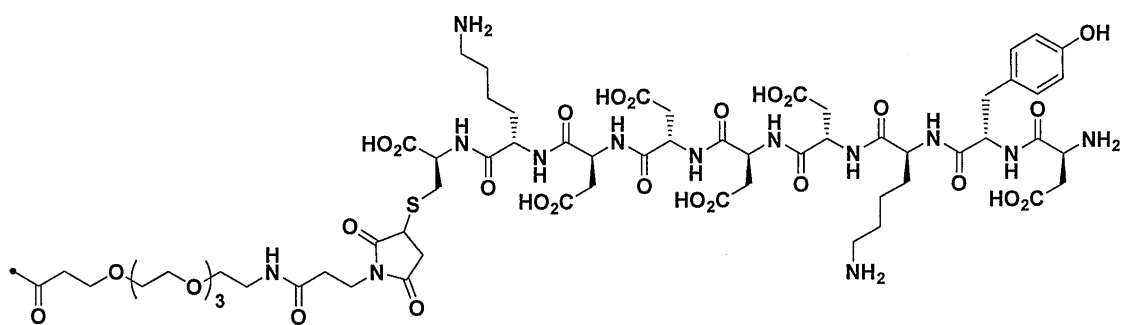
(式XX5)

【0 6 6 7】

PEG 4とは下記(式13)で表される構造であることを示し、

【0 6 6 8】

【化 1 4 5】



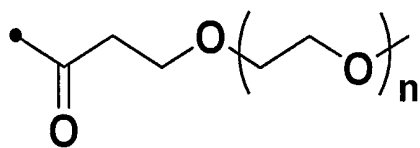
(式13)

【0669】

Li20とは、平均分子量約20kDaである場合の下記(式15)で表される構造であることを示し、

【0670】

【化146】



(式15)

10

【0671】

Li30とは、平均分子量約30kDaである場合の上記(式15)で表される構造であることを示し、

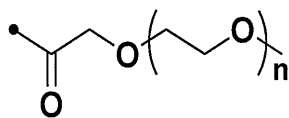
【0672】

Li40とは、平均分子量約40kDaの下記(式X105)で表される構造であることを示し、

【0673】

【化147】

20



(式X105)

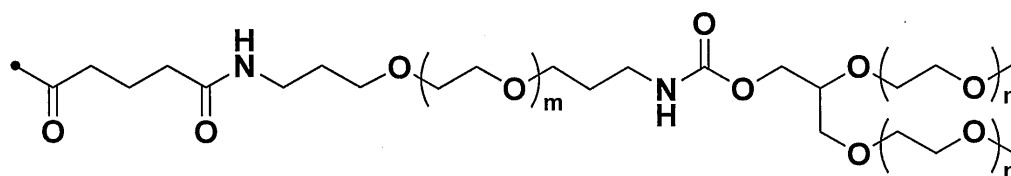
【0674】

Y50とは、(CH₂CH₂O)_mの平均分子量が10kDaであり、(CH₂CH₂O)_nの平均分子量が20kDaである下記(式X107)で表される構造であることを示し、

30

【0675】

【化148】



(式X107)

40

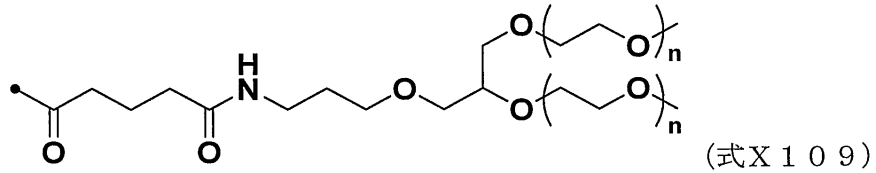
【0676】

V40とは、平均分子量が40kDaである下記(式X109)で表される構造であることを示し、

【0677】

50

【化 1 4 9】



【 0 6 7 8】

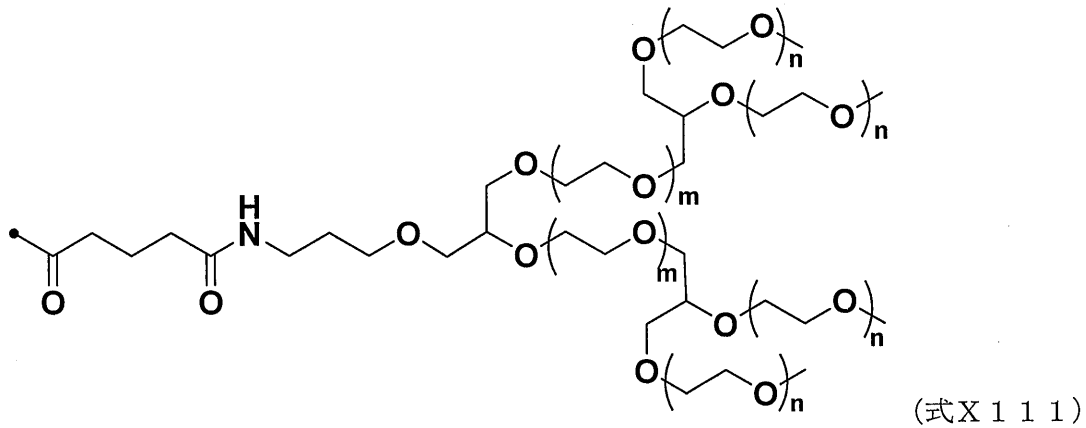
V 8 0 とは、平均分子量が 8 0 k D a である上記（式 X 1 0 9）で表される構造であることを示し、

【 0 6 7 9】

W 4 0 とは、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ の平均分子量が 5 k D a であり、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ の平均分子量が 7. 5 k D a である下記（式 X 1 1 1）で表される構造であることを示し、

【 0 6 8 0】

【化 1 5 0】

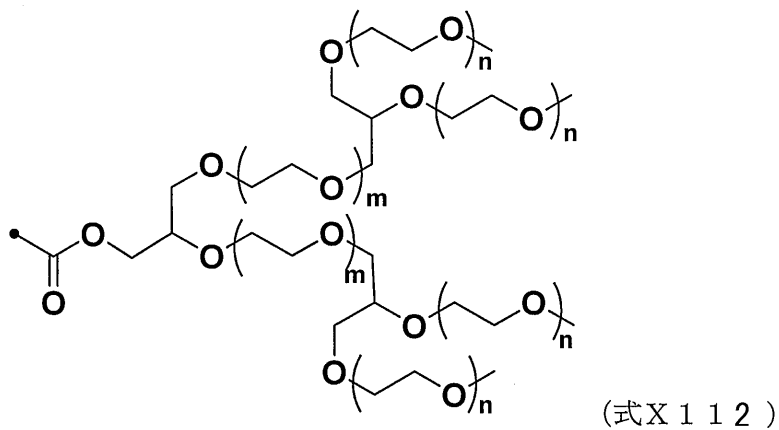


【 0 6 8 1】

W 8 0 とは、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ の平均分子量が 5 k D a であり、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ の平均分子量が 1 7. 5 k D a である下記（式 X 1 1 2）で表される構造であることを示し、

【 0 6 8 2】

【化 1 5 1】

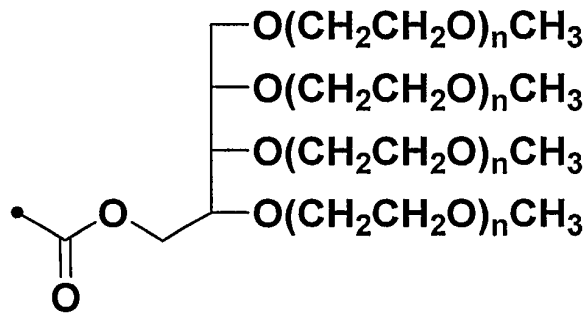


【 0 6 8 3】

IIII 40とは、平均分子量が40 kDaである下記(式X 1 1 3)で表される構造であることを示す。

【0684】

【化152】



(式X 1 1 3)

10

【0685】

(工程1a) PEG-DBCOの調製1

PEG-カルボン酸 (mPEG-AA 40K; Creative PEG Works 社製) をクロロホルムに溶解し、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride (5当量)、4-ジメチルアミノピリジン (5当量)、Dibenzocyclooctyne-amine (5当量、A2763; 東京化成工業) を加え室温下3時間攪拌した。エーテル/イソプロパノール=1/1を加え、析出した固体をろ取することで、PEG-DBCOを合成した。

20

【0686】

(工程1b) PEG-DBCOの合成2

PEG-NHS (SUNBRIGHT GL2-400GS2; 日油株式会社またはSUNBRIGHT GL2-800GS2; 日油株式会社またはSUNBRIGHT GL4-800TS; 日油株式会社またはSUNBRIGHT GL2-400GS100U; 日油株式会社またはSUNBRIGHT XY4-400TS; 日油株式会社) をクロロホルムに溶解し、Dibenzocyclooctyne-amine (5当量、A2763; 東京化成工業) を加え室温下3時間攪拌した。エーテル/イソプロパノール=1/1を加え、析出した固体をろ取することで、PEG-DBCOを合成した。

30

【0687】

(工程2) PEG結合IL-2改変体の調製

PEG-DBCO (DBCO-PEG4-FLAG (DYKDDDDK) (Jena Bioscience社製)、DBCO-PEG 20kDa (Click Chemistry Tools社製)、DBCO-PEG 30kDa (Click Chemistry Tools社製) または工程1aもしくは工程1bにて調製したPEG-DBCO をD-PBSで溶解し、これをo-Az-Z-Lys導入8His-IL-2またはm-Az-Z-Lys導入8His-IL-2またはo-Az-Z-Lys導入IL-2に20mol当量添加し、室温にて一晩静置した。

40

【0688】

DBCO-PEG4-FLAGを結合させたPEG結合IL-2改変体はANTI-FLAG M2 Affinity Agarose Gel (Sigma-Aldrich社製) を用いて、メーカーマニュアルに記載の手順で目的タンパク質を精製した。

【0689】

DBCO-PEG4-FLAG以外のPEGを結合させたPEG結合IL-2改変体は、はじめにMonoS 5/50GL (GEヘルスケア社製) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより未反応のPEGを除去した。移動相には50 mmol/Lリン酸緩衝液

50

(pH 3.0)を用いた。ついでSuperrose 6 increase 10/30 GL (GEヘルスケア社製)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによりPEG結合IL-2改変体を分取した。移動相には、2 mol/L グアニジン塩酸塩を含む100 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)を用いた。

【0690】

得られたPEG結合IL-2改変体は、Amicon Ultra-4 (3 kDa)を用いた限界ろ過、またはNAPカラムによりD-PBS又は5 w/v % トレハロースを含む10 mM酢酸バッファー(pH 4.5)又は0.4 mol/Lアルギニン塩酸塩、5 w/v % トレハロースを含む10 mM酢酸緩衝液(pH 4.5)にバッファー置換した。

【0691】

精製したPEG結合IL-2改変体の純度をSDS-PAGEにて確認した。その結果すべてのPEG結合IL-2改変体において、o-Az-Z-Lys導入8His-IL-2またはm-Az-Z-Lys導入8His-IL-2またはo-Az-Z-Lys導入IL-2に対してPEGの分子量が増加した単一のバンドが認められ、高純度のPEG結合IL-2改変体を得られたことが確認できた。

【0692】

【実施例9】 I129C変異IL-2発現ベクターの調製

配列番号1で表される野生型成熟ヒトIL-2アミノ酸配列の1番目のアラニンを欠損し、125番目のアミノ酸残基をシステインからセリンに、129番目のアミノ酸残基をイソロイシンからシステインに置換し、かつN末端にメチオニンが結合したアミノ酸配列からなるIL-2 (アミノ酸配列：配列番号51、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列：配列番号52、以下IL-2__I129Cと記載する)をもとにして、上記発現ベクターを作製した。

【0693】

IL-2__I129Cの塩基配列(配列番号52)を人工遺伝子合成(株式会社ラグアスジャパン)にて調製し、pET-22b (+) (Novagen社製)のNdeI制限酵素サイトとBamHI制限酵素サイトの間に挿入することで、大腸菌用のIL-2__I129C発現ベクター(以下pET-22b (+)-hIL-2__I129Cと記載する)を作製した。

