

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7422480号

(P7422480)

(45)発行日 令和6年1月26日(2024.1.26)

(24)登録日 令和6年1月18日(2024.1.18)

(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 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/10

1 0 1

A 6 1 P 11/06 (2006.01)

A 6 1 P 11/06

請求項の数 35 (全104頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-553119(P2017-553119)

(86)(22)出願日 平成28年5月4日(2016.5.4)

(65)公表番号 特表2018-512151(P2018-512151
A)

(43)公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/030843

(87)国際公開番号 WO2016/164937

(87)国際公開日 平成28年10月13日(2016.10.13)

審査請求日 平成31年4月26日(2019.4.26)

審判番号 不服2021-7530(P2021-7530/J1)

審判請求日 令和3年6月9日(2021.6.9)

(73)特許権者 500049716

アムジエン・インコーポレーテッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1

3 2 0 , サウザンド オークス , ワン ア

ムジエン センター ドライブ

(74)代理人 110001173

弁理士法人川口国際特許事務所

(72)発明者 パッツ , エリック・アラン

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 2

5、シアトル、ノースイースト・ワンハ

ンドレッドフィフス・ブレイス・ 1 2 2

2

(72)発明者 トムソン , クリスティ・アン

カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア

・ブイ・ 3 ・エイチ・ 2 ・ジェイ・ 8、

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 制御性T細胞の増殖のためのインターロイキン - 2 変異タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むヒトインターロイキン - 2 (I L - 2) 変異タンパク質であって、 H 1 6 K、H 1 6 R、H 1 6 T、N 8 8 S、及び V 9 1 S から選択される少なくとも 1 つの変異を有し、野生型ヒト I L - 2 タンパク質と比較して、インビトロアッセイ及びヒト化マウス (C D 3 4 + 造血幹細胞で再構成された N S G マウス) の両方において、その他の T 細胞または N K 細胞と比較して制御性 T 細胞を優先的に刺激する、ヒト I L - 2 変異タンパク質。

【請求項 2】

前記変異タンパク質のアミノ酸配列が、 C 1 2 5 A ならびに H 1 6 K、H 1 6 R、H 1 6 T、N 8 8 S、及び V 9 1 S から選択される 1 つの位置においてのみ、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列とは異なる、請求項 1 に記載のヒト I L - 2 変異タンパク質。

【請求項 3】

F c 及び請求項 1 又は 2 に記載のヒト I L - 2 変異タンパク質を含む、F c 融合タンパク質。

【請求項 4】

前記 F c が、ヒト I g G 1 F c である、請求項 3 に記載の F c 融合タンパク質。

【請求項 5】

前記ヒト I g G 1 F c が、前記 F c のエフェクター機能を変化させる 1 つ以上の変異を含み、前記ヒト I g G 1 が、N 2 9 7 に置換を含む、請求項 4 に記載の F c 融合タンパク

10

20

質。

【請求項 6】

前記ヒト I g G F c の C 末端リジンの置換または欠失を含む、請求項 4 又は 5 に記載の F c 融合タンパク質。

【請求項 7】

リンカーが、前記タンパク質の前記 F c とヒト I L - 2 変異タンパク質部分とを接続し、前記リンカーが、G G G G S (配列番号 5)、G G N G T (配列番号 6)、又は、Y G N G T (配列番号 7) である、請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の F c 融合タンパク質。

【請求項 8】

前記 I L - 2 変異タンパク質が、哺乳動物細胞中で発現される場合、前記 F c 融合タンパク質のグリコシル化を変化させるアミノ酸の付加、置換、または欠失をさらに含む、請求項 3 ~ 7 のいずれかに記載の F c 融合タンパク質。

10

【請求項 9】

前記 I L - 2 変異タンパク質が、T 3 置換又は S 5 変異を含む、請求項 8 に記載の F c 融合タンパク質。

【請求項 10】

前記 F c 融合タンパク質が、F c 二量体を含む、請求項 3 ~ 9 のいずれかに記載の F c 融合タンパク質。

【請求項 11】

前記 F c 融合タンパク質が、2 つの I L - 2 変異タンパク質又は単一の I L - 2 変異タンパク質を含む、請求項 10 に記載の F c 融合タンパク質。

20

【請求項 12】

請求項 1 又は 2 に記載のヒト I L - 2 変異タンパク質をコードする、単離核酸。

【請求項 13】

抗体の F c 部分及び請求項 1 又は 2 に記載のヒト I L - 2 変異タンパク質をコードする、単離核酸。

【請求項 14】

前記 F c が、ヒト I g G 1 F c である、請求項 13 に記載の単離核酸。

【請求項 15】

前記ヒト I g G 1 F c が、前記 F c のエフェクター機能を変化させる 1 つ以上の変異を含み、前記ヒト I g G 1 が、N 2 9 7 に置換を含む、請求項 14 に記載の単離核酸。

30

【請求項 16】

前記ヒト I g G F c の C 末端リジンの置換または欠失をコードする、請求項 14 又は 15 に記載の単離核酸。

【請求項 17】

抗体の前記 F c 部分と前記ヒト I L - 2 変異タンパク質とを接続するリンカーをさらにコードし、前記リンカーが、G G G G S (配列番号 5)、G G N G T (配列番号 6)、又は Y G N G T (配列番号 7) である、請求項 13 ~ 16 のいずれかに記載の単離核酸。

【請求項 18】

前記 I L - 2 変異タンパク質が、哺乳動物細胞中で発現される場合、前記 I L - 2 変異タンパク質を含むタンパク質のグリコシル化を変化させるアミノ酸の付加、置換、または欠失をさらに含む、請求項 13 ~ 17 のいずれかに記載の単離核酸。

40

【請求項 19】

前記 I L - 2 変異タンパク質が、T 3 置換又は S 5 変異を含む、請求項 18 に記載の単離核酸。

【請求項 20】

プロモーターに作動可能に連結される請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載の単離核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 21】

請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載の単離核酸を含む、宿主細胞。

50

【請求項 22】

前記単離核酸が、プロモーターに作動可能に連結される、請求項 21 に記載の宿主細胞。

【請求項 23】

ヒト IL-2 変異タンパク質の作製方法であって、前記プロモーターが発現される条件下で請求項 22 に記載の宿主細胞を培養することと、前記培養物から前記ヒト IL-2 変異タンパク質を採取することを含む、方法。

【請求項 24】

Fc 融合タンパク質の作製方法であって、前記プロモーターが発現される条件下で請求項 22 に記載の宿主細胞を培養することと、前記培養物から前記 Fc 融合タンパク質を採取することを含む、方法。

10

【請求項 25】

T 細胞集団内における非制御性 T 細胞に対する制御性 T 細胞 (Treg) の比率の増加方法であって、T 細胞集団を有効量の請求項 1 又は 2 に記載のヒト IL-2 変異タンパク質又は請求項 3 ~ 11 のいずれかに記載の Fc 融合タンパク質と接触させることを含む、方法。

【請求項 26】

CD3 + FoxP3 - 細胞に対する CD3 + FoxP3 + 細胞の比率が増加する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

対象の末梢血中における非制御性 T 細胞に対する制御性 T 細胞 (Treg) の比率を増加させるための医薬組成物であって、有効量の請求項 1 又は 2 に記載のヒト IL-2 変異タンパク質又は請求項 3 ~ 11 のいずれかに記載の Fc 融合タンパク質を含む、医薬組成物。

20

【請求項 28】

CD3 + FoxP3 - 細胞に対する CD3 + FoxP3 + 細胞の比率が増加する、請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

対象の前記末梢血中におけるナチュラルキラー (NK) 細胞に対する制御性 T 細胞 (Treg) の比率を増加させるための医薬組成物であって、有効量の請求項 1 又は 2 に記載のヒト IL-2 変異タンパク質又は請求項 3 ~ 11 のいずれかに記載の Fc 融合タンパク質を含む、医薬組成物。

30

【請求項 30】

CD56 及び / または CD16 を発現する CD3 - CD19 - リンパ球に対する CD3 + FoxP3 + 細胞の比率が増加する、請求項 29 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

炎症性疾患または自己免疫疾患を有する対象を治療するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 又は 2 に記載の IL-2 変異タンパク質又は請求項 3 ~ 9 のいずれかに記載の Fc 融合タンパク質を含む、医薬組成物。

【請求項 32】

前記炎症性疾患または自己免疫疾患が、ループス、移植片対宿主病、C 型肝炎誘発性血管炎、I 型糖尿病、II 型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、円形脱毛症、アテローム性動脈硬化症、乾癬、器官移植片拒絶、シェーグレン症候群、ベーチェット病、自然流産、アトピー性疾患、喘息、または炎症性腸疾患である、請求項 31 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 33】