【0694】

【表16】

作製したCys置換IL-2発現ベクター

改変体名	Cys 置換位置	置換前の アミノ酸残基	1位 修飾	125位 変異	塩基配列
I129C	129	I	M	S	配列番号52

【0695】

<表16の説明>

- ・Cys変異位置：配列番号1のN末端からの位置
- ・1位修飾：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から1番目のアラニン残基の修飾を表す。Mとは、アラニンからメチオニンにアミノ酸残基を置換していることを示す。
- ・125位変異：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から125番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。アミノ酸残基の変異を加えていない場合は-、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合はSと記載する。

【0696】

【実施例10】 IL-2__I129Cの調製

IL-2__I129Cを下記に記載の方法で作製した。実施例9で作製した大腸菌用pET-22b (+)-hIL-2__I129Cを大腸菌BL21 (DE3) (Novagen社製)に導入し、実施例5に記載の方法にて封入体を得た。

【0697】

得られた封入体を15 mLの6 mol/L グアニジン塩酸塩、5 mmol/L DTT、5 mmol/L EDTAを含む100 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)にて溶解後、60℃で30分間加温し、遠心分離(19000×g、4℃、30分間)することで上清を回収した(封入体可溶化液)。

【0698】

封入体可溶化液に15 mLの100 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)を添加し室温で10分間静置後、遠心分離(19000×g、4℃、30分間)することで沈殿を回収した。

【0699】

得られた沈殿を再度6 mol/L グアニジン塩酸塩、5 mmol/L DTT、5 mmol/L EDTAを含む100 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)にて溶解した(沈殿可溶化液)。

【0700】

AKTA FPLCにHiPrep 26/60 Sephacryl S-100HR (GEヘルスケア社製)を接続し、移動相として6 mol/L グアニジン塩酸塩、5 mmol/L DTT、5 mmol/L EDTAを含む100 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)を送液した。上記沈殿可溶化液をSECカラムに添加し、単量体画分を回収した。

【0701】

リフォールディングは以下の方法で実施した。上記で調製した単量体IL-2__I129CをNAPカラムを用いて6 mol/L グアニジン塩酸塩を含む100 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)にバッファー交換後、2 mol/L グアニジン塩酸塩、10 vol%グリセロール、6.9 mmol/L 還元型グルタチオン、0.7 mmol/L 酸化型グルタチオンを含む100 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)にし、室温で一晩静置した。その後、ProteoVavi(資生堂社製)を用いた逆相HPLCにてリフォールディング画分を分取し、凍結乾燥した。

【0702】

作製したIL-2__I129Cの純度をSDS-PAGEにて確認した。その結果、アミノ酸配列から予想される分子量を有する単一のバンドを確認した。

【0703】

[実施例11] IL-2__I129CのPEG化

表17に示すIL-2__I129CのPEG化体(以下PEG結合IL-2改変体と記載する)を以下の方法で調製した。

【0704】

【表17】

作製したPEG結合IL-2改変体

改変体名	PEG導入位置	置換前のアミノ酸残基	置換後のアミノ酸残基	1位修飾	125位変異
I129C-V40(Mal)	129	I	C-V40(Mal)	M	S
I129C-V80(Mal)	129	I	C-V80(Mal)	M	S
I129C-W80(Mal)	129	I	C-W80(Mal)	M	S

【0705】

〈表17の説明〉

- ・PEG導入位置：配列番号1のN末端からの位置。
- ・1位修飾：配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から1番目のアラニン残基の修飾を表す。Mとは、アラニンからメチオニンにアミノ酸残基を置換していることを示す。

・ 1 2 5 位変異：配列番号 1 の N 末端から 1 2 5 番目のアミノ酸残基の変異の有無を示す。アミノ酸残基の変異を加えていない場合は－、システインからセリンにアミノ酸残基を置換する変異を加えている場合は S と記載する。

【 0 7 0 6 】

表中、置換後のアミノ酸残基の列に記載した構造について以下に示す。

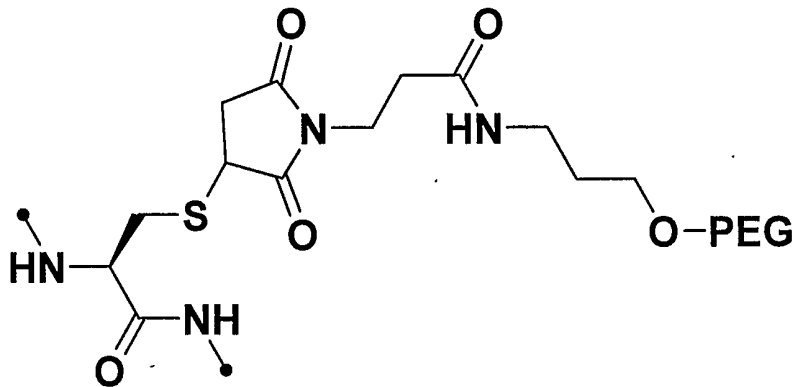
【 0 7 0 7 】

C－PEG (Mal) (V40、V80、W80) とは、システイン側鎖に 3－（3－チオ－2，5－ジオキソピロリジン－1－イル）－プロピルオキシリンカーを介して PEG が導入された下記（式 X 1 1 9）で表される構造であることを示す。この際、C－PEG (Mal) はジオキソピロリジン環が開環した（式 X 1 2 0）または（式 X 1 2 1）で表

10

【 0 7 0 8 】

【化 1 5 3】

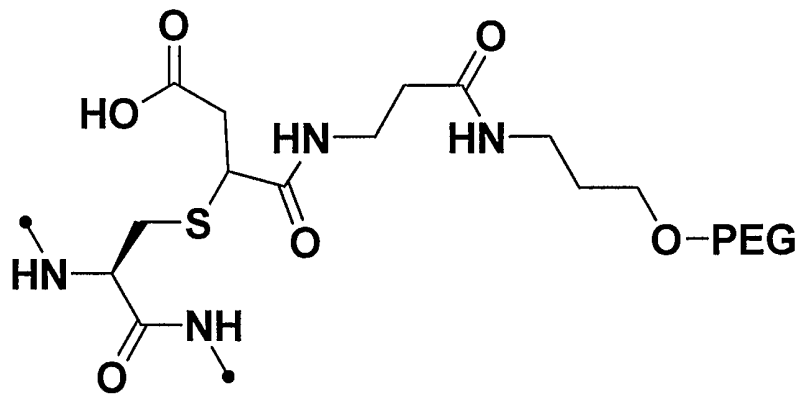


20

（式 X 1 1 9）

【 0 7 0 9 】

【化 1 5 4】



30

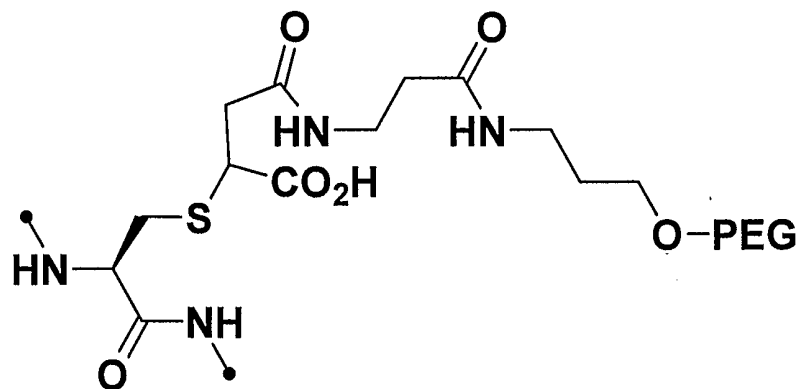
（式 X 1 2 0）

【 0 7 1 0 】

40

50

【化 1 5 5】



(式 X 1 2 1)

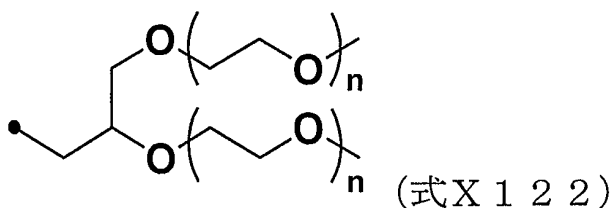
10

【0 7 1 1】

V 4 0 とは、上記 (式 X 1 1 9) ~ (式 X 1 2 1) 中、PEG が平均分子量約 4 0 k D a の下記 (式 X 1 2 2) で表される構造であることを示し、

【0 7 1 2】

【化 1 5 6】



(式 X 1 2 2)

20

【0 7 1 3】

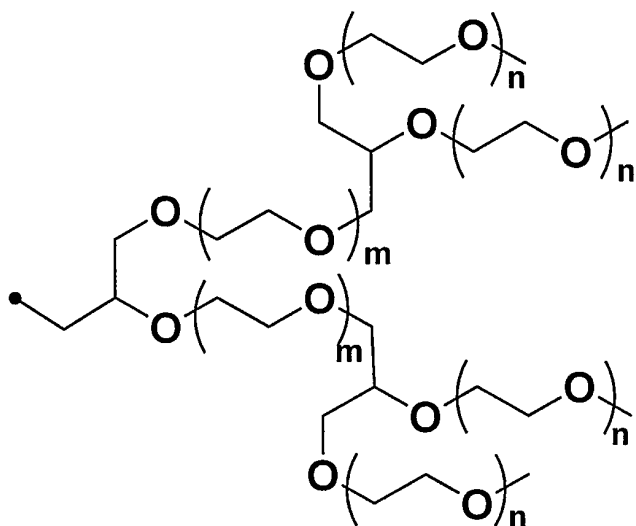
V 8 0 とは、上記 (式 X 1 1 9) ~ (式 X 1 2 1) 中、PEG が平均分子量約 8 0 k D a の上記 (式 X 1 2 2) で表される構造であることを示し、

【0 7 1 4】

W 8 0 とは、上記 (式 X 1 1 9) ~ (式 X 1 2 1) 中、PEG が $(CH_2CH_2O)_m$ の平均分子量が 5 k D a であり、 $(CH_2CH_2O)_n$ の平均分子量が 1 7 . 5 k D a である下記 (式 X 1 2 8) で表される構造であることを示す。

【0 7 1 5】

【化 1 5 7】



(式 X 1 2 8)

40

50

【0716】

実施例10で調製したIL-2__I129Cの凍結乾燥品を2mol/L グアニジン塩酸塩、1mol/L EDTAを含む20mol/L Tris-HCl緩衝液(pH7.0)にて溶解した。PEG-マレイミド(SUNBRIGHT GL2-400MA;日油株式会社またはSUNBRIGHT GL2-800MA;日油株式会社またはSUNBRIGHT GL4-800MA;日油株式会社)をD-PBSで溶解し、これをIL-2__I129Cに対して20mol当量添加し、室温にて一晩静置した。PEG結合IL-2__I129Cは、実施例8に記載の方法で精製した。得られたPEG結合IL-2__I129Cは、NAPカラムを用いて0.4mol/L アルギニン塩酸塩、5w/v% トレハロースを含む10mM酢酸緩衝液(pH4.5)にバッファー置換した。

10

【0717】

精製したPEG結合IL-2改変体の純度をSDS-PAGEにて確認した。その結果すべてのPEG結合IL-2改変体において、IL-2__I129Cに対してPEGの分子量が増加した単一のバンドが認められ、高純度のPEG結合IL-2改変体が得られたことが確認できた。

【0718】

[実施例12]IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 選択性の評価

作製したIL-2改変体のヒトIL-2R $\alpha\beta\gamma$ に対する選択性を以下の方法で評価した。

20

【0719】

マウスpro B細胞株Ba/F3(RCB0805)にヒトIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 、又はヒトIL-2R $\beta\gamma$ を発現させることで、ヒトIL-2依存性生存細胞株を作製した。各細胞は、ヒトCD25、ヒトCD122、ヒトCD132およびmonomeric Azami-Greenをfurin切断配列(RAKR)とfoot-and-mouth-disease virus由来2Aペプチド配列(APVKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP)を介して連結したヒトIL-2R $\alpha\beta\gamma$ -Azamigreen融合体のアミノ酸配列(配列番号19)をコードする遺伝子配列(配列番号20)またはヒトCD122、ヒトCD132およびmonomeric Azami-Greenをfurin切断配列とfoot-and-mouth-disease virus由来2Aペプチド配列を介して連結したヒトIL-2R $\beta\gamma$ -Azamigreen融合体のアミノ酸配列(配列番号21)をコードする遺伝子配列(配列番号22)を有するpDELT AベクターをNucleofector 2b(Lonza社製)を用いてBa/F3に遺伝子導入し、ヒトIL-2に依存性を示すクローンを選抜することで得た。得られた細胞はそれぞれBa/F3-hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ およびBa/F3-hIL-2R $\beta\gamma$ とした。

30

【0720】

Ba/F3-hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ およびBa/F3-hIL-2R $\beta\gamma$ を遠心管に回収し、1200rpmで3分間遠心分離後、上清を吸引除去した。D-PBSにて4回洗浄後、アッセイ用培地[RPMI 1640培地(ナカライテスク社製) 500mLに非働化FBS 50mL(GIBCO社製)およびペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(ナカライテスク社製) 5mLを加えた培地]にて細胞を 5.0×10^4 cells/mLに懸濁し、96穴白色平底プレート(住友ベークライト社製)に100 μ L/wellずつ播種した。

40

【0721】

アッセイ用培地(0%コントロール)、アッセイ用培地にて390nmol/Lに希釈した市販IL-2溶液(終濃度65nmol/L、100%コントロール)および、アッセイ用培地にて終濃度の6倍濃度に希釈した市販IL-2であるPeprotech社製IL-2[以下、IL-2(P)と記載する]およびThermo Fisher Scientific社製IL-2[以下、IL-2(T)と記載する]又は各種糖鎖結合IL

50

－2 溶液（最高終濃度 65 nM、10 倍の希釈系列で 9 条件）を 20 μ L/well ずつ添加し、37℃、5% CO₂ 下で 24～48 時間培養した。

【0722】

Celltiter-Glo 溶液（Promega 社製）を 80 μ L/well ずつ添加し、室温にて 10 分間静置後、マルチプレートリーダー ARVO（Perkin Elmer 社製）にて発光値を測定した。

【0723】

IL-2（P）または IL-2（T）を終濃度 65 nmol/mL で添加したウェルの relative fluorescence units（RLU）値を 100%、IL-2 を含まない培地を添加したウェルの RLU 値を 0% として、各種改変体の IL-2 依存性細胞増殖率（% of IL-2-dependent proliferation）を算出した。得られたデータを基に、統計解析ソフト XLfit5 version 5.3.1.3（IBDS 社製）を用いて EC₅₀ 値の算出を行った。

【0724】

IL-2（P）または IL-2（T）よび各種糖鎖結合 IL-2 改変体に関し、Ba/F3-hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ に対する EC₅₀ 値（EC_{50 $\alpha\beta\gamma$} ）と Ba/F3-hIL-2R $\beta\gamma$ の EC₅₀ 値（EC_{50 $\beta\gamma$} ）の比（EC_{50 $\beta\gamma$} /EC_{50 $\alpha\beta\gamma$} ）を EC₅₀ ratio 値と定義し、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 選択性の指標として用いた。

【0725】

IL-2（P）または IL-2（T）の EC₅₀ ratio 値を 1 とした時の、各種糖鎖結合 IL-2 改変体の EC₅₀ ratio 値を標準化 EC₅₀ ratio 値として、表 18～20 に示す。

【0726】

【表 18】

糖鎖結合 IL-2 改変体の標準化 EC₅₀ ratio 値

標準化 EC ₅₀ ratio 値	改変体
< 5	T3C-2, T3C-9, T3C-11, S4C-2, S4C-9, S4C-11, S5C-2, S5C-9, S5C-11, Q11C-2, Q11C-9, L12C-2, H16C-11, L18C-9, L19N-11, R38C-2, R38C-9, R38C-11, N88-1, N88C-1, I92C-11, V115C-9, N119C-11, I122C-9, S127C-11
5～30	Q11C-11, L12C-9, L12C-11, L18C-2, L18C-11, D20C-2, D20C-11, D84C-2, S87C-2, S87C-11, N88C-9, N88C-11, V91C-2, V91C-9, V91C-11, A108C-2, A108C-9, V115C-2, N119C-2, N119C-9, I122C-2, T123C-11
> 30	Q13C-2, Q13C-11, E15C-2, E15C-11, H16C-2, H16C-3, H16C-5, H16C-9, L19C-2, L19C-9, L19C-11, L19C-11*, N88C-2, I92C-2, S130C-2, S130C-9

【0727】

10

20

30

40

50

【表 19】

糖鎖結合IL-2改変体の標準化EC50 ratio値

標準化 EC50ratio値	改変体
< 5	D84C-11, E95C-2, L12C-11 / H16C-2 / L19C-11, L12C-11 / L19C-11, L12C-11 / N88C-2, L12N-11 / V91N-11, E15C-11 / V91C-11, E15C-11 / T123C-11, H16C-2 / L19C-11, H16C-2 / V91C-11, L19C-11 / V91C-11
5 ~ 30	K8C-11 / L19C-11, L12C-11 / H16C-2, E15C-11 / N119C-11, L19C-11 / M23C-11, T3C-11 / L12C-11 / K32C-11 / K76C-11 / V91C-11
> 30	E15C-17, L19C-17, L12C-11 / V91C-11, L12C-11 / V115C-11, L12C-11 / N119C-11, Q13C-11 / V91C-11, Q13C-11 / V115C-11, Q13C-11 / N119C-11, L19C-11 / V115C-11, V91C-11 / V115C-11, V91C-11 / N119C-11, A1C-11 / T3C-11 / S5C-11 / L12C-11 / V91C-11, T3C-11 / L12C-11 / T51C-11 / V91C-11 / E100C-11, T3C-11 / L12C-11 / K76C-11 / V91C-11 / E100C-11, L12C-11 / V91C-11 / E100C-11 / T102C-11 / M104C-11

10

20

【0728】

30

40

50

【表 20】

N末PEG化、糖鎖結合IL-2改変体およびCys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体の標準化EC50 ratio値

標準化 EC50ratio値	改変体
< 5	T51C-V40(IAc) / L12C-11 / V91C-11, T51C-W40(IAc) / L12C-11 / V91C-11
5 ~ 30	T3C-V40(IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-W40(IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-W80(Mal) / L12C-11 / V91C-2, T3C-V80(Mal) / L12C-11 / N119C-11, T3C-W80(Mal) / L12C-11 / N119C-11, T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / N119C-11, T51C-Li40(IAc) / L12C-11 / V91C-11, T51C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-11, F78C-V40(IAc) / L12C-11 / N119C-11, F78C-V80(Mal) / L12C-11 / N119C-11, F78C-W80(Mal) / L12C-11 / N119C-11
> 30	A1-Li20(CHO) / Q11C-9, A1-Li20(CHO) / L12C-9, A1-Li20(CHO) / R38C-9, A1-Li20(CHO) / V91C-9, A1C-Li40(IAc) / L12C-11 / V91C-11, A1C-V80(Mal) / L12C-11 / V91C-11, A1C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-11, A1C-Y50(Mal) / L12C-11 / V91C-11, A1C-W80(Mal) / L12C-11 / V91C-11, A1C-Y50(IAc) / L19C-11, A1C-V40(IAc) / L19C-11, A1C-Y50(IAc) / V91C-11 / N119C-11, T3C-Li20(IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-Li40(IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-2, T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-Y50(Mal) / L12C-11 / V91C-11 T3C-V40(IAc) / E15C-11, T3C-V80(Mal) / E15C-11, T3C-Y50(IAc) / E15C-11, F78C-Li40(IAc) / L12C-11, F78C-V40(IAc) / L12C-11, F78C-V40(Mal) / L12C-11, F78C-V80(Mal) / L12C-11, F78C-W80(Mal) / L12C-11, F78C-Li40(IAc) / E15C-11

【0729】

表18~20において、標準化EC50 ratio値が5以上の糖鎖結合IL-2改変体およびN末PEG化、糖鎖結合IL-2およびCys-PEG化、糖鎖結合IL-2を、コントロールであるIL-2(P)またはIL-2(T)よりもIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 選択性が高い改変体と判断した。

【0730】

表18~20に示すように、多数の糖鎖結合IL-2改変体およびN末PEG化、糖鎖結合IL-2およびCys-PEG化、糖鎖結合IL-2がIL-2(P)またはIL-2(T)よりもIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 選択性が高い改変体であることが確認できた。さらに、Q13C-2、Q13C-11、E15C-2、E15C-11、H16C-2、H16C-3、H16C-5、H16C-9、L19C-2、L19C-9、L19C-11、L19C-11*、N88C-2、I92C-2、S130C-2、S130C-9、E15C-17、L19C-17、L12C-11/V91C-11、L12C-11/V115C-11、L12C-11/N119C-11、Q13C-11/V91C-11、Q13C-11/V115C-11、Q13C-11/N119C-11、L19C-1

1/V115C-11、V91C-11/V115C-11、V91C-11/N119
 C-11、A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-1
 1、T3C-11/L12C-11/T51C-11/V91C-11/E100C-1
 1、T3C-11/L12C-11/K76C-11/V91C-11/E100C-1
 1、L12C-11/V91C-11/E100C-11/T102C-11/M104
 C-11、A1-Li20(CHO)/Q11C-9、A1-Li20(CHO)/L1
 2C-9、A1-Li20(CHO)/R38C-9、A1-Li20(CHO)/V9
 1C-9、A1C-Li40(IAc)/L12C-11/V91C-11、A1C-V
 80(Mal)/L12C-11/V91C-11、A1C-Y50(IAc)/L12
 C-11/V91C-11、A1C-Y50(Mal)/L12C-11/V91C-1
 1、A1C-W80(Mal)/L12C-11/V91C-11、A1C-Y50(I
 Ac)/L19C-11、A1C-V40(IAc)/L19C-11、A1C-Y50
 (IAc)/V91C-11/N119C-11、T3C-Li20(IAc)/L12
 C-11/V91C-11、T3C-Li40(IAc)/L12C-11/V91C-
 11、T3C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-2、T3C-Y50(I
 Ac)/L12C-11/V91C-11、T3C-Y50(Mal)/L12C-11
 /V91C-11、T3C-V40(IAc)/E15C-11、T3C-V80(Ma
 l)/E15C-11、T3C-Y50(IAc)/E15C-11、F78C-Li4
 0(IAc)/L12C-11、F78C-V40(IAc)/L12C-11、F78
 C-V40(Mal)/L12C-11、F78C-V80(Mal)/L12C-11
 、F78C-W80(Mal)/L12C-11、F78C-Li40(IAc)/E1
 5C-11は標準化EC₅₀ ratio値が30より大きく、コントロールであるIL-
 2(P)またはIL-2(T)よりもIL-2R_{αβγ}に対する選択性が非常に高い糖鎖結
 合IL-2改変体およびN末PEG化、糖鎖結合IL-2およびCys-PEG化、糖鎖
 結合IL-2であることが確認できた。

10

20

【0731】

各種PEG結合IL-2改変体についても、同様の方法でIL-2依存性細胞増殖率を
 測定して標準化EC₅₀ ratio値を算出した結果を、表21および表22に示す。た
 だし、糖鎖結合IL-2改変体のコントロールはIL-2(P)またはIL-2(T)で
 あったのに対し、PEG結合IL-2改変体のコントロールはIL-2(P)または8H

30

【0732】

40

50

【表 2 1】

PEG 結合 IL-2 改変体の標準化 EC₅₀ ratio 値

標準化 EC ₅₀ ratio 値	改変体
< 5	8His-S4(oAzZK)-PEG4, 8His-S5(oAzZK)-PEG4, 8His-S6(oAzZK)-PEG4, 8His-T7(oAzZK)-PEG4, 8His-T7(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-PEG4, 8His-E60(oAzZK)-PEG4, 8His-E60(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-PEG4, 8His-H79(oAzZK)-PEG4, 8His-R81(oAzZK)-PEG4, 8His-R81(oAzZK)-Li20, 8His-R81(oAzZK)-Li30, 8His-L94(oAzZK)-PEG4, 8His-L94(oAzZK)-Li20, 8His-L94(oAzZK)-Li30, 8His-S99(oAzZK)-PEG4, 8His-S99(oAzZK)-Li20, 8His-E100(oAzZK)-PEG4, 8His-E100(oAzZK)-Li30, 8His-T101(oAzZK)-PEG4, 8His-Q126(oAzZK)-PEG4, 8His-Q126(oAzZK)-Li20
5 ~ 30	8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S4(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li30, 8His-S6(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li30, 8His-T7(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-Li30, 8His-E60(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-H79(oAzZK)-Li30, 8His-S99(oAzZK)-Li30, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li30, 8His-Q126(oAzZK)-Li30, 8His-I129(oAzZK)-PEG4, 8His-I129(oAzZK)-Li20
> 30	8His-F78(oAzZK)-Li30, 8His-I129(oAzZK)-Li30