Fc 融合タンパク質であって、前記 Fc 融合タンパク質のアミノ酸配列が、図 24 に示される IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(H16K, C125A)、IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(H16R, C125A)、IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(H16T, C125A)、IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(N88S, C125A)、及び IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91S, C125A) のアミノ酸配列のうちの 1 つを有するヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列である、前記 Fc 融合タンパク質。

50

【請求項 3 4】

対象における炎症状態または自己免疫状態の処置するための医薬組成物であって、有効量の請求項 3 3 に記載の F c 融合タンパク質を含む、医薬組成物。

【請求項 3 5】

前記炎症状態または自己免疫状態が、ループス、移植片対宿主病、C 型肝炎誘発性血管炎、I 型糖尿病、II 型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、円形脱毛症、アテローム性動脈硬化症、乾癬、器官移植片拒絶、シェーグレン症候群、ベーチェット病、自然流産、アトピー性疾患、喘息、または炎症性腸疾患である、請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015 年 4 月 10 日出願の米国特許仮出願第 62 / 146 , 136 号の利益を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

IL - 2 は、3 つの膜貫通受容体サブユニット：すなわち、IL - 2 が結合すると、細胞内シグナル伝達事象を共に活性化する IL - 2 R 及び IL - 2 R 、ならびに IL - 2 と IL - 2 R との間の相互作用を安定化させるように機能する CD 25 (IL - 2 R) と結合する。IL - 2 R により送達されるシグナルとしては、PI 3 - キナーゼ、Ras - MAP - キナーゼ、及び STAT 5 経路のシグナルが挙げられる。

20

【0003】

T 細胞は、典型的には組織中に存在する低濃度の IL - 2 に応答するために CD 25 の発現を必要とする。CD 25 を発現する T 細胞は、自己免疫性炎症の抑制に不可欠な FOXP 3 + 制御性 T 細胞 (Treg 細胞)、及び CD 25 を発現するように活性化された FOXP 3 - T 細胞の両方を含む。FOXP 3 - CD 25 + T エフェクター細胞 (Teff) は、CD 4 + 細胞または CD 8 + 細胞のいずれかであってよく、これらは両方とも炎症、自己免疫、器官移植片拒絶、または移植片対宿主病の一因となる場合がある。IL - 2 刺激性 STAT 5 シグナル伝達は、正常な T - reg 細胞の成長及び生存ならびに高い FOXP 3 発現のために非常に重要である。

30

【0004】

共同所有の WO 2010 / 085495 では、発明者らは、Treg 細胞を選択的に増殖させる、または刺激するための IL - 2 変異タンパク質の使用について記載している。対象に投与される場合、Treg 細胞に対する効果は、炎症性疾患及び自己免疫疾患を処置するのに有用である。その明細書に記載される IL - 2 変異タンパク質は、インビボで Teff 細胞よりも多く Treg 細胞を増殖させるのに有用であるが、ヒト治療薬に最適な属性を有した IL - 2 変異タンパク質を作製することが望ましかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

40

【文献】国際公開第 2010 / 085495 号

【発明の概要】

【0006】

高収率の製造性に適していて、かつ薬理活性を有する IL - 2 変異タンパク質、抗 IL - 2 抗体、及び抗 IL - 2 抗体 / IL - 2 複合体が、本明細書に記載される。ヒト治療薬として使用するためのこのような分子を作製する取り組みにおいて、多数の予想外かつ予測不能な観察が行われた。本明細書に記載される組成物及び方法は、その取り組みの結果であった。

【0007】

本明細書に記載される IL - 2 変異タンパク質は、IL - 2 変異タンパク質及び / また

50

は内因性 I L - 2 に対する免疫応答が引き起こされる可能性が比較的低く、T r e g の選択的増殖及び活性化を提供する。さらに、特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質は、対象に投与される場合に血清半減期を増加させる分子、例えば、抗体 F c に融合される。I L - 2 変異タンパク質は、短い血清半減期（皮下注射では 3 ~ 5 時間）を有する。本明細書に記載される例示的な I L - 2 変異タンパク質 F c 融合体は、ヒトにおいて少なくとも 1 日、少なくとも 3 日、少なくとも 5 日、少なくとも 10 日、少なくとも 15 日、少なくとも 20 日、または少なくとも 25 日の半減期を有する。I L - 2 変異タンパク質の薬物動態に対するこの効果は、I L - 2 変異タンパク質治療薬の投薬減少または低頻度の投薬を可能にする。

【0008】

さらに、医薬大分子を作製する場合、分子の凝集を最小限に抑え、かつ分子の安定性を最大化しながら、大量の大分子を作製する能力について考慮しなければならない。I L - 2 変異タンパク質 F c 融合分子は、このような属性を実証する。

【0009】

さらに、特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、I g G 1 F c 領域を含有する。I g G 1 のエフェクター機能（例えば、A D C C 活性）を無効にすることが望ましい場合、297 位のアスパラギンのグリシンへの変異（N297G；E U 番号付けスキーム）が、非グリコシル化 I g G 1 F c をもたらすその他の変異と比べて大幅に改善された精製効率及び生物物理学的特性を提供したことが見出された。好ましい実施形態では、システインを F c に導入してジスルフィド結合させて、これにより非グリコシル化 F c 含有分子の安定性が増加した。非グリコシル化 F c の有用性は、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合体の枠を超える。したがって、N297G 置換及び場合により 1 つ以上のさらなる残基のシステインへの置換を含む、F c 含有分子、F c 融合体及び抗体が本明細書で提供される。

【0010】

一態様では、本発明は、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むヒトインターロイキン - 2（I L - 2）変異タンパク質を提供し、この I L - 2 変異タンパク質は、L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、及び E95G から選択される少なくとも 1 つの変異を有し、インビトロアッセイ及びヒト化マウス（C D 3 4 + 造血幹細胞で再構成された N S G マウス）の両方において、その他の T 細胞または N K 細胞と比較して制御性 T 細胞を優先的に刺激する。一実施形態では、変異タンパク質は、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である。別の実施形態では、変異タンパク質は、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 97 % 同一である。別の実施形態では、変異タンパク質のアミノ酸配列は、C125A ならびに L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、及び E95G から選択

10

20

30

40

50

される1つの位置においてのみ、配列番号1に記載されるアミノ酸配列とは異なる。別の実施形態では、変異タンパク質のアミノ酸配列は、C125AならびにD20E、D20G、D20W、D84A、D84S、H16D、H16G、H16K、H16R、H16T、H16V、I92K、I92R、L12K、L19D、L19N、L19T、N88D、N88R、N88S、V91D、V91G、V91K、及びV91Sから選択される1つの位置においてのみ、配列番号1に記載されるアミノ酸配列とは異なる。

【0011】

別の態様では、本発明は、Fc及び上記のようなヒトIL-2変異タンパク質を含むFc融合タンパク質を提供する。一実施形態では、Fcは、ヒトIgG1Fcである。別の実施形態では、ヒトIgG1Fcは、Fcのエフェクター機能を変化させる1つ以上の変異を含む。別の実施形態では、ヒトIgG1は、N297に置換を含む。別の実施形態では、N297の置換は、N297Gである。別の実施形態では、Fc融合タンパク質は、ヒトIgG FcのC末端リジンの置換または欠失を含む。別の実施形態では、ヒトIgG FcのC末端リジンが欠失される。別の実施形態では、リンカーが、タンパク質のFcとヒトIL-2変異タンパク質部分とを接続する。別の実施形態では、リンカーは、GGGGS（配列番号5）、GGNGT、または（配列番号6）、及びYGNGT（配列番号7）である。別の実施形態では、リンカーは、GGGGS（配列番号5）である。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、哺乳動物細胞中で発現される場合、Fc融合タンパク質のグリコシル化を変化させるアミノ酸の付加、置換、または欠失をさらに含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、T3置換を含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、T3NまたはT3A置換を含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、T3N置換を含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、S5変異をさらに含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、S5T変異をさらに含む。別の実施形態では、Fc融合タンパク質は、Fc二量体を含む。別の実施形態では、Fc融合タンパク質は、2つのIL-2変異タンパク質を含む。別の実施形態では、Fc融合タンパク質は、単一のIL-2変異タンパク質を含む。