10

20

30

【0733】

40

50

【表 2 2】

PEG結合IL-2改変体の標準化EC₅₀ ratio値

標準化EC ₅₀ ratio値	改変体
< 5	-
5 ~ 3 0	-
> 3 0	8His-F78(oAzZK)-Li40, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-F78(oAzZK)-Y50, F78(oAzZK)-Li40, F78(oAzZK)-V40, F78(oAzZK)-W40, F78(oAzZK)-IIII40, F78(oAzZK)-V80, F78(oAzZK)-W80, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40 8His-I129(mAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-Li30, I129(oAzZK)-Li40, I129(oAzZK)-V40, I129(oAzZK)-W40, I129(oAzZK)-IIII40, I129(oAzZK)-V80, I129(oAzZK)-W80, desAla-I129(oAzZK)-V40, desAla-I129(oAzZK)-W80, desAla-I129(oAzZK)-V80, I129C-V40(Mal), I129C-V80(Mal), I129C-W80(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, S4(oAzZK)-Y50/F78(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, K8(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, S4(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, K8(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30

10

20

30

40

【0 7 3 4】

表 2 1 および表 2 2 において、標準化 E C _{5 0} r a t i o 値が 5 以上の P E G 結合 I L - 2 改変体を、コントロールである 8 H i s - I L - 2 よりも I L - 2 R α β γ 選択性が高い改変体と判断した。

【0 7 3 5】

表 2 1 および表 2 2 に示すように、多数の P E G 結合 I L - 2 改変体が 8 H i s - I L - 2 よりも I L - 2 R α β γ 選択性が高い改変体であることが確認できた。さらに 8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 4 0、8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - V 4 0、8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - W 4 0、8 H i

50

s-F78 (oAzZK) -Y50、F78 (oAzZK) -Li40、F78 (oAzZK) -V40、F78 (oAzZK) -W40、F78 (oAzZK) -IIII40、F78 (oAzZK) -V80、F78 (oAzZK) -W80、8His-I129 (oAzZK) -Li30、8His-I129 (oAzZK) -Li40、8His-I129 (oAzZK) -V40、8His-I129 (mAzZK) -V40、8His-I129 (oAzZK) -W40、8His-I129 (oAzZK) -Y50、I129 (oAzZK) -Li30、I129 (oAzZK) -Li40、I129 (oAzZK) -V40、I129 (oAzZK) -W40、I129 (oAzZK) -IIII40、I129 (oAzZK) -V80、I129 (oAzZK) -W80、desAla-I129 (oAzZK) -V40、desAla-I129 (oAzZK) -W80、desAla-I129 (oAzZK) -V80、I129C-V40 (Mal)、I129C-V80 (Mal)、I129C-W80 (Mal)、8His-S4 (oAzZK) -Li30/F78 (oAzZK) -Li30、S4 (oAzZK) -Li40/F78 (oAzZK) -Li40、S4 (oAzZK) -Y50/F78 (oAzZK) -Y50、8His-S5 (oAzZK) -Li30/F78 (oAzZK) -Li30、S5 (oAzZK) -Li40/F78 (oAzZK) -Li40、8His-K8 (oAzZK) -Li30/F78 (oAzZK) -Li30、K8 (oAzZK) -Li40/F78 (oAzZK) -Li40、8His-F78 (oAzZK) -Li30/H79 (oAzZK) -Li30、8His-F78 (oAzZK) -Li30/S99 (oAzZK) -Li30、8His-F78 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、8His-S4 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、8His-S4 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、S4 (oAzZK) -Li40/I129 (oAzZK) -Li40、S4 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、8His-S5 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、S5 (oAzZK) -Li40/I129 (oAzZK) -Li40、S5 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、8His-K8 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、8His-K8 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、K8 (oAzZK) -Li40/I129 (oAzZK) -Li40、K8 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、8His-H79 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30および8His-S99 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30は標準化EC₅₀ ratio値が30より大きく、コントロールであるIL-2 (P) または8His-IL-2よりもIL-2 R_{αβγ} に対する選択性が非常に高いPEG結合IL-2 改変体であることが確認できた。

【0736】

上記の実験において、IL-2 (P)、IL-2 (T)、野生型IL-2 および8His-IL-2 のEC₅₀ ratio値が同程度であることを確認している。したがって、表18～20において標準化EC₅₀ ratio値が5以上の糖鎖結合IL-2 改変体、およびPEG化糖鎖結合IL-2 改変体、ならびに表21および表22において標準化EC₅₀ ratio値が5以上のPEG結合IL-2 改変体は、野生型IL-2 よりもIL-2 R_{αβγ} 選択性が高い改変体である。

【0737】

【実施例13】 Treg 増殖活性

各種IL-2 のヒトTreg に対する細胞増殖活性を以下の方法で測定した。各種IL-2 として、糖鎖結合IL-2 改変体としてH16C-2、E15C-11、L19C-9、L19C-11、N88C-2、L12C-11/V91C-11、V91C-11/V115C-11、V91C-11/N119C-11 およびA1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2 改変体として、A1C-Y50 (IAc) /L12C-11/V91C-11、T3C-Li20 (IAc) /L12C-11/V91C-11、T3C-Y50 (IAc)

/L12C-11/V91C-11、T3C-Y50 (IAc) /E15C-11、T3C-V40 (IAc) /E15C-11、T3C-V80 (Mal) /E15C-11およびF78C-V40 (IAc) /L12C-11、PEG結合IL-2改変体として、8His-S4 (oAzZK) -Li20、8His-S5 (oAzZK) -Li20、8His-S6 (oAzZK) -Li20、8His-T7 (oAzZK) -Li20、8His-K8 (oAzZK) -Li20、8His-E60 (oAzZK) -Li20、8His-F78 (oAzZK) -Li20、8His-F78 (oAzZK) -V40、8His-F78 (oAzZK) -W40、8His-H79 (oAzZK) -Li20、8His-R81 (oAzZK) -Li20、8His-L94 (oAzZK) -Li20、8His-S99 (oAzZK) -Li20、8His-E100 (oAzZK) -Li20、8His-T101 (oAzZK) -Li20、8His-Q126 (oAzZK) -Li20、8His-I129 (oAzZK) -Li20、8His-I129 (oAzZK) -Li40、8His-I129 (oAzZK) -V40、8His-I129 (oAzZK) -W40、8His-I129 (oAzZK) -Y50、I129 (oAzZK) -V40、I129 (oAzZK) -W80、I129C-V40 (Mal)、8His-S4 (oAzZK) -Li30/F78 (oAzZK) -Li30、8His-S5 (oAzZK) -Li30/F78 (oAzZK) -Li30、8His-K8 (oAzZK) -Li30/F78 (oAzZK) -Li30、8His-F78 (oAzZK) -Li30/H79 (oAzZK) -Li30、8His-F78 (oAzZK) -Li30/S99 (oAzZK) -Li30、8His-F78 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、8His-S4 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、S4 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、8His-S5 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、S5 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、8His-K8 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30、K8 (oAzZK) -Y50/I129 (oAzZK) -Y50、8His-H79 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30および8His-S99 (oAzZK) -Li30/I129 (oAzZK) -Li30ならびにコントロールとしてIL-2 (P) および8His-IL-2を使用した。

【0738】

凍結ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) (AllCells社製) を37℃の温浴にて溶解後、培養用培地 [X-vivo15 SFM (Lonza社製) 1000mL、非働化ヒトAB血清 (SIGMA社製) 150mL] 10mLに懸濁し、接着用T-75フラスコ (greiner bio-one社製) に播種して24時間静置培養した (37℃、95vol% air/5vol% CO₂下)。細胞を全量回収し、EasySep Human CD4⁺ T cells Enrichment kit (STEMCELL Technologies社製) を用いてCD4⁺ T細胞を濃縮した。

【0739】

Anti-human CD4-Alexa488 (Biolegend社製)、anti-human CD25-PE (BD Pharmingen社製)、anti-human CD127-BV421 (Biolegend社製) にて染色後 (氷上、30分間)、セルソーターSH800 (SONY社製) にてCD4⁺CD25⁺CD127^{low}画分 (Treg) を分離した。

【0740】

分離したTregおよび培養用培地にて3回洗浄したCD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fischer Scientific社製) を混合して、それぞれ 3.4×10^4 個/mLになるよう培養用培地にて懸濁し、96穴U底プレート (Corning社製) に150μL/wellずつ播種した。培養用培地で終濃度の4倍濃度に希釈した各種IL-2溶液を50μL/wellずつ添加して、37℃、5% CO₂下で培養を開始した。

【0741】

5～7日間培養した後、各ウェルの全液量のうち50μLを、96穴白色プレートに移した。Celltiter-Glo溶液を50μL/wellずつ添加し、室温にて10分間静置した後、ルミノメーター（TURNER BIOSYSTEMS社製）にて発光値を測定した。

【0742】

コントロールのIL-2（P）または8His-IL-2を終濃度65nmol/Lで添加したウェルのRLU値を100%、IL-2を含まない培地を添加したウェルのRLU値を0%として、各種IL-2のTreg増殖率を算出した。

【0743】

得られた結果を図1A～Jに示す。図1A～Cに示すように、IL-2（P）はIL-2濃度650pmol/LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示したのに対し、糖鎖結合IL-2改変体であるH16C-2、E15C-11、L19C-9、L19C-11*、N88C-2、L12C-11/V91C-11、V91C-11/V115C-11およびV91C-11/N119C-11、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体であるT3C-Y50（IAC）/E15C-11は、IL-2濃度650～6500pmol/LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示した。

【0744】

また、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体である、L12C-11/F78C-V40（IAC）は、IL-2濃度65nmol/LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示した。糖鎖結合IL-2改変体である、A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体である、A1C-Y50（IAC）/L12C-11/V91C-11、T3C-Li20（IAC）/L12C-11/V91C-11、T3C-Y50（IAC）/L12C-11/V91C-11、T3C-V40（IAC）/E15C-11およびT3C-V80（Mal）/E15C-11は、IL-2濃度65nmol/LにおいてもIL-2依存性細胞増殖率は80%以下であった。

【0745】

また、図1D～Jに示すように、コントロールである8His-IL-2はIL-2濃度6500pmol/LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示したのに対し、PEG結合IL-2改変体である8His-S4（oAZZK）-Li20、8His-S5（oAZZK）-Li20、8His-S6（oAZZK）-Li20、8His-T7（oAZZK）-Li20、8His-K8（oAZZK）-Li20、8His-E60（oAZZK）-Li20、8His-F78（oAZZK）-Li20、8His-F78（oAZZK）-V40、8His-F78（oAZZK）-W40、8His-H79（oAZZK）-Li20、8His-R81（oAZZK）-Li20、8His-L94（oAZZK）-Li20、8His-S99（oAZZK）-Li20、8His-E100（oAZZK）-Li20、8His-T101（oAZZK）-Li20、8His-Q126（oAZZK）-Li20、8His-I129（oAZZK）-Li20、8His-I129（oAZZK）-Li40、8His-I129（oAZZK）-V40、8His-I129（oAZZK）-W40、8His-I129（oAZZK）-Y50、I129（oAZZK）-V40、I129C-V40（Mal）、8His-S4（oAZZK）-Li30/F78（oAZZK）-Li30、8His-S5（oAZZK）-Li30/F78（oAZZK）-Li30、8His-K8（oAZZK）-Li30/F78（oAZZK）-Li30、8His-F78（oAZZK）-Li30/S99（oAZZK）-Li30、8His-S4（oAZZK）-Li30/I129（oAZZK）-Li30、8His-S5（oAZZK）-Li30/I129（oAZZK）-Li30、8His-K8（oAZZK）-Li30/I129（oAZZK）-Li30、および8His-S99（oAZZK）-Li30/I129（oAZZK）-Li30は、IL-2濃度650～6500pm

10

20

30

40

50

o l / LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示した。

【0746】

また、PEG結合IL-2改変体であるI129(oAzZK)-W80、8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30、8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30、S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50、S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50、K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50および8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30は、IL-2濃度65nmol/LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示した。

【0747】

以上の結果から、評価した全てのIL-2改変体がTregの細胞増殖活性を有することが確認された。また、コントロールであるIL-2(P)または8His-IL-2(P)に対して、各種IL-2改変体、糖鎖結合IL-2改変体であるH16C-2、E15C-11、L19C-9、L19C-11*、N88C-2、L12C-11/V91C-11、V91C-11/V115C-11およびV91C-11/N119C-11、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体であるT3C-Y50(IAc)/E15C-11、並びにPEG結合IL-2改変体である8His-S4(oAzZK)-Li20、8His-S5(oAzZK)-Li20、8His-S6(oAzZK)-Li20、8His-T7(oAzZK)-Li20、8His-K8(oAzZK)-Li20、8His-E60(oAzZK)-Li20、8His-F78(oAzZK)-Li20、8His-F78(oAzZK)-V40、8His-F78(oAzZK)-W40、8His-H79(oAzZK)-Li20、8His-R81(oAzZK)-Li20、8His-L94(oAzZK)-Li20、8His-S99(oAzZK)-Li20、8His-E100(oAzZK)-Li20、8His-T101(oAzZK)-Li20、8His-Q126(oAzZK)-Li20、8His-I129(oAzZK)-Li20、8His-I129(oAzZK)-Li40、8His-I129(oAzZK)-V40、8His-I129(oAzZK)-W40、8His-I129(oAzZK)-Y50、I129(oAzZK)-V40、I129C-V40(Mal)、8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30、8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30、8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30、8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30、8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30、8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30、8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30、および8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30のTreg増殖活性は維持されていた。

【0748】

また、コントロールであるIL-2(P)または8His-IL-2(P)に対して、各種IL-2改変体、糖鎖結合IL-2改変体であるA1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体であるA1C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11、T3C-Li20(IAc)/L12C-11/V91C-11、T3C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11、T3C-V40(IAc)/E15C-11、T3C-V80(Mal)/E15C-11およびF78C-V40(IAc)/L12C-11、PEG結合IL-2改変体である、I129(oAzZK)-W80、8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30、8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30、S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50、S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y5

10

20

30

40

50

0、K8 (oAzZK) - Y50 / I129 (oAzZK) - Y50 および 8His - H79 (oAzZK) - Li30 / I129 (oAzZK) - Li30 の Treg 増殖活性は低下した。

【0749】

【実施例14】NK細胞増殖活性

各種IL-2のヒトNK細胞の細胞増殖活性を以下の方法で測定した。各種IL-2改変体として、糖鎖結合IL-2改変体として、H16C-2、E15C-11、L19C-9、L19C-11*、N88C-2、L12C-11/V91C-11、V91C-11/V115C-11、V91C-11/N119C-11およびA1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体として、A1C-Y50 (IAC) / L12C-11/V91C-11、T3C-Li20 (IAC) / L12C-11/V91C-11、T3C-Y50 (IAC) / L12C-11/V91C-11、T3C-Y50 (IAC) / E15C-11、T3C-V40 (IAC) / E15C-11、T3C-V80 (Mal) / E15C-11およびF78C-V40 (IAC) / L12C-11、PEG結合IL-2改変体として、8His-S4 (oAzZK) - Li20、8His-S5 (oAzZK) - Li20、8His-S6 (oAzZK) - Li20、8His-T7 (oAzZK) - Li20、8His-K8 (oAzZK) - Li20、8His-E60 (oAzZK) - Li20、8His-F78 (oAzZK) - Li20、8His-F78 (oAzZK) - V40、8His-F78 (oAzZK) - W40、8His-H79 (oAzZK) - Li20、8His-R81 (oAzZK) - Li20、8His-L94 (oAzZK) - Li20、8His-S99 (oAzZK) - Li20、8His-E100 (oAzZK) - Li20、8His-T101 (oAzZK) - Li20、8His-Q126 (oAzZK) - Li20、8His-I129 (oAzZK) - Li20、8His-I129 (oAzZK) - Li40、8His-I129 (oAzZK) - V40、8His-I129 (oAzZK) - W40、8His-I129 (oAzZK) - Y50、I129 (oAzZK) - V40、I129 (oAzZK) - W80、I129C-V40 (Mal)、8His-S4 (oAzZK) - Li30/F78 (oAzZK) - Li30、8His-S5 (oAzZK) - Li30/F78 (oAzZK) - Li30、8His-K8 (oAzZK) - Li30/F78 (oAzZK) - Li30、8His-F78 (oAzZK) - Li30/H79 (oAzZK) - Li30、8His-F78 (oAzZK) - Li30/S99 (oAzZK) - Li30、8His-F78 (oAzZK) - Li30/I129 (oAzZK) - Li30、8His-S4 (oAzZK) - Li30/I129 (oAzZK) - Li30、S4 (oAzZK) - Y50/I129 (oAzZK) - Y50、8His-S5 (oAzZK) - Li30/I129 (oAzZK) - Li30、S5 (oAzZK) - Y50/I129 (oAzZK) - Y50、8His-K8 (oAzZK) - Li30/I129 (oAzZK) - Li30、K8 (oAzZK) - Y50/I129 (oAzZK) - Y50、8His-H79 (oAzZK) - Li30/I129 (oAzZK) - Li30および8His-S99 (oAzZK) - Li30/I129 (oAzZK) - Li30ならびにコントロールとしてIL-2 (P) および8His-IL-2を使用した。

【0750】

ヒトPBMCからのNK細胞の分離は下記方法で実施した。実施例13に記載の方法にて凍結ヒトPBMCを解凍し、NK Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotech社製)を用いてCD56⁺ NK細胞を分離した。分離した細胞を培養用培地にて3回洗浄後(1500rpm、室温、5分間)、下記の増殖アッセイに供した。

【0751】

分離したNK細胞を 1.3×10^5 cells/mLになるよう培養用培地またはX-vivo10 SFM (Lonza社製)にて懸濁し、96穴U底プレートに150μL

10

20

30

40

50

／well (2×10⁴ cells／well) ずつ播種した。培養用培地またはX-vivo 10 SFMで終濃度の4倍濃度に希釈したIL-2溶液を50μL／wellずつ添加し、37℃、5% CO₂下で4～6日間培養した。その後、各種IL-2のNK細胞増殖率を実施例13に記載の方法にて算出した。

【0752】

増殖用培地を用いて得られた結果を図2A～Hに、X-vivo 10 SFMを用いて得られた結果を図2I～Kに示す。

【0753】

図2A、HおよびKに示すように、IL-2 (P) は増殖用培地ではIL-2濃度6500 pmol／LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示したのに対し、糖鎖結合IL-2改変体である、H16C-2およびL19C-9は、IL-2濃度65 nmol／LにおいてもIL-2依存性細胞増殖率は20%以上、80%未満であり、糖鎖結合IL-2改変体である、N88C-2およびL12C-11／V91C-11、Cys-PEG化、糖鎖結合IL-2改変体である、A1C-Y50 (IAC)／L12C-11／V91C-11、T3C-Li20 (IAC)／L12C-11／V91C-11、T3C-Y50 (IAC)／L12C-11／V91C-11、T3C-Y50 (IAC)／E15C-11、T3C-V40 (IAC)／E15C-11、T3C-V80 (Mal)／E15C-11およびL12C-11／F78C-V40 (IAC) は、IL-2濃度65 nmol／LにおいてもIL-2依存性細胞増殖率は20%未満を示した。

【0754】

また、IL-2 (P) はX-vivo 10 SFMではIL-2濃度65 pmol／LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示したのに対し、糖鎖結合IL-2改変体である、E15C-11はIL-2濃度6500 pmol／LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示し、糖鎖結合IL-2改変体である、L19C-11*、V91C-11／V115C-11およびV91C-11／N119C-11は、IL-2濃度65 nmol／LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示し、糖鎖結合IL-2改変体である、A1C-11／T3C-11／S5C-11／L12C-11／V91C-11はIL-2濃度65 nmol／LにおいてもIL-2依存性細胞増殖率は20%以下であった。

【0755】

次いで図2B～GおよびI～Jに示すように、8His-IL-2は増殖用培地ではIL-2 (P) と同様にIL-2濃度6500 pmol／LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示したのに対し、PEG結合IL-2改変体である、8His-S4 (oAZZK)-Li20、8His-S5 (oAZZK)-Li20、8His-S6 (oAZZK)-Li20、8His-T7 (oAZZK)-Li20、8His-K8 (oAZZK)-Li20、8His-E60 (oAZZK)-Li20、8His-F78 (oAZZK)-Li20、8His-H79 (oAZZK)-Li20、8His-R81 (oAZZK)-Li20、8His-L94 (oAZZK)-Li20、8His-S99 (oAZZK)-Li20、8His-E100 (oAZZK)-Li20、8His-T101 (oAZZK)-Li20および8His-Q126 (oAZZK)-Li20 はIL-2濃度65 nmol／LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が80%以上を示し、PEG結合IL-2改変体である、8His-I129 (oAZZK)-Li20、8His-F78 (oAZZK)-V40、8His-F78 (oAZZK)-W40、8His-I129 (oAZZK)-Li40、8His-I129 (oAZZK)-V40、8His-I129 (oAZZK)-W40および8His-I129 (oAZZK)-Y50はIL-2濃度65 nmol／LにおいてIL-2依存性細胞増殖率が20%以上、80%未満であり、PEG結合IL-2改変体である、I129 (oAZZK)-W80、I129C-V40 (Mal)、8His-S4 (oAZZK)-Li30／I129 (oAZZK)-Li30、S4 (oAZZK)-Y50／I129 (oAZZK)-Y50、8His-S5 (oAZZK)-Li30／I129 (oA

10

20

30

40

50

z Z K) - L i 3 0、S 5 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、
 8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0 および K
 8 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0 は I L - 2 濃度 6 5 n m
 o l / L においても I L - 2 依存性細胞増殖率は 2 0 % 未満であった。また、I L - 2 (P) は X - v i v o 1 0 S F M では I L - 2 濃度 6 5 p m o l / L において I L - 2 依
 存性細胞増殖率が 8 0 % 以上を示したのに対し、P E G 結合 I L - 2 改変体である、I 1
 2 9 (o A z Z K) - V 4 0、8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A
 z Z K) - L i 3 0 および 8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / S 9 9 (o A z
 Z K) - L i 3 0 は I L - 2 濃度 6 5 n m o l / L において I L - 2 依存性細胞増殖率が
 8 0 % 以上を示し、P E G 結合 I L - 2 改変体である、8 H i s - S 4 (o A z Z K) -
 L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0
 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / H 7
 9 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9
 (o A z Z K) - L i 3 0 および 8 H i s - H 7 9 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9
 (o A z Z K) - L i 3 0 は I L - 2 濃度 6 5 n m o l / L においても I L - 2 依存性細胞増殖率は 2 0 % 以上、8 0 % 未満であった。8 H i s - S 9 9 (o A z Z K) - L i 3
 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0 は最大添加濃度 6 5 0 0 p m o l / L において
 I L - 2 依存性細胞増殖率は 3 0 % であった。

【0756】

以上の結果から、評価した全ての I L - 2 改変体において N K 細胞に対する細胞増殖活
 性が低下していることが確認された。特に、糖鎖結合 I L - 2 改変体である H 1 6 C - 2
 、E 1 5 C - 1 1、L 1 9 C - 9、L 1 9 C - 1 1 *、N 8 8 C - 2、L 1 2 C - 1 1 /
 V 9 1 C - 1 1、V 9 1 C - 1 1 / V 1 1 5 C - 1 1、V 9 1 C - 1 1 / N 1 1 9 C - 1
 1 および A 1 C - 1 1 / T 3 C - 1 1 / S 5 C - 1 1 / L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1
 、C y s - P E G 化、糖鎖結合 I L - 2 改変体である A 1 C - Y 5 0 (I A c) / L 1 2
 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1、T 3 C - L i 2 0 (I A c) / L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C -
 1 1、T 3 C - Y 5 0 (I A c) / L 1 2 C - 1 1 / V 9 1 C - 1 1、T 3 C - Y 5 0 (I A c) / E 1 5 C - 1 1、T 3 C - V 4 0 (I A c) / E 1 5 C - 1 1、T 3 C - V 8
 0 (M a l) / E 1 5 C - 1 1 および L 1 2 C - 1 1 / F 7 8 C - V 4 0 (I A c)、P
 E G 結合 I L - 2 改変体である 8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) - V 4 0、8 H i s - F
 7 8 (o A z Z K) - W 4 0、8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 2 0、8 H i s
 - I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 4 0、8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - V 4 0、8
 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - W 4 0、8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0
 、I 1 2 9 (o A z Z K) - V 4 0、I 1 2 9 (o A z Z K) - W 8 0、I 1 2 9 C - V
 4 0 (M a l)、8 H i s - S 4 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L
 i 3 0、8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、
 8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s
 - F 7 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / H 7 9 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s - F 7
 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / S 9 9 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s - F 7 8 (o
 A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、8 H i s - S 4 (o A z Z
 K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、S 4 (o A z Z K) - Y 5 0 / I
 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、8 H i s - S 5 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o
 A z Z K) - L i 3 0、S 5 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5
 0、8 H i s - K 8 (o A z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0、K
 8 (o A z Z K) - Y 5 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0、8 H i s - H 7 9 (o A
 z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0 および 8 H i s - S 9 9 (o A
 z Z K) - L i 3 0 / I 1 2 9 (o A z Z K) - L i 3 0 は、コントロールである I L -
 2 (P) および 8 H i s - I L - 2 よりも大きく細胞増殖活性が低下していることが確認
 された。