【0012】

別の態様では、本発明は、上記のようなヒトIL-2変異タンパク質をコードする単離核酸を提供する。

【0013】

別の態様では、本発明は、抗体のFc部分及び上記のようなヒトIL-2変異タンパク質をコードする単離核酸を提供する。一実施形態では、抗体のFc部分及びヒトIL-2変異タンパク質は、単一のオープンリーディングフレーム内でコードされる。別の実施形態では、Fcは、ヒトIgG1Fcである。別の実施形態では、ヒトIgG1Fcは、Fcのエフェクター機能を変化させる1つ以上の変異を含む。別の実施形態では、ヒトIgG1は、N297に置換を含む。別の実施形態では、N297の置換は、N297Gである。別の実施形態では、核酸は、ヒトIgG FcのC末端リジンの置換または欠失をコードする。別の実施形態では、ヒトIgG FcのC末端リジンが欠失される。別の実施形態では、核酸は、抗体のFc部分とヒトIL-2変異タンパク質とを接続するリンカーをさらにコードする。別の実施形態では、リンカーは、GGGGS（配列番号5）、GGNGT、または（配列番号6）、及びYGNGT（配列番号7）である。別の実施形態では、リンカーは、GGGGS（配列番号5）である。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、哺乳動物細胞中で発現される場合、IL-2変異タンパク質を含むタンパク質のグリコシル化を変化させるアミノ酸の付加、置換、または欠失をさらに含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、T3置換を含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、T3NまたはT3A置換を含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、T3N置換を含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、S5変異をさらに含む。別の実施形態では、IL-2変異タンパク質は、S5T変異をさらに含む。

【0014】

別の態様では、本発明は、プロモーターに作動可能に連結される上記の単離核酸を含む発現ベクターを提供する。

【0015】

別の態様では、本発明は、上記の単離核酸を含む宿主細胞を提供する。一実施形態では、単離核酸は、プロモーターに作動可能に連結される。別の実施形態では、宿主細胞は原核細胞である。別の実施形態では、宿主細胞はE. coliである。別の実施形態では、宿主細胞は真核細胞である。別の実施形態では、宿主細胞は哺乳動物細胞である。別の実施形態では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系である。

【0016】

別の態様では、本発明は、プロモーターが発現される条件下で上記のような宿主細胞を培養すること、及び培養物からヒトIL-2変異タンパク質を採取することを含む、ヒトIL-2変異タンパク質を作製する方法を提供する。

10

【0017】

別の態様では、本発明は、プロモーターが発現される条件下で上記のような宿主細胞を培養すること、及び培養物からFc融合タンパク質を採取することを含む、Fc融合タンパク質を作製する方法を提供する。

【0018】

別の態様では、本発明は、T細胞集団を有効量の上記のようなヒトIL-2変異タンパク質と接触させることを含む、T細胞集団内における非制御性T細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率を増加させる方法を提供する。一実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が増加する。別の実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が、少なくとも50%増加する。

20

【0019】

別の態様では、本発明は、T細胞集団を有効量の上記のようなFc融合タンパク質と接触させることを含む、T細胞集団内における非制御性T細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率を増加させる方法を提供する。一実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が増加する。別の実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が、少なくとも50%増加する。

【0020】

30

別の態様では、本発明は、有効量の上記のようなヒトIL-2変異タンパク質を投与することを含む、対象の末梢血中における非制御性T細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率を増加させる方法を提供する。一実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が増加する。別の実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が、少なくとも50%増加する。

【0021】

別の態様では、本発明は、有効量の上記のようなFc融合タンパク質を投与することを含む、対象の末梢血中における非制御性T細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率を増加させる方法を提供する。一実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が増加する。別の実施形態では、CD3+FoxP3-細胞に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が、少なくとも50%増加する。

40

【0022】

別の態様では、本発明は、有効量の上記のようなヒトIL-2変異タンパク質を投与することを含む、対象の末梢血中におけるナチュラルキラー（NK）細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率を増加させる方法を提供する。一実施形態では、CD56及び/またはCD16を発現するCD3-CD19-リンパ球に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が増加する。別の実施形態では、CD56及び/またはCD16を発現するCD3-CD19-リンパ球に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が、少なくとも50%増加する。

【0023】

50

別の態様では、本発明は、有効量の上記のようなFc融合タンパク質を投与することを含む、対象の末梢血中におけるナチュラルキラー（NK）細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率を増加させる方法を提供する。一実施形態では、CD56及び/またはCD16を発現するCD3-CD19-リンパ球に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が増加する。別の実施形態では、CD56及び/またはCD16を発現するCD3-CD19-リンパ球に対するCD3+FoxP3+細胞の比率が、少なくとも50%増加する。

【0024】

別の態様では、本発明は、炎症性疾患または自己免疫疾患を有する対象を処置する方法を提供し、本方法は、対象に治療有効量の上記のようなIL-2変異タンパク質または治療有効量の上記のようなFc融合タンパク質を投与することを含む。一実施形態では、投与により、疾患における少なくとも1つの症状の減少が引き起こされる。別の実施形態では、対象の末梢血中における非制御性T細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率は、投与後に増加する。別の実施形態では、対象の末梢血中における非制御性T細胞に対する制御性T細胞（Treg）の比率は、投与後も本質的に同じままである。別の実施形態では、炎症性疾患または自己免疫疾患は、ループス、移植片対宿主病、C型肝炎誘発性血管炎、I型糖尿病、II型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、円形脱毛症、アテローム性動脈硬化症、乾癬、器官移植片拒絶、シェーグレン症候群、ベーチェット病、自然流産、アトピー性疾患、喘息、または炎症性腸疾患である。

【0025】

別の態様では、本発明は、ヒトIgG1抗体のFc領域を含むポリペプチドを提供し、Fc領域はN297G変異を含み、ヒトIgG1のFc領域は、配列番号3に記載されるアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を含む。一実施形態では、ヒトIgG1のFc領域は、配列番号3に記載されるアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を含む。別の実施形態では、ヒトIgG1のFc領域は、配列番号3に記載されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトIgG1のFc領域は、ポリペプチドを安定化させるための1つ以上の変異をさらに含む。別の実施形態では、配列番号3に記載される1つ以上のアミノ酸が、システインで置換される。別の実施形態では、配列番号3に記載されるアミノ酸配列のV259、A287、R292、V302、L306、V323、またはI332が、システインで置換される。別の実施形態では、Fc領域は、配列番号3に記載されるアミノ酸配列内にA287C及びL306C置換を含む。別の実施形態では、Fc領域は、配列番号3に記載されるアミノ酸配列内にV259C及びL306C置換を含む。別の実施形態では、Fc領域は、配列番号3に記載されるアミノ酸配列内にR292C及びV302C置換を含む。別の実施形態では、Fc領域は、配列番号3に記載されるアミノ酸配列内にV323C及びI332C置換を含む。

【0026】

別の態様では、本発明は、上記のようなFc領域を含む抗体を提供する。

【0027】

別の態様では、本発明は、上記のようなFc領域を含むFc融合タンパク質を提供する。

【0028】

別の態様では、本発明は、リンカーを含むポリペプチドを提供し、リンカーは、GGNGT（配列番号6）またはYGGNGT（配列番号7）である。一実施形態では、リンカーはN-グリコシル化を含む。別の実施形態では、リンカーは、ポリペプチド構造内のループ中に挿入される、またはループに取って代わる。

【0029】

別の態様では、本発明は、非グリコシル化IgG1Fc含有分子を作製する方法を提供し、本方法は、

a) 哺乳動物細胞培養物中で上記のようなポリペプチドをコードする核酸を発現させること；及び

b) 培養物から非グリコシル化IgG1Fc含有分子を採取することを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

別の態様では、本発明は、哺乳動物細胞中で発現される場合に非グリコシル化される Ig G 1 F c 含有分子を作製する方法を提供し、本方法は、F c 領域中の N 2 9 7 のコドン をグリシンコドンに変異させるステップを含む。

【 0 0 3 1 】

別の態様では、本発明は F c 融合タンパク質を提供し、F c 融合タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 4 に示されるヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である。一実施形態では、F c 融合タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 4 に示されるヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である。別の実施形態では、F c 融合タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 4 に示されるヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも 9 7 % 同一である。別の実施形態では、F c 融合タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 4 に示されるヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % 同一である。別の実施形態では、F c 融合タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 4 に示されるヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列と同一である。

10

【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明は、上記のような F c 融合体をコードする核酸を提供する。

【 0 0 3 3 】

別の態様では、本発明は、上記のような核酸を含む細胞を提供する。

【 0 0 3 4 】

別の態様では、本発明は、上記のような細胞が F c 融合タンパク質を発現できる条件下でこの細胞をインキュベートすることを含む、F c 融合タンパク質を作製する方法を提供する。