【0757】

TregはIL-2R $\alpha\beta\gamma$ を発現しており、NK細胞はIL-2R $\beta\gamma$ を発現している。実施例13および14の結果から、評価した全てのIL-2改変体は、IL-2R $\beta\gamma$ を発現するNK細胞ではなく、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ を発現するTregを選択的に増殖させることが明らかとなった。

【0758】

【実施例15】IL-2刺激Tregによる、Trespの増殖阻害活性

以下に記載する方法で、各種IL-2で刺激して増殖させたヒトTregによる、ヒトTrespの増殖阻害活性を測定した。すべての細胞は同一ロットの凍結ヒトPBMCより分離した。各種IL-2としては、糖鎖結合IL-2改変体H16C-2、L19C-9、およびN88C-2ならびにコントロールとしてIL-2(P)を使用した。

【0759】

アッセイの7日前に、実施例13に記載の方法で、凍結ヒトPBMCからTregを分離した。得られたTregをCD3/CD28 Dynabeads (Treg:beads=1:1) および各種IL-2 (終濃度65 nM) 存在下で7日間培養した。得られた細胞をIL-2刺激Tregとした。

【0760】

試験当日の細胞調製は次の通りに実施した。実施例13に記載の方法で凍結ヒトPBMCからTregを分離し、これを未刺激Tregとした。凍結ヒトPBMCからEasy Sep Human T Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies社製) およびEasy Sep Human Pan-CD25 Positive Selection and Depletion Kit (STEMCELL Technologies社製) を用いてCD3⁺CD25⁻T細胞を分離後、10% FBS含有RPMI1640培地で40 μ mol/Lに希釈したCelltrace violet (Thermo Fischer SCIENTIFIC社製) を室温にて5分間反応させることで細胞をラベリングした。

【0761】

得られた細胞はレスポンダーT細胞 (Tresp) とした。凍結ヒトPBMCからAnti-HLA-DR MicroBeads, human (Miltenyi Biotec社製) を用いてHLA-DR⁺細胞を分離した。得られた細胞はAPC (Antigen presenting cell) とした。

【0762】

得られた細胞は抗CD3抗体OKT3 (Biolegend社製) を終濃度0.5 μ g/mLになるよう添加したX-vivo15 SFMで懸濁後、Trespは 2×10^4 cells/well (50 μ L)、APCは 1×10^5 cells/well (50 μ L)、Tregは $1.6 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$ cells/well (50 μ L) (Tresp:Treg=4:1~128:1) で96穴V底プレート (住友ベークライト社製) に播種し、37℃、5% CO₂下で4日間培養した。

【0763】

その後、細胞をanti-human CD4-APC (BD Pharmingen社製) およびanti-human CD8-PE (BD Pharmingen社製) で染色 (室温にて15分間) した後に、フローサイトメーターFACS Canto II (BD Biosciences社製) にて各種蛍光強度を測定した。

【0764】

得られたデータは、FCS fileとして出力した後に、データ解析ソフトFlow Jo (TreeStar, version 7.6.5) を用いてCD4⁺TrespまたはCD8⁺Trespにおける細胞の平均分裂回数であるdivision index値について解析を行った。

【0765】

APCとTrespを添加し、Treg無添加のウェルのdivision index値を100%コントロール、Trespのみ添加したウェルのdivision in

10

20

30

40

50

dex値を0%コントロールとして、未刺激Treg、またはIL-2刺激Treg添加時のTrespの細胞増殖率を算出した。得られた結果を図3(A)および図3(B)に示す。

【0766】

図3(A)および図3(B)に示すように、CD4⁺TrespおよびCD8⁺Trespの細胞増殖は、未刺激Tregを用いた場合、Tregを最大量の 5×10^3 cells/well (Tresp:Treg=4:1)で添加した場合でも阻害されなかった。

【0767】

一方、IL-2(P)、糖鎖結合IL-2改変体H16C-2、L19C-9、およびN88C-2を用いて刺激し、増殖させたIL-2刺激Tregを添加した場合は、いずれも未刺激Tregを添加したときよりもTrespの増殖が阻害された。

【0768】

IL-2刺激Tregにより、CD4⁺Trespの増殖は最大40~60%程度、CD8⁺Trespの増殖は最大30~40%程度阻害された。市販IL-2で刺激したTregと、糖鎖結合IL-2改変体で刺激したTregとでは、Trespの増殖阻害率は同等であった。

【0769】

以上の結果から、作製した糖鎖結合IL-2改変体は、Tregの抑制活性をIL-2(P)と同程度に増強することが明らかとなった。

【0770】

【実施例16】 Ex vivoアッセイ

各種IL-2で刺激したヒトPBMCの各種サイトカインの産生量を以下に記載する方法で測定した。各種IL-2としては、糖鎖結合IL-2改変体H16C-2、L19C-9、およびN88C-2ならびにポジティブコントロールとしてIL-2(P)を使用した。

【0771】

ヒト末梢血を15mL遠心管に分注後、2000rpmで10分間遠心分離し、上清を回収することでヒト血漿を得た。得られた血漿は0.22μmフィルターを用いて濾過滅菌した。回収した血漿と等量のPBSを末梢血に添加し希釈後、Ficoll Plus (GEヘルスケア社製)を用いた密度勾配遠心法によりヒトPBMCを得た。

【0772】

得られたヒトPBMCを自己血漿で 5×10^6 cells/mLに懸濁し、そこに抗CD3抗体OKT3を終濃度0.5μg/mLになるよう添加した。96穴U底プレートに180μl/wellで播種後、0.1%BSA-PBSで終濃度の10倍濃度に希釈した各種IL-2を20μl/wellずつ添加した。37℃、5% CO₂下で5日間培養後、培養上清を回収し、上清中のサイトカイン産生量をHuman Th1/2/17 CBA kit (BD Biosciences社製)を用いて定量した。

【0773】

また得られたヒトPBMCを用いて、以下に記載する方法で各種IL-2のTreg選択的増殖活性を測定した。ヒトPBMCと、Anti-human CD4-Alexa 488を反応後、PerFix-EXPOSE Phospho Epitope Exposure Kit (Beckman Coulter社製)のPerFix EXPOSE Buffer 1およびPerFix EXPOSE Buffer 2を用いて細胞の固定および透過処理を行った後に、anti-human CD25-PE (BD Biosciences社製)とanti-human Foxp3 Alexa647 (Biolegend社製、Cat#320214)を含むPerFix EXPOSE Buffer 3を添加し、細胞を染色した(遮光、室温、60分間)。

【0774】

さらに、PerFix EXPOSE Buffer 4を添加して細胞を2回洗浄後(2500rpm、3分間遠心分離)、フローサイトメーターLSRFortessa (B

10

20

30

40

50

D Biosciences社製)にて各種蛍光強度を測定した。

【0775】

得られたデータは、FCS fileとして出力した後に、データ解析ソフトFlow Jo (TreeStar社製、version 7.6.5)を用いて解析を行った。CD4陽性画分の中で、CD25⁺Foxp3^{high}画分をTreg、CD25⁺Foxp3^{low}画分をエフェクターT細胞(Teff)とし、その存在比[Treg(%) / Teff(%)]を算出し、Treg選択的増殖活性の指標とした。

【0776】

測定されたサイトカイン産生量の結果を図4(A)～図4(E)に示す。図4(A)～図4(E)に示すように、IL-2(P)は、測定したサイトカインのうち、IL-4、IL-6、IL-10、IFN γ およびTNF α の全てのサイトカインの産生を促進していた。

10

【0777】

一方、糖鎖結合IL-2改変体ではIL-6およびIL-10産生量は市販IL-2と同程度であったが、IL-4、IFN γ およびTNF α の産生量が低下していた。IL-17Aの産生はどの培養条件でも検出限界以下であった。

【0778】

IL-10は抗炎症性サイトカインであり、IL-6、IL-4、IFN γ 、およびTNF α は炎症性サイトカインである。

【0779】

以上の結果から、作製した糖鎖結合IL-2改変体の炎症性サイトカインの産生促進活性は、IL-2(P)よりも大幅に低下していることが確認できた。

20

【0780】

また、得られたTreg/Teff比を図4(F)に示す。図4(F)に示すように、IL-2(P)で刺激した場合のTreg/Teff比は0.2～0.3程度であった。一方、糖鎖結合IL-2改変体H16C-2、L19C-9、およびN88C-2で刺激した場合のTreg/Teff比は、いずれも0.3～0.5程度であった。

【0781】

以上の結果から、生体内の環境に近い多様な免疫細胞が存在する培養条件下において、作製した糖鎖結合IL-2改変体はIL-2(P)と比べて、TeffよりもTregを選択的に増殖させることが明らかとなった。TregおよびTeffはともにIL-2R $\alpha\beta\gamma$ を発現しているが、当該IL-2改変体は、TeffよりもTregを選択的に増殖させる性質を有し、炎症を鎮静化させるのに望ましいIL-2改変体である。

30

【0782】

【実施例17】 親和性解析

下記の方法で、各種IL-2のhuman CD25ECD-Fcおよびhuman IL-2R $\beta\gamma$ ECD-Fcに対する親和性を測定した。各種IL-2として、糖鎖結合IL-2改変体L12C-2、L12C-9、L12C-11、H16C-2、L19C-9、L12C-11、N88C-2およびV91C-11、ならびにコントロールとして野生型IL-2、8His-IL-2およびIL-2(P)を使用した。

40

【0783】

human CD25ECD-Fcおよびhuman IL-2R $\beta\gamma$ ECD-FcヒトCD25の細胞外領域とC末端にAvitag配列(GLNDIFEAQKIEWHE)を有するヒトIgG1由来Fcから成るCD25ECD-Fc-Avitagのアミノ酸配列(配列番号23)を基に設計した塩基配列(配列番号24)を、INPEP4ベクターのBglII制限酵素サイトとBamHI制限酵素サイトに挿入することで、哺乳類細胞用のヒトCD25ECD-Fc-Avitag発現ベクターを作製した。

【0784】

また、ヒトCD122の細胞外領域とY354C/T366W変異およびC末端にAvitag配列およびポリヒスチジンタグ配列(HHHHHHHH)を有するヒトIgG1

50

由来Fc領域から成るCD122ECD-Fc(knob)-Avitag-8Hisと、ヒトCD132の細胞外領域とY349C/T366S/L368A/Y407V変異およびC末端にFLAGタグ配列を有するヒトIgG1由来Fc領域から成るCD132ECD-Fc(hole)-FLAGをfurin切断配列とfoot-and-mouth-disease virus由来2Aペプチド配列を介して連結したヒトCD122ECD-Fc-Avitag-8His__ヒトCD132ECD-Fc-FLAGのアミノ酸配列(配列番号25)を基に設計した塩基配列(配列番号26)を、INPEP4ベクターのBglII制限酵素サイトとBamHI制限酵素サイトに挿入することで、哺乳類細胞用のヒトIL-2R β γ ECD-Fc発現ベクターを作製した。

【0785】

得られたプラスミドとExpi293 Expression System(ThermoFisher SCIENTIFIC社製)を用いて、各種Fc融合タンパク質を培養上清中に発現させた。CD25ECD-FcはMabselect sure(GEヘルスケア社製)を用いて粗精製後、Superdex 200 10/300GL(GEヘルスケア社製)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによりモノマー画分を分取した(移動相: D-PBS)。

【0786】

一方、IL-2R β γ ECD-FcはMabselect sureを用いて粗精製後、Superdex 200 10/300GLを用いたサイズ排除クロマトグラフィー(移動相: D-PBS)およびANTI-FLAG M2 Affinity Agarose Gelを用いた精製によりモノマー画分を分取した。

【0787】

Series S Sensor chip CM5(GEヘルスケア社製)をBiacore T-100(GEヘルスケア社製)にセットし、Human Antibody Capture Kit(GEヘルスケア社製)を用いて、親和性測定用フローセルおよびリファレンス用フローセルにanti-human Fcを固定化した。