20

【 0 0 3 5 】

別の態様では、本発明は、有効量の上記のような F c 融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における炎症状態または自己免疫状態を処置する方法を提供する。一実施形態では、炎症状態または自己免疫状態は、ループス、移植片対宿主病、C 型肝炎誘発性血管炎、I 型糖尿病、II 型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、円形脱毛症、アテローム性動脈硬化症、乾癬、器官移植片拒絶、シェーグレン症候群、ベーチェット病、自然流産、アトピー性疾患、喘息、または炎症性腸疾患である。

30

【 0 0 3 6 】

別の態様では、本発明は、上記のようなヒトインターロイキン - 2 (I L - 2) 変異タンパク質、上記のような F c 融合タンパク質、または上記のような F c 融合タンパク質を用いた処置に対する対象の応答をモニタリングする方法を提供し、本方法は対象の変化を検出することを含み、この変化は、体温の上昇、対象の末梢血中における C R P の上昇、対象の末梢血中における血小板の減少、対象の末梢血中における好中球の減少、または対象の末梢血中におけるアルブミンの減少であり、変化が検出された後、処置を終了する、一時中断する、投薬頻度を減少させる、または投薬量を減少させる。一実施形態では、変化は、少なくとも 0 . 5 の体温の上昇、少なくとも 0 . 2 m g / m L の対象の末梢血中における C R P の上昇、少なくとも 0 . 8 倍の対象の末梢血中における血小板の減少、少なくとも 0 . 8 倍の対象の末梢血中における好中球の減少、または少なくとも 0 . 4 倍の対象の末梢血中におけるアルブミンの減少を含む。

40

【 0 0 3 7 】

別の態様では、本発明は単離抗ヒト I L - 2 抗体を提供し、この抗体は、参照抗体の重鎖可変ドメインと少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメイン、及び参照抗体の軽鎖可変ドメインと少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含み、この参照抗体は、9 D 6、2 C 3、1 4 C 9、8 B 1 2、1 6 A 4、1 6 E 1、1 3 A 1、8 F 1 0、1 2 C 4、9 B 1 2、3 H 5、1 8 A 6、1 0 A 6、1 0 H 7、1 5 A 1 0、1 2 D 2、9 B 1 0、1 7 D 3、1 5 G 1 1、1 4 D 7、1 8 F 3、1 7 D 9、2 1 F 8、2 2 B 9、2 2 1 D 1 0、1 4 A 6、1 1 D 6、1 0 A 9、1 6 E 3、1 4 G 7、5 H 3、2 B 1 2、2 6 H 7、

50

50

C 4、9 B 1 2、3 H 5、1 8 A 6、1 0 A 6、1 0 H 7、1 5 A 1 0、1 2 D 2、9 B 1 0、1 7 D 3、1 5 G 1 1、1 4 D 7、1 8 F 3、1 7 D 9、2 1 F 8、2 2 B 9、2 2 1 D 1 0、1 4 A 6、1 1 D 6、1 0 A 9、1 6 E 3、1 4 G 7、5 H 3、2 B 1 2、2 6 H 7、2 6 C 1 2、2 H 1 1、または1 8 H 9であり、参照抗体の重鎖可変ドメインアミノ酸配列及び軽鎖可変ドメインアミノ酸配列は、それぞれ図 2 8 及び図 2 6 に示される通りである。別の実施形態では、単離抗体は、ヒト抗体；ヒト化抗体；キメラ抗体；モノクローナル抗体；ポリクローナル抗体；組換え抗体；抗原結合抗体断片；一本鎖抗体；ダイアボディ；トリアボディ；テトラボディ；F a b 断片；F (a b ') 2 断片；ドメイン抗体；I g D 抗体；I g E 抗体；I g M 抗体；I g G 1 抗体；I g G 2 抗体；I g G 3 抗体；I g G 4 抗体；またはH鎖内ジスルフィド結合を形成する傾向を軽減するヒンジ領域内の少なくとも1つの変異を有するI g G 4 抗体である。別の実施形態では、単離抗体は、ヒトI g G 1 F cを含む。別の実施形態では、ヒトI g G 1 F cは、F cのエフェクター機能を変化させる1つ以上の変異を有する。別の実施形態では、ヒトI g G 1 F cは、N 2 9 7 に置換を含む。別の実施形態では、N 2 9 7 の置換は、N 2 9 7 Gである。別の実施形態では、抗体は、ヒトI g G F cのC末端リジンの置換または欠失を含む。別の実施形態では、ヒトI g G F cのC末端リジンが欠失される。別の実施形態では、単離抗体は、ヒトI g G 1 F cを含む。別の実施形態では、ヒトI g G 1 F cは、F cのエフェクター機能を変化させる1つ以上の変異を有する。別の実施形態では、ヒトI g G 1 F cは、N 2 9 7 に置換を含む。別の実施形態では、N 2 9 7 の置換は、N 2 9 7 Gである。別の実施形態では、抗体は、ヒトI g G F cのC末端リジンの置換または欠失を含む。別の実施形態では、ヒトI g G F cのC末端リジンが欠失される。

【 0 0 3 8 】

別の態様では、本発明は、ヒトI L - 2 サイトカインに結合される上記のような単離抗ヒトI L - 2 抗体を含む単離複合体を提供する。

【 0 0 3 9 】

別の態様では、本発明は、上記のような単離抗ヒトI L - 2 抗体の軽鎖、重鎖、または軽鎖及び重鎖の両方をコードする単離核酸を提供する。

【 0 0 4 0 】

別の態様では、本発明は、プロモーターに作動可能に連結される上記のような単離核酸を含む発現ベクターを提供する。

【 0 0 4 1 】

別の態様では、本発明は、上記のような単離核酸を含む宿主細胞を提供する。一実施形態では、単離核酸は、プロモーターに作動可能に連結される。別の実施形態では、宿主細胞は原核細胞である。別の実施形態では、宿主細胞はE . c o l i である。別の実施形態では、宿主細胞は真核細胞である。別の実施形態では、宿主細胞は哺乳動物細胞である。別の実施形態では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞系である。

【 0 0 4 2 】

別の態様では、本発明は、プロモーターが発現される条件下で上記のような宿主細胞を培養すること、及び培養物からヒトI L - 2 変異タンパク質を採取することを含む、抗ヒトI L - 2 抗体を作製する方法を提供する。

【 0 0 4 3 】

別の態様では、本発明は、有効量の上記のような抗ヒトI L - 2 抗体または単離抗ヒトI L - 2 抗体を含む単離複合体を対象に投与することを含む、対象における炎症状態または自己免疫状態を処置する方法を提供する。一実施形態では、炎症状態または自己免疫状態は、ループス、移植片対宿主病、C型肝炎誘発性血管炎、I型糖尿病、II型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、円形脱毛症、アテローム性動脈硬化症、乾癬、器官移植片拒絶、シェーグレン症候群、ベーチェット病、自然流産、アトピー性疾患、喘息、または炎症性腸疾患である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

【図 1】短期刺激アッセイにおいて、I g G - F c の C 末端への融合によるホモ二量体化は、効力が低く、かつ C D 2 5 に対する親和性が高い I L - 2 変異タンパク質の活性を変化させない。

【図 2 A】示される変異を有し、F c - ヘテロ二量体の片側の C 末端に融合される I L - 2 変異タンパク質を、T 細胞において S T A T 5 リン酸化を刺激するそれらの能力について試験した。これらの変異タンパク質はまた、C D 2 5 に対して高い親和性を付与する 3 つの変異 (V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P) を含有していた。それらの活性を、F c 融合を含まない I L - 2 の 3 つの形態 (白抜きの記号) : すなわち、W T I L - 2、H a W T (C D 2 5 に対して高い親和性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P)、ならびに H a D (C D 2 5 に対して高い親和性及び低いシグナル伝達活性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P、N 8 8 D) と比較した。ホスホ - S T A T 5 応答を、ゲーティングした F O X P 3 + C D 4 + 及び F O X P 3 - C D 4 + T 細胞について示す。

10

【図 2 B】示される変異を有し、F c - ヘテロ二量体の片側の C 末端に融合される I L - 2 変異タンパク質を、T 細胞において S T A T 5 リン酸化を刺激するそれらの能力について試験した。これらの変異タンパク質もまた、C D 2 5 に対して高い親和性を付与する 3 つの変異 (V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P) を含有していた。それらの活性を、F c 融合を含まない I L - 2 の 3 つの形態 (白抜きの記号) : すなわち、W T I L - 2、H a W T (C D 2 5 に対して高い親和性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P)、ならびに H a D (C D 2 5 に対して高い親和性及び低いシグナル伝達活性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P、N 8 8 D) と比較した。ホスホ - S T A T 5 応答を、ゲーティングした F O X P 3 + C D 4 + 及び F O X P 3 - C D 4 + T 細胞について示す。

20

【図 3】F c - ヘテロ二量体に融合された I L - 2 変異タンパク質の滴定に応じた T 細胞サブセットの増殖。融合タンパク質の活性を、F c 融合を含まない I L - 2 の 3 つの形態 (白抜きの記号) : すなわち、W T I L - 2、H a W T (C D 2 5 に対して高い親和性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P)、ならびに H a D (C D 2 5 に対して高い親和性及び低いシグナル伝達活性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P、N 8 8 D) と比較した。

30

【図 4】F c - ヘテロ二量体に融合された I L - 2 変異タンパク質の滴定に応じた N K 細胞の増殖。融合タンパク質の活性を、F c 融合を含まない I L - 2 の 3 つの形態 (白抜きの記号) : すなわち、W T I L - 2、H a W T (C D 2 5 に対して高い親和性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P)、ならびに H a D (C D 2 5 に対して高い親和性及び低いシグナル伝達活性) (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P、N 8 8 D) と比較した。

【図 5】F c - ホモ二量体 N 2 9 7 G に融合された I L - 2 変異タンパク質の滴定に応じた T 細胞サブセットの増殖。F c 変異タンパク質の活性を、W T I L - 2 (白抜きの丸) 及び F c . W T (黒塗りの丸) と比較した。C D 2 5 に対して高い親和性を付与する変異 (H a M u t 1) は、V 6 9 A 及び Q 7 4 P であった。

40

【図 6】F c - ホモ二量体 N 2 9 7 G に融合された I L - 2 変異タンパク質の滴定に応じた N K 細胞の増殖。F c 変異タンパク質の活性を、W T I L - 2 (白抜きの丸) 及び F c . W T (黒塗りの丸) と比較した。

【図 7 A】C D 2 5 に対して高い親和性を付与する変異を含まない F c . I L - 2 変異タンパク質は、ヒト化マウスにおいて T r e g 増殖及び F O X P 3 上方制御を促進する。

【図 7 B】C D 2 5 に対して高い親和性を付与する変異を含まない F c . I L - 2 変異タンパク質は、ヒト化マウスにおいて T r e g 増殖及び F O X P 3 上方制御を促進する。

【図 8】低週用量 (動物 1 匹当たり 0 . 5 μ g) の F c . I L - 2 変異タンパク質は、ヒト化マウスにおいて T r e g 増殖及び F O X P 3 上方制御を促進し、F c . N 8 8 D 及び

50

Fc . WTと比較してFc . V91Kでより良好な活性が観察された。

【図9A】Fc . V91K及びFc . N88Dは、CD25との会合により活性化T細胞の表面上に残留する。

【図9B】Fc . WTと比較した、Fc . V91K及びFc . N88Dを用いたIL - 2 Rシグナル伝達の持続性。

【図10A】カニクイザルにおけるFc . V91Kの2週間及び4週間の投薬間隔の比較、ならびにIV及びSC投薬経路の比較。

【図10B】カニクイザルにおけるFc . V91Kの2週間及び4週間の投薬間隔の比較、ならびにIV及びSC投薬経路の比較。

【図11A】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、及びFc . N88Dの異なる投薬レジメンを用いて処置したシノルモガスザル（*cynolmogus monkey*）における細胞応答、体温、及び血清CRPの動態。

10

【図11B】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、及びFc . N88Dの異なる投薬レジメンを用いて処置したシノルモガスザル（*cynolmogus monkey*）における細胞応答、体温、及び血清CRPの動態。

【図11C】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、及びFc . N88Dの異なる投薬レジメンを用いて処置したシノルモガスザル（*cynolmogus monkey*）における細胞応答、体温、及び血清CRPの動態。

【図11D】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、及びFc . N88Dの異なる投薬レジメンを用いて処置したシノルモガスザル（*cynolmogus monkey*）における細胞応答、体温、及び血清CRPの動態。

20

【図11E】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、及びFc . N88Dの異なる投薬レジメンを用いて処置したシノルモガスザル（*cynolmogus monkey*）における細胞応答、体温、及び血清CRPの動態。

【図11F】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、及びFc . N88Dの異なる投薬レジメンを用いて処置したシノルモガスザル（*cynolmogus monkey*）における細胞応答、体温、及び血清CRPの動態。

【図12A】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、またはFc . N88Dの投与量増加が、カニクイザルにおけるTreg細胞、NK細胞、CD4⁺FOX P3⁺ T細胞、及びCD8⁺FOX P3⁺ T細胞のレベルに及ぼす影響。各データポイントは、4匹の動物の平均ピーク応答を表す。

30

【図12B】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、またはFc . N88Dの投与量増加が、カニクイザルにおけるTreg細胞及び好酸球のレベルに及ぼす影響。各データポイントは、4匹の動物の平均ピーク応答を表す。

【図12C】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、またはFc . N88Dの投与量増加が、カニクイザルにおけるTreg細胞及びCRPのレベルならびに体温に及ぼす影響。各データポイントは、4匹の動物の平均ピーク応答を表す。

【図12D】PROLEUKIN（登録商標）、Fc . V91K、またはFc . N88Dの投与量増加が、カニクイザルにおけるTreg細胞、血小板、好中球、及びアルブミンのレベルに及ぼす影響。各データポイントは、4匹の動物の平均ピーク応答を表す。右のy軸は、投薬前試料と比較して血小板、好中球、またはアルブミンにおける倍率変化の減少を示すために反転させている。

40

【図13】Fc . V91Kで処置したカニクイザルにおける抗薬物抗体（ADA）の発生動態。

【図14】Discovery Studioは、様々なIL - 2変異タンパク質についてIL - 2 : IL - 2 R 相互作用の G 結合 (kcal/mol) を予測した。 G 結合の正值は、野生型IL - 2と比較して変異タンパク質の結合が弱いことを示す。N88及びD20変異体の G 結合値は、予測値に満たない可能性がある。ボックス中に示した変異タンパク質を選択した。

【図15】Schrodingerは、様々なIL - 2変異体についてIL - 2 : IL -

50

2 R 相互作用の G 結合 ($kcal/mol$) を予測した。 G 結合の正値は、WT と比較して変異体の結合が弱いことを示す。ボックス中に示した変異タンパク質を選択した。

【図16A】初代ヒトPBMCを $100 ng/ml$ のOKT3で2日間、予備活性化した。次いで、細胞を、OKT3抗体を除去するために3回洗浄した後に3日間静止させた。Fc・IL-2変異タンパク質融合タンパク質の生物活性を、37 で10分間、IL-2変異タンパク質の滴定 ($1 nM$ 、 $100 pM$ 、 $33 pM$ 、 $11 pM$) を用いてこれらの静止予備活性化PBMCを刺激することにより試験し、続いて標準的PHOSFLOW (商標) (BD、フランクリンレイクス、ニュージャージー州) アッセイを行ってホスホ-STAT5レベルを検出した。Fc・IL-2変異タンパク質の生物活性を、ゲーティングしたCD4+T細胞におけるホスホ-STAT5平均蛍光強度(MFI)として提示する。変異タンパク質をトランスフェクト293-6E細胞の上清としてアッセイし、Fc・IL-2融合タンパク質の濃度を、プロテインA結合(OCTET Q SYSTEM (登録商標)、Pall forte BIO Co.、メンローパーク、カリフォルニア州) により決定した。「pTT5」試料は、空のDNA発現ベクターでトランスフェクトした細胞からの上清画分を表す。A) ホスホ-STAT5は、1ドナーからのT細胞中で滴定Fc・IL-2変異タンパク質融合タンパク質に応答する。