【0788】

次に、HBS-EP(+)バッファー(GEヘルスケア社製)にて流路を置換した後、リガンドとして、HBS-EP(+)にて希釈したCD25ECD-Fc又はIL-2R β γ ECD-Fcを、親和性測定用フローセルにのみ添加した(固定化量: 200~900 RU)。

【0789】

その後、アナライトとして、HBS-EP(+)バッファーにて至適濃度に希釈したIL-2(P)を親和性測定用フローセルおよびリファレンス用フローセルに添加し、センサーグラムを得た。フローセルの再生反応には3 mol/L MgCl₂を用いた。

【0790】

得られたセンサーグラムからの速度論定数の算出にはBiacore T-100 Evaluation softwareを用いた。CD25ECD-Fcに対する結合の解析にはsteady stateモデルを用い、解離定数K_Dを求めた。IL-2R β γ ECD-Fcに対する結合の解析には1:1 binding modelを用い、結合速度定数k_a、解離速度定数k_dおよびK_Dをそれぞれ求めた。得られたK_Dを表23に示す。

【0791】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

改変体名	K_D (M)	
	hCD25ECD-Fc	hIL-2R $_{\beta\gamma}$ ECD-Fc
IL-2 (P)	1.30×10^{-8}	2.09×10^{-10}
8His-IL-2	1.50×10^{-8}	2.09×10^{-10}
野生型IL-2	3.32×10^{-8}	2.15×10^{-10}
L12C-2	1.33×10^{-8}	3.67×10^{-10}
L12C-9	1.46×10^{-8}	8.31×10^{-10}
L12C-11	1.51×10^{-8}	7.40×10^{-10}
H16C-2	1.25×10^{-8}	1.11×10^{-8}
L19C-9	2.09×10^{-8}	2.10×10^{-9}
L19C-11	1.98×10^{-8}	3.34×10^{-9}
N88C-2	1.12×10^{-8}	4.39×10^{-8}
V91C-11	1.35×10^{-8}	5.84×10^{-10}

10

【0792】

20

表 2 3 に示すように、CD 2 5 に対する K_D 値は、糖鎖結合 IL-2 改変体と IL-2 (P) とで同程度であった。一方、IL-2 R $_{\beta\gamma}$ に対する K_D 値は、糖鎖結合 IL-2 改変体が IL-2 (P) よりも高かった。

【0793】

表 1 8 ~ 2 0 の結果と合わせると、IL-2 R $_{\beta\gamma}$ に対する K_D 値が高いものほど、IL-2 R $_{\alpha\beta\gamma}$ 選択性が高くなる傾向が確認できた。

【0794】

以上の結果から、糖鎖結合 IL-2 改変体は、CD 2 5 に対する親和性を維持している一方、IL-2 R $_{\beta\gamma}$ に対する親和性が低下することで、IL-2 R $_{\alpha\beta\gamma}$ 選択性が向上したと考えられた。

30

【0795】

【実施例 1 8】糖鎖・PEG 構造の影響

IL-2 にアミノ酸改変を行うことや、糖鎖または PEG を結合させることが IL-2 R $_{\alpha\beta\gamma}$ 選択性に与える影響を評価するため、実施例 1 で作製した L 1 9 C、L 1 9 C-a c e t a m i d e、L 1 9 N、および実施例 5 で作製した各種 o-A z-z-L y s 導入 8 H i s-IL-2 を実施例 1 2 に記載の方法と同様の手法で標準化 E C 5 0 r a t i o 値を測定した。得られた結果を表 2 4 に示す。

【0796】

40

50

【表 2 4】

標準化EC50ratio値	改変体
< 5	8His-S4(oAzZK), 8His-S5(oAzZK), 8His-S6(oAzZK), 8His-T7(oAzZK), 8His-K8(oAzZK), 8His-E60(oAzZK), 8His-F78(oAzZK), 8His-H79(oAzZK), 8His-R81(oAzZK), 8His-L94(oAzZK), 8His-S99(oAzZK), 8His-E100(oAzZK), 8His-T101(oAzZK), 8His-I129(oAzZK)
5 ~ 3 0	L19C, L19C-acetamide, L19N, 8His-Q126(oAzZK)
> 3 0	—

10

20

【0797】

表 2 4 に示すように、L 1 9 C、L 1 9 C-acetamide、L 1 9 N の標準化 E C₅₀ ratio 値が 5 ~ 3 0 であった。表 1 8 に示すように、L 1 9 C-2、L 1 9 C-9、L 1 9 C-11 および L 1 9 C-11* の標準化 E C₅₀ ratio 値は 3 0 以上であったことから、L 1 9 C-2、L 1 9 C-9、L 1 9 C-11 および L 1 9 C-11* は糖鎖結合により I L-2 R_{αβγ} に対する選択性が向上していることが明らかになった。

30

【0798】

また、表 2 4 に示すように、8 H i s-Q 1 2 6 (o A z Z K) 以外の o-Az-Z-Lys 導入 8 H i s-I L-2 改変体の標準化 E C₅₀ ratio 値が 5 以下であった。表 2 1 および表 2 2 に示すように、8 H i s-S 4 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-S 4 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-S 5 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-S 5 (o A z Z K)-L i 3 0、S 6 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-S 6 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-T 7 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-K 8 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-K 8 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-E 6 0 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-F 7 8 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-F 7 8 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-F 7 8 (o A z Z K)-L i 4 0、8 H i s-F 7 8 (o A z Z K)-V 4 0、8 H i s-F 7 8 (o A z Z K)-W 4 0、8 H i s-F 7 8 (o A z Z K)-Y 5 0、8 H i s-H 7 9 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-H 7 9 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-S 9 9 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-E 1 0 0 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-T 1 0 1 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-T 1 0 1 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-I 1 2 9 (o A z Z K)-P E G 4、8 H i s-I 1 2 9 (o A z Z K)-L i 2 0、8 H i s-I 1 2 9 (o A z Z K)-L i 3 0、8 H i s-I 1 2 9 (o A z Z K)-L i 4 0、8 H i s-I 1 2 9 (o A z Z K)-V 4 0、8 H i s-I 1 2 9 (o A z Z K)-W 4 0 および 8 H i s-

40

50

I 1 2 9 (o A z Z K) - Y 5 0 の標準化 E C 5 0 r a t i o 値は 5 以上であったことから、これら P E G 結合 I L - 2 改変体は P E G が結合されることにより I L - 2 R α β γ に対する選択性が向上していることが明らかになった。

【 0 7 9 9 】

本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2017年12月27日付けで出願された日本特許出願（特願2017-252224）に基づいており、その全体が引用により援用される。

【配列表フリーテキスト】

【 0 8 0 0 】

配列番号 1：野生型成熟ヒト I L - 2 のアミノ酸配列

配列番号 2：8 H i s - I L - 2 のアミノ酸配列

配列番号 3：8 H i s - I L - 2 の塩基配列

配列番号 4：8 H i s - S 4 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 5：8 H i s - S 5 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 6：8 H i s - S 6 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 7：8 H i s - T 7 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 8：8 H i s - K 8 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 9：8 H i s - E 6 0 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 10：8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 11：8 H i s - H 7 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 12：8 H i s - R 8 1 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 13：8 H i s - L 9 4 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 14：8 H i s - S 9 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 15：8 H i s - E 1 0 0 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 16：8 H i s - T 1 0 1 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 17：8 H i s - Q 1 2 6 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 18：8 H i s - I 1 2 9 (o A z Z K) , 8 H i s - I 1 2 9 (m A z Z K) の塩基配列

配列番号 19：ヒト I L - 2 R α β γ - A z a m i g r e e n 融合体のアミノ酸配列

配列番号 20：ヒト I L - 2 R α β γ - A z a m i g r e e n 融合体の塩基配列

配列番号 21：ヒト I L - 2 R β γ - A z a m i g r e e n 融合体のアミノ酸配列

配列番号 22：ヒト I L - 2 R β γ - A z a m i g r e e n 融合体の塩基配列

配列番号 23：ヒト C D 2 5 E C D - F c - A v i t a g のアミノ酸配列

配列番号 24：ヒト C D 2 5 E C D - F c - A v i t a g の塩基配列

配列番号 25：ヒト C D 1 2 2 E C D - F c - A v i t a g - 8 H i s _ ヒト C D 1 3 2 E C D - F c - F L A G のアミノ酸配列

配列番号 26：ヒト C D 1 2 2 E C D - F c - A v i t a g - 8 H i s _ ヒト C D 1 3 2 E C D - F c - F L A G の塩基配列

配列番号 27：8 H i s - S 4 (o A z Z K) / F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 28：8 H i s - S 5 (o A z Z K) / F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 29：8 H i s - K 8 (o A z Z K) / F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 30：8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) / H 7 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 31：8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) / S 9 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 32：8 H i s - F 7 8 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 33：8 H i s - S 4 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 34：8 H i s - S 5 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 35：8 H i s - K 8 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 36：8 H i s - H 7 9 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列

配列番号 37：8 H i s - S 9 9 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列

10

20

30

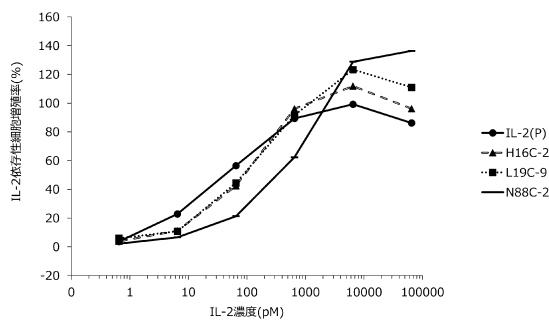
40

50

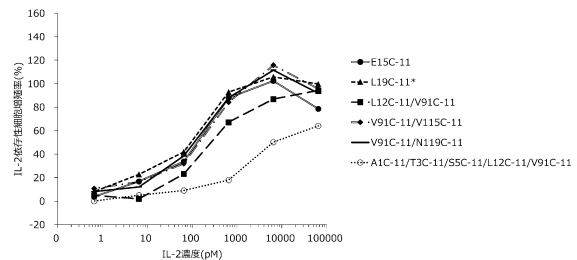
配列番号 38 : N末端メチオニン付加 I L - 2 C 1 2 5 S のアミノ酸配列
 配列番号 39 : N末端メチオニン付加 I L - 2 C 1 2 5 S の塩基配列
 配列番号 40 : d e s A l a _ I L - 2 C 1 2 5 S のアミノ酸配列
 配列番号 41 : d e s A l a _ I L - 2 C 1 2 5 S の塩基配列
 配列番号 42 : F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 43 : I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 44 : d e s A l a _ I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 45 : S 4 (o A z Z K) / F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 46 : S 5 (o A z Z K) / F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 47 : K 8 (o A z Z K) / F 7 8 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 48 : S 4 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 49 : S 5 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 50 : K 8 (o A z Z K) / I 1 2 9 (o A z Z K) の塩基配列
 配列番号 51 : I 1 2 9 C のアミノ酸配列
 配列番号 52 : I 1 2 9 C の塩基配列

【図面】

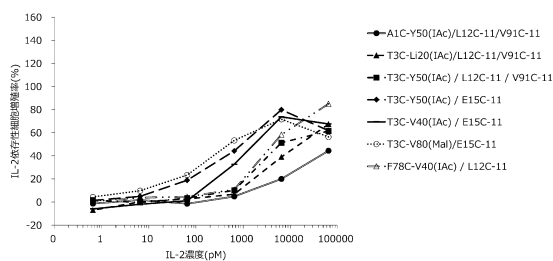
【図 1 A】



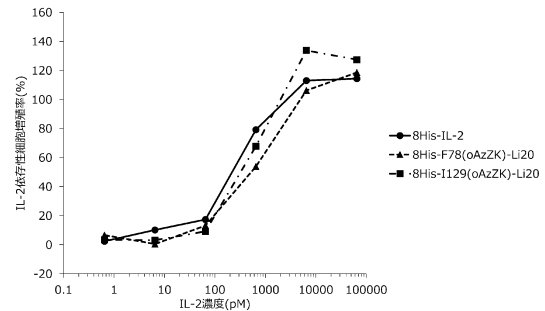
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