10

【図16B】初代ヒトPBMCを $100 ng/ml$ のOKT3で2日間、予備活性化した。次いで、細胞を、OKT3抗体を除去するために3回洗浄した後に3日間静止させた。Fc・IL-2変異タンパク質融合タンパク質の生物活性を、37 で10分間、IL-2変異タンパク質の滴定 ($1 nM$ 、 $100 pM$ 、 $33 pM$ 、 $11 pM$) を用いてこれらの静止予備活性化PBMCを刺激することにより試験し、続いて標準的PHOSFLOW (商標) (BD、フランクリンレイクス、ニュージャージー州) アッセイを行ってホスホ-STAT5レベルを検出した。Fc・IL-2変異タンパク質の生物活性を、ゲーティングしたCD4+T細胞におけるホスホ-STAT5平均蛍光強度(MFI)として提示する。変異タンパク質をトランスフェクト293-6E細胞の上清としてアッセイし、Fc・IL-2融合タンパク質の濃度を、プロテインA結合(OCTET Q SYSTEM (登録商標)、Pall forte BIO Co.、メンローパーク、カリフォルニア州) により決定した。「pTT5」試料は、空のDNA発現ベクターでトランスフェクトした細胞からの上清画分を表す。B) 順位付けしたpSTAT5は、2ドナーについて $33 pM$ のFc・IL-2変異タンパク質に応答する。

20

30

【図17】初代ヒトPBMCを $100 ng/ml$ のOKT3で2日間、予備活性化した。次いで、細胞を、OKT3抗体を除去するために3回洗浄した後に3日間静止させた。IL-2変異タンパク質の生物活性を、37 で10分間、IL-2変異タンパク質の滴定を用いてこれらの静止予備活性化PBMCを刺激することにより試験し、続いて標準的PHOSFLOW (商標) (BD、フランクリンレイクス、ニュージャージー州) アッセイを行ってホスホ-STAT5レベルを検出した。IL-2変異タンパク質の生物活性を、ゲーティングしたCD25highCD4+T細胞におけるホスホ-STAT5平均蛍光強度(MFI)として提示する。Fc・IL-2(D20W、C125A)は、pSTAT5を活性化せず、この分子及びFc・IL-2(WT、C125A)を各プロットにおいて陽性対照及び陰性対照として示す。2つの異なるPBMCドナーについて、一致した結果を得た。

40

【図18A】全PBMCを、 $100 ng$ のOKT3を用いて300万/mlで活性化した。2日目に、細胞を3回洗浄し、新鮮な培地中で5日間静止させた。次いで、細胞をCFSEで標識し、24ウェルプレート中において50万/ウェルで、FACS分析前に7日間IL-2含有培地中でさらに培養した。T細胞サブセットの増殖を、FOX P3⁻CD4⁺細胞(A)、FOX P3⁻CD8⁺細胞(B)、及びHELIOS⁺FOX P3⁺CD4⁺(C)のCFSE希釈物(中央CFSE蛍光)として提示する。HELIOS⁺FOX P3⁺CD4⁺細胞中でFOX P3を上方制御する変異タンパク質の能力も示す(D)。

【図18B】全PBMCを、 $100 ng$ のOKT3を用いて300万/mlで活性化した

50

。2日目に、細胞を3回洗浄し、新鮮な培地中で5日間静止させた。次いで、細胞をCFSEで標識し、24ウェルプレート中において50万/ウェルで、FACS分析前に7日間IL-2含有培地中でさらに培養した。T細胞サブセットの増殖を、FOXP3⁻CD4⁺細胞(A)、FOXP3⁻CD8⁺細胞(B)、及びHELIOS⁺FOXP3⁺CD4⁺(C)のCFSE希釈物(中央CFSE蛍光)として提示する。HELIOS⁺FOXP3⁺CD4⁺細胞中でFOXP3を上方制御する変異タンパク質の能力も示す(D)。

【図18C】全PBMCを、100ngのOKT3を用いて300万/mlで活性化した。2日目に、細胞を3回洗浄し、新鮮な培地中で5日間静止させた。次いで、細胞をCFSEで標識し、24ウェルプレート中において50万/ウェルで、FACS分析前に7日間IL-2含有培地中でさらに培養した。T細胞サブセットの増殖を、FOXP3⁻CD4⁺細胞(A)、FOXP3⁻CD8⁺細胞(B)、及びHELIOS⁺FOXP3⁺CD4⁺(C)のCFSE希釈物(中央CFSE蛍光)として提示する。HELIOS⁺FOXP3⁺CD4⁺細胞中でFOXP3を上方制御する変異タンパク質の能力も示す(D)。

【図18D】全PBMCを、100ngのOKT3を用いて300万/mlで活性化した。2日目に、細胞を3回洗浄し、新鮮な培地中で5日間静止させた。次いで、細胞をCFSEで標識し、24ウェルプレート中において50万/ウェルで、FACS分析前に7日間IL-2含有培地中でさらに培養した。T細胞サブセットの増殖を、FOXP3⁻CD4⁺細胞(A)、FOXP3⁻CD8⁺細胞(B)、及びHELIOS⁺FOXP3⁺CD4⁺(C)のCFSE希釈物(中央CFSE蛍光)として提示する。HELIOS⁺FOXP3⁺CD4⁺細胞中でFOXP3を上方制御する変異タンパク質の能力も示す(D)。

【図19】MACS選別CD16⁺NK細胞を、示したFc・IL-2変異タンパク質の滴定を用いて3日間、10万/ウェルで96ウェルプレート中において培養した。0.5μCiの3H-チミジンを、インキュベーションの最後の18時間中に各ウェルに添加した。

【図20A】初代ヒトPBMCを、2日間100ng/mlのOKT3で予備刺激した。細胞を採取し、4回洗浄して、培地中で一晚静止させた。次いで、細胞を400pMのFc・IL-2で30分間、37℃でパルスした。パルス後、細胞を1回洗浄後にT0で採取、または12mlの温培地中でさらに3回洗浄し、示した時間での培養のいずれかを行った。細胞会合Fc・IL-2を検出するために、細胞を抗ヒトIgG-FITC(Jackson ImmunoResearch、ウェストグロブ、ペンシルベニア州)及び抗CD25-APCで染色した(A)。細胞表面保持について変異タンパク質を順位付けするために、huIgG MFI値の4時間、6時間、及び24時間時点での合計を、2つのPBMCドナーについて平均化した(B)。

【図20B】初代ヒトPBMCを、2日間100ng/mlのOKT3で予備刺激した。細胞を採取し、4回洗浄して、培地中で一晚静止させた。次いで、細胞を400pMのFc・IL-2で30分間、37℃でパルスした。パルス後、細胞を1回洗浄後にT0で採取、または12mlの温培地中でさらに3回洗浄し、示した時間での培養のいずれかを行った。細胞会合Fc・IL-2を検出するために、細胞を抗ヒトIgG-FITC(Jackson ImmunoResearch、ウェストグロブ、ペンシルベニア州)及び抗CD25-APCで染色した(A)。細胞表面保持について変異タンパク質を順位付けするために、huIgG MFI値の4時間、6時間、及び24時間時点での合計を、2つのPBMCドナーについて平均化した(B)。

【図21】100pMのFc・IL-2でパルスした細胞を除く、図20におけるような、パルス洗浄後のpSTAT5シグナル保持。

【図22】細胞表面保持及びIL-2Rシグナル伝達保持の相関関係。増減した表面保持値及びpSTAT5シグナル保持値を、6時間及び24時間時点のhu-IgG MFI(表面)またはpSTAT5 MFI(シグナル伝達)値を加えて、値を0から1に増減して、増減した値を2ドナーについて平均化することにより算出した。

【図23A】図23A及び図23Bは、0日目における1μgのFc・IL-2変異タンパク質皮下用量後、4日目のヒト化マウス(CD34⁺造血幹細胞で再構成したNSGマ

10

20

30

40

50

ウス)の血液中におけるCD4T細胞のTregのパーセント。(B)Treg濃縮とpSTAT5シグナル保持との相関関係。増減したpSTAT5シグナル保持値を、6時間及び24時間時点のpSTAT5 MFIを加えて、値を0から1に減じ、減じた値を2ドナーについて平均化することにより算出した。

【図23B】図23A及び図23Bは、0日目における1µgのFc・IL-2変異タンパク質皮下用量後、4日目のヒト化マウス(CD34⁺造血幹細胞で再構成したNSGマウス)の血液中におけるCD4T細胞のTregのパーセント。(B)Treg濃縮とpSTAT5シグナル保持との相関関係。増減したpSTAT5シグナル保持値を、6時間及び24時間時点のpSTAT5 MFIを加えて、値を0から1に減じ、減じた値を2ドナーについて平均化することにより算出した。

10

【図24A】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

【図24B】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

20

【図24C】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

【図24D】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

30

【図24E】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

【図24F】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

40

【図24G】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

【図24H】実施例13及び実施例14により作製かつ試験したヒトIL-2変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文=リーダー配列；イタリック体=Fcドメイン(N297G及び欠失K変異を含む)；下線文=リンカー配列；普通文=IL-2(C125A及び示した変異を含む)。共に、Fcドメイン、リンカー配列、及びIL-2は、タンパク質の成熟型を含む。

50

【図 2 4 J】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文 = リーダー配列；イタリック体 = F c ドメイン（N 2 9 7 G 及び欠失 K 変異を含む）；下線文 = リンカー配列；普通文 = I L - 2（C 1 2 5 A 及び示した変異を含む）。共に、F c ドメイン、リンカー配列、及び I L - 2 は、タンパク質の成熟型を含む。

【図 2 4 L】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文 = リーダー配列；イタリック体 = F c ドメイン（N 2 9 7 G 及び欠失 K 変異を含む）；下線文 = リンカー配列；普通文 = I L - 2（C 1 2 5 A 及び示した変異を含む）。共に、F c ドメイン、リンカー配列、及び I L - 2 は、タンパク質の成熟型を含む。

【図 2 4 N】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文 = リーダー配列；イタリック体 = F c ドメイン（N 2 9 7 G 及び欠失 K 変異を含む）；下線文 = リンカー配列；普通文 = I L - 2（C 1 2 5 A 及び示した変異を含む）。共に、F c ドメイン、リンカー配列、及び I L - 2 は、タンパク質の成熟型を含む。

【図 240】実施例 13 及び実施例 14 により作製かつ試験したヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文 = リーダー配列；イタリック体 = Fc ドメイン（N297G 及び欠失 K 変異を含む）；下線文 = リンカー配列；普通文 = IL-2（C125A 及び示した変異を含む）。共に、Fc ドメイン、リンカー配列、及び IL-2 は、タンパク質の成熟型を含む。

【図 2 4 P】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質のアミノ酸配列。太字文 = リーダー配列；イタリック体 = F c ドメイン（N 2 9 7 G 及び欠失 K 変異を含む）；下線文 = リンカー配列；普通文 = I L - 2（C 1 2 5 A 及び示した変異を含む）。共に、F c ドメイン、リンカー配列、及び I L - 2 は、タンパク質の成熟型を含む。

【図 25A】実施例 13 及び実施例 14 により作製かつ試験したヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 25B】実施例 13 及び実施例 14 により作製かつ試験したヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 25C】実施例 13 及び実施例 14 により作製かつ試験したヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 25D】実施例 13 及び実施例 14 により作製かつ試験したヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 25E】実施例 13 及び実施例 14 により作製かつ試験したヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 25 D D】実施例 13 及び実施例 14 により作製かつ試験したヒト IL-2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列

【図 2 5 E E】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 2 5 F F】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 2 5 G G】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 2 5 H H】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 2 5 I I】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

10

【図 2 5 J J】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 2 5 K K】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 2 5 L L】実施例 1 3 及び実施例 1 4 により作製かつ試験したヒト I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質の核酸配列。

【図 2 6】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列。C D R 1、2、及び 3 (K a b a t により定義) を太字と下線で示し ; フレームワーク領域 1、2、3、及び 4 を普通文で示す。

【図 2 7 A】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

20

【図 2 7 B】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 7 C】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 7 D】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 7 E】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 7 F】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 7 G】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 7 H】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 7 I】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の軽鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 8 - 1】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列。C D R 1、2、及び 3 (K a b a t により定義) を太字と下線で示し ; フレームワーク領域 1、2、3、及び 4 を普通文で示す。

30

【図 2 8 - 2】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列。C D R 1、2、及び 3 (K a b a t により定義) を太字と下線で示し ; フレームワーク領域 1、2、3、及び 4 を普通文で示す。

【図 2 9 A】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 9 B】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 9 C】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 9 D】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 9 E】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 9 F】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

40

【図 2 9 G】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 9 H】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 2 9 I】実施例 1 5 により単離かつ試験した抗体の重鎖可変ドメインの核酸配列。

【図 3 0】実施例 1 5 に記載されているように、1 . 5 μ g の野生型ヒト I L - 2) と複合化した 8 μ g の抗 I L - 2 抗体の単回注射で処置した N S G S C I D / H u マウスにおける、N K 細胞増殖に対する T r e g 細胞増殖の活性化の比率。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 5】

本明細書で使用される節の見出しは、系統立てる目的のためだけのものであり、記載される主題を限定すると解釈されるべきではない。本明細書の本文中に引用される全ての参

50

考文献は、それらの全体が参照によって明示的に組み込まれる。

【0046】

標準的な技術が、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、組織培養及び形質転換、タンパク質精製などに使用されてよい。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様に従って、または当該技術分野において一般的に行われるように、または本明細書に記載されるように実施されてよい。以下の手順及び技術は、当該技術分野において周知の従来方法に従って、また本明細書全体を通して引用かつ議論される様々な一般的かつより具体的な参考文献に記載されるように、一般に実施されてよい。例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. を参照し、これは、あらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれる。具体的な定義が提供されない限り、本明細書に記載される分析化学、有機化学、ならびに医化学及び薬化学に関連して使用される命名法、ならびにそれらの実験室手順及び技術は、当該技術分野において周知であり、かつ一般に使用されているものである。標準的な技術は、化学合成、化学分析、医薬調製、製剤化、及び送達ならびに患者の処置に使用されてよい。

10

【0047】

IL - 2

本明細書に記載されるIL - 2変異タンパク質は、野生型ヒトIL - 2のバリエーションである。本明細書で用いられる場合、「野生型ヒトIL - 2」、「野生型IL - 2」、または「WT IL - 2」は、以下のアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味することとする：

20

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

Xは、C、S、V、またはAである（配列番号2）。

【0048】

バリエーションは、野生型IL - 2アミノ酸配列中に1つ以上の置換、欠失、または挿入を含有してよい。残基は、本明細書において1文字アミノ酸コードに続いてIL - 2アミノ酸位置によって指定され、例えば、K35は、配列番号2の35位にあるリジン残基である。置換は、本明細書において1文字アミノ酸コードに続いてIL - 2アミノ酸位置、それに続いて置換する1文字アミノ酸コードによって指定され、例えば、K35Aは、配列番号2の35位にあるリジン残基とアラニン残基との置換である。

30

【0049】

IL - 2変異タンパク質及び抗IL - 2抗体

制御性T (Treg) 細胞を優先的に刺激するヒトIL - 2変異タンパク質及び抗IL - 2抗体が、本明細書で提供される。本明細書で用いられる場合、「制御性T細胞を優先的に刺激する」とは、変異タンパク質または抗体が、CD3 + FoxP3 - T細胞よりもCD3 + FoxP3 + T細胞の増殖、生存、活性化及び/または機能を促進することを意味する。Tregを優先的に刺激する能力を測定する方法は、末梢血白血球のフローサイトメトリーによって測定され得、全CD4 + T細胞中のFoxP3 + CD4 + T細胞の割合の増加、全CD8 + T細胞中のFoxP3 + CD8 + T細胞の割合の増加、NK細胞と比較してFoxP3 + T細胞の割合の増加、及び/またはその他のT細胞上におけるCD25発現の増加と比較してFoxP3 + T細胞の表面上におけるCD25発現レベルのより大きな増加が観察される。Treg細胞の選択的増殖はまた、重亜硫酸塩で処理したゲノムDNAからのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物の配列決定により検出されるような、全血から抽出されたDNA中の脱メチル化CD3遺伝子と比較した脱メチル化FoxP3プロモーターDNA（すなわち、Treg特異的脱メチル化領域、またはTSDR）の発現増加として検出され得る (J. Sehouli, et al., 2011. Epig

40

50

en e t i c s 6 : 2 , 2 3 6 - 2 4 6) 。

【 0 0 5 0 】

T r e g 細胞を優先的に刺激する I L - 2 変異タンパク質または抗 I L - 2 抗体は、対象または末梢血試料中の C D 3 + F o x P 3 - T 細胞よりも C D 3 + F o x P 3 + T 細胞の比率を、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 1 0 0 %、少なくとも 1 5 0 %、少なくとも 2 0 0 %、少なくとも 3 0 0 %、少なくとも 4 0 0 %、少なくとも 5 0 0 %、少なくとも 6 0 0 %、少なくとも 7 0 0 %、少なくとも 8 0 0 %、少なくとも 9 0 0 %、または少なくとも 1 0 0 0 % 増加させる。