10

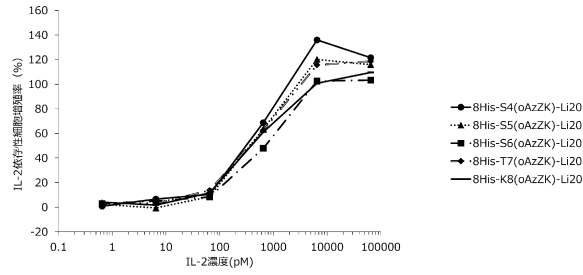
20

30

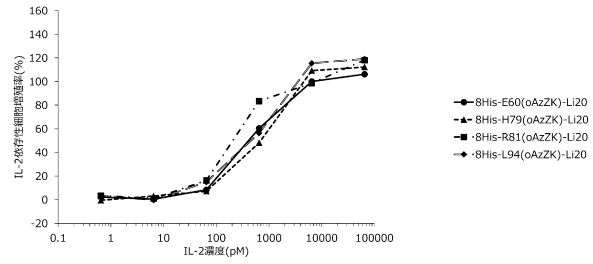
40

50

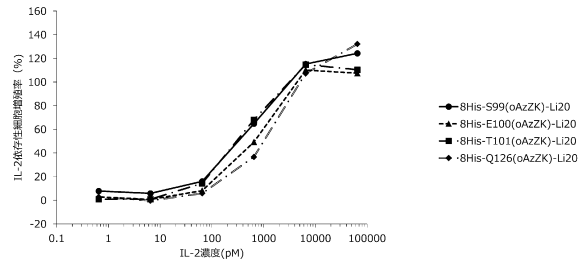
【図 1 E】



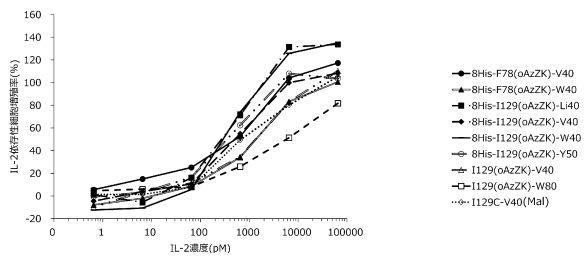
【図 1 F】



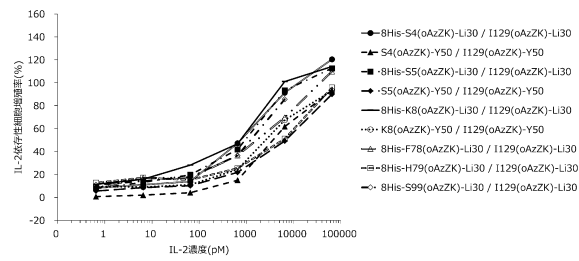
【図 1 G】



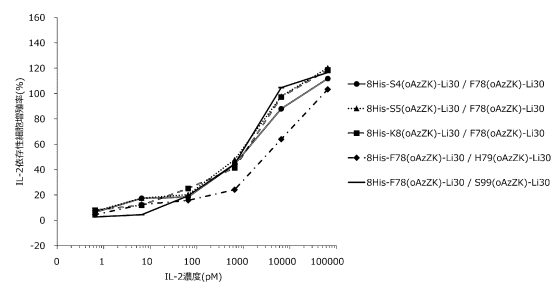
【図 1 H】



【図 1 I】



【図 1 J】



10

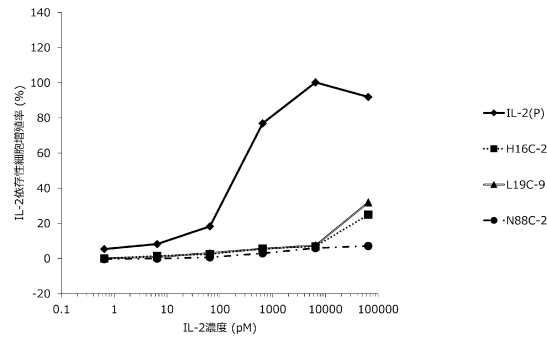
20

30

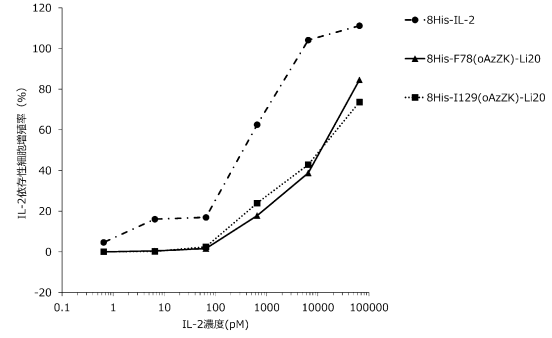
40

50

【図 2 A】

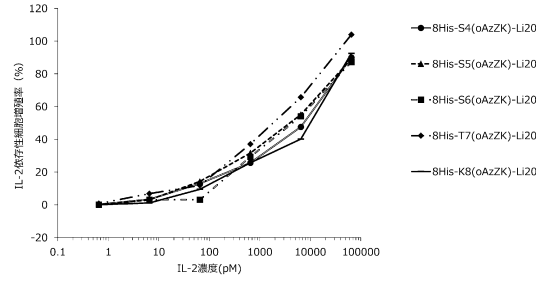


【図 2 B】

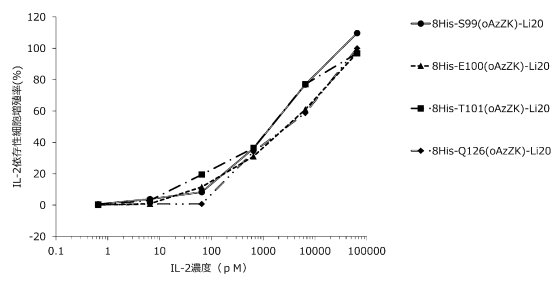


10

【図 2 C】

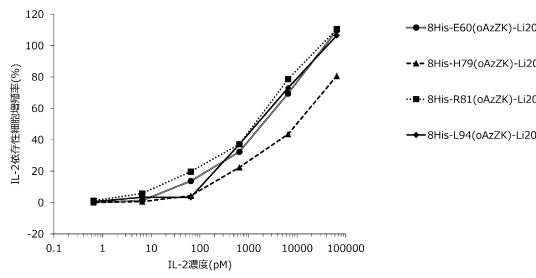


【図 2 D】

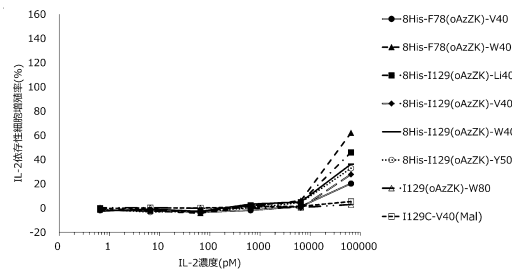


20

【図 2 E】



【図 2 F】

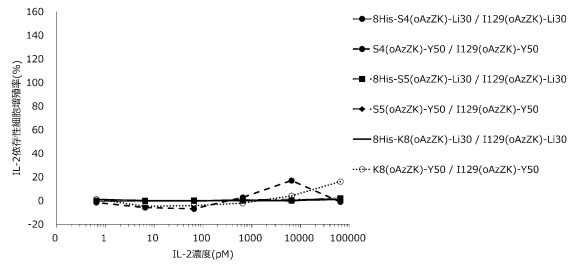


30

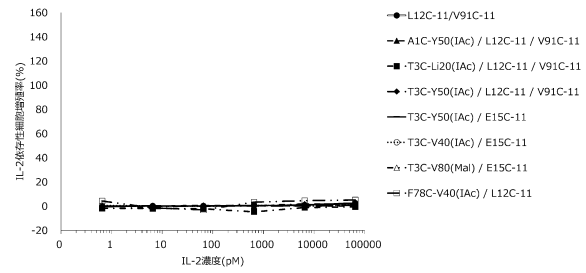
40

50

【図 2 G】

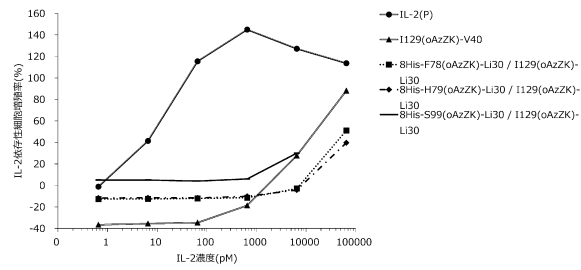


【図 2 H】

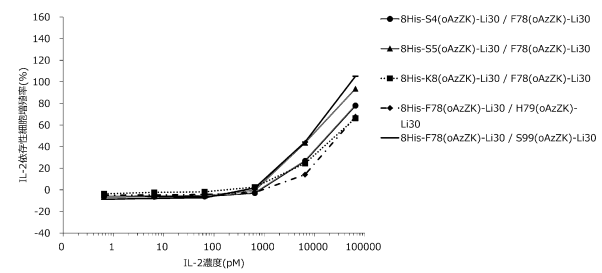


10

【図 2 I】



【図 2 J】



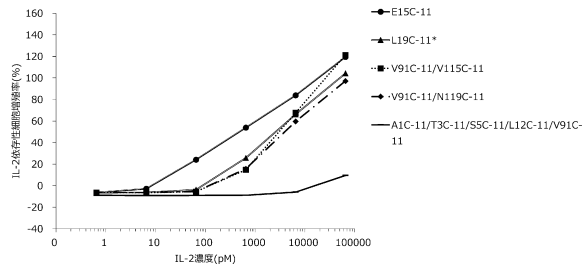
20

30

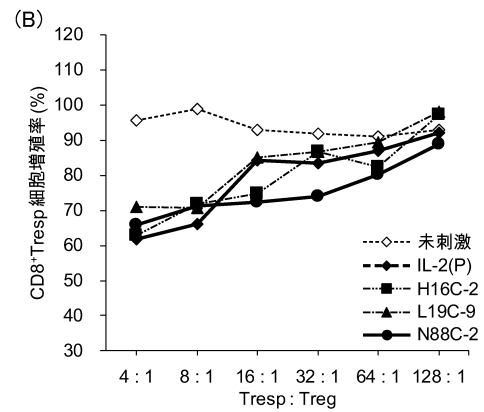
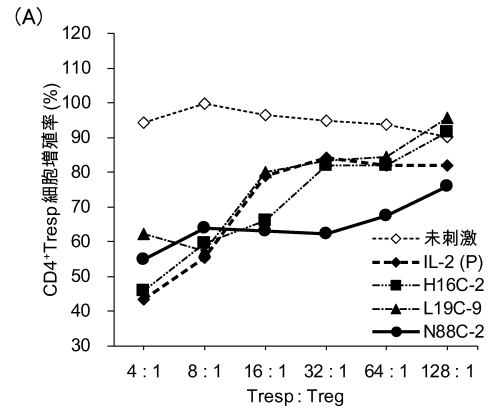
40

50

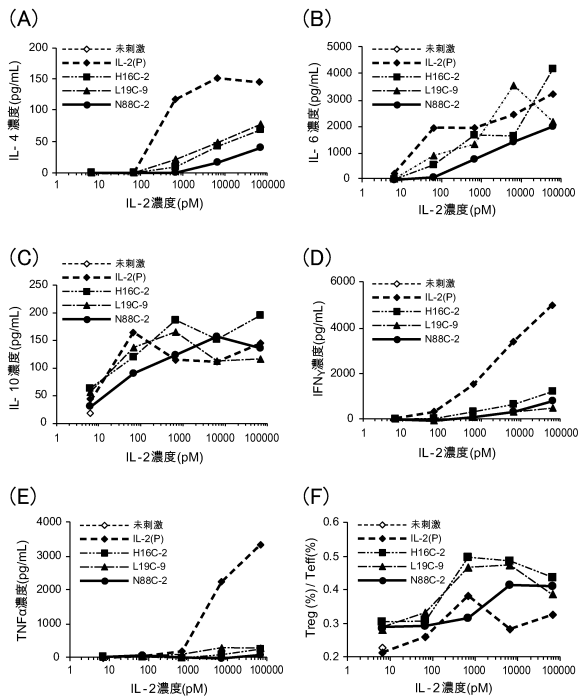
【図 2 K】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007275049000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内

審査官 中村 俊之

(56)参考文献 国際公開第2005/007121 (WO, A1)

特表2014-506116 (JP, A)

特表2012-515778 (JP, A)

特表平04-503604 (JP, A)

米国特許第04902502 (US, A)

特表昭62-503171 (JP, A)

特表2011-519882 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 38/00- 51/12

A61P 37/04

C07K 1/00- 19/00

C12N 5/0783

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)