【 0 0 5 1 】

I L - 2 変異タンパク質の例としては、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列中に H 1 6 T、H 1 6 K、H 1 6 R、L 1 9 N、L 1 9 D、D 2 0 E、D 2 0 G、D 2 0 T、N 8 8 D、N 8 8 R、N 8 8 S、V 9 1 D、V 9 1 G、V 9 1 K、及び/または V 9 1 S 置換(複数可)を含む I L - 2 変異タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な I L - 2 変異タンパク質は、図 2 4 に記載される。本発明の I L - 2 変異タンパク質は、場合により C 1 2 5 A 置換を含む。野生型 I L - 2 配列に対するさらなる変異の数を減少させることが有利であってよいが、本発明は、H 1 6 T、H 1 6 K、H 1 6 R、L 1 9 N、L 1 9 D、D 2 0 E、D 2 0 G、D 2 0 T、N 8 8 D、N 8 8 R、N 8 8 S、V 9 1 D、V 9 1 G、V 9 1 K、及び/または V 9 1 S 置換に加えて、切断ならびに/またはさらなる挿入、欠失、及び/もしくは置換も含む I L - 2 変異タンパク質を含むが、ただし、変異タンパク質が T r e g を優先的に刺激する活性を維持することを条件とする。したがって、実施形態は、T r e g 細胞を優先的に刺激し、H 1 6 T、H 1 6 K、H 1 6 R、L 1 9 N、L 1 9 D、D 2 0 E、D 2 0 G、D 2 0 T、N 8 8 D、N 8 8 R、N 8 8 S、V 9 1 D、V 9 1 G、V 9 1 K、及び/または V 9 1 S 置換を有し、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一のアミノ酸配列を含む I L - 2 変異タンパク質を含む。特に好ましい実施形態では、このような I L - 2 変異タンパク質は、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 2 】

アミノ酸配列について、配列同一性及び/または配列類似性は、当該技術分野において既知の標準的技術、例えば、S m i t h a n d W a t e r m a n , 1 9 8 1 , A d v . A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 の局所配列同一性アルゴリズム、N e e d l e m a n a n d W u n s c h , 1 9 7 0 , J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 3 の配列同一性アラインメントアルゴリズム、P e a r s o n a n d L i p m a n , 1 9 8 8 , P r o c . N a t . A c a d . S c i . U . S . A . 8 5 : 2 4 4 4 の類似法の検索、これらのアルゴリズム(W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e 、G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p、サイエンス通り 5 7 5、マディソン、ウィスコンシン州の G A P、B E S T F I T、F A S T A、及び T F A S T A) のコンピュータによる実施、D e v e r e u x e t a l . , 1 9 8 4 , N u c l . A c i d R e s . 1 2 : 3 8 7 - 3 9 5 によって記載される B e s t F i t 配列プログラムを含むが、これらに限定されない技術を使用することにより、好ましくはデフォルト設定を使用して、または検査により決定される。好ましくは、パーセント同一性は、以下のパラメータに基づいて F a s t D B により算出される: ミスマッチペナルティ = 1 ; ギャップペナルティ = 1 ; ギャップサイズペナルティ = 0 . 3 3 ; 及び結合ペナルティ = 3 0、 「C u r r e n t M e t h o d s i n S e q u e n c e C o m p a r i s o n a n d A n a l y s i s」, M a c r o m o l e c u l e S e q u e n c i n g a n d S y

nthesis, Selected Methods and Applications, pp127-149(1988), Alan R. Liss, Inc.

【0053】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、プログレッシブペアワイズアラインメントを使用して関連配列の群から多重配列アラインメントを作成する。PILEUPは、アラインメントを作成するために使用されるクラスタリング関係を示すツリーをプロットすることもできる。PILEUPは、Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35: 351-360のプログレッシブアラインメント法の単純化を使用し; この方法は、Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5: 151-153によって記載される方法に類似している。有用なPILEUPパラメータは、デフォルトギャップ加重 = 3.00、デフォルトギャップ長加重 = 0.10、及び加重末端ギャップを含む。

10

【0054】

有用なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; 及びKarin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5787に記載されている、BLASTアルゴリズムである。特に有用なBLASTプログラムは、Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266: 460-480から得られたWU-BLAST-2プログラムである。WU-BLAST-2は、いくつかの検索パラメータを使用し、そのほとんどがデフォルト値に設定される。調整可能なパラメータは、以下の値で設定される: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = I。HSP S及びHSP S 2パラメータは、動的な値であり、検索されている対象の配列に対して、特定のデータベースにおける特定の配列及び組成物の組成に応じてプログラム自体によって確立されるが; 値は、感受性を高めるように調整されてよい。

20

【0055】

さらに有用なアルゴリズムは、Altschul et al., 1993, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402によって報告されているようなギャップ付きBLASTである。ギャップ付きBLASTは、BLOSUM-62置換スコア; 9に設定された閾値Tパラメータ; ギャップなしの伸長を開始するための2ヒット法、ギャップ長kに $10 + k$ のコストを負荷; 16に設定された X_u 、ならびにデータベース検索段階で40に、及びアルゴリズムの出力段階で67に設定された X_g を使用する。ギャップアラインメントは、約22ビットに対応するスコアによって開始される。

30

【0056】

アミノ酸配列変化を導入する部位または領域は、あらかじめ決定されていてよいが、変異それ自体は、あらかじめ決定しておく必要はない。例えば、所与の部位における変異の性能を最適化するために、標的コドンまたは領域でランダム変異誘発を実施し、発現したIL-2変異タンパク質を所望の活性の最適な組合せについてスクリーニングしてよい。既知の配列を有するDNAにおいて所定の部位に置換変異を作製するための技術が周知であり、例えば、M13プライマー変異誘発及びPCR変異誘発である。変異体のスクリーニングは、例えば、本明細書に記載されるアッセイを使用して行われてよい。

40

【0057】

アミノ酸置換は、典型的には単一残基の置換であり; 挿入は通常、約1~約20のアミノ酸残基程度であろうが、それよりも大幅に大きな挿入が許容されてよい。欠失は、約1~約20のアミノ酸残基の範囲であるが、いくつかの場合には、欠失がはるかに大きくともよい。

【0058】

置換、欠失、挿入またはそれらの任意の組合せは、最終的な誘導体またはバリエーションに到達するために使用されてよい。一般に、これらの変更は、分子の変化、特に抗原結合タ

50

ンパク質の免疫原性及び特異性を最小限に抑えるために数個のアミノ酸に対して行われる。しかしながら、特定の状況ではより大きな変更が許容されてよい。保存的置換は、表 1 として示される以下のチャートに従って一般に行われる。

【 0 0 5 9 】

【表 1】

表 1

元の残基	例示的な置換	
Ala	Ser	10
Arg	Lys	
Asn	Gln, His	
Asp	Glu	
Cys	Ser, Ala	
Gln	Asn	
Glu	Asp	
Gly	Pro	
His	Asn, Gln	
Ile	Leu, Val	20
Leu	Ile, Val	
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp	
Ser	Thr	
Thr	Ser	
Trp	Tyr, Phe	
Tyr	Trp, Phe	30
Val	Ile, Leu	

【 0 0 6 0 】

機能または免疫学的同一性における実質的な変更は、表 1 に示されるものよりも保存性が低い置換を選択することにより行われる。例えば、置換は、変化の領域中におけるポリペプチド骨格の構造、例えば、アルファヘリックス構造もしくはベータシート構造；標的部位における分子の電荷もしくは疎水性；または側鎖の嵩高さにさらに有意な影響を及ぼすように行われてよい。一般にポリペプチドの特性に最大の変化をもたらすと予想される置換は、（ a ）親水性残基、例えば、セリルもしくはトレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルもしくはアラニルと（もしくはそれにより）置換される；（ b ）システインもしくはプロリンが、任意のその他の残基と（もしくはそれにより）置換される；（ c ）電気陽性側鎖を有する残基、例えば、リジル、アルギニル、もしくはヒスチジルが、電気陰性残基、例えば、グルタミンもしくはアスパルチルと（もしくはそれにより）置換される；または（ d ）嵩高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有しない残基、例えば、グリシンと（もしくはそれにより）置換されるようなものである。

【 0 0 6 1 】

バリエーションは、典型的には天然に存在する類似体と同じ定性的生物活性を示し、同じ免疫応答を誘発するだろうが、バリエーションは、必要に応じて I L - 2 変異タンパク質の特徴を改変するようにも選択される。あるいは、バリエーションは、I L - 2 変異タンパク質の生

10

20

30

40

50

物活性を変化させるように設計されてよい。例えば、グリコシル化部位は、本明細書で述べられるように変化させてよい、または除去されてよい。

【0062】

別の実施形態では、本発明は、本明細書で9D6、2C3、14C9、8B12、16A4、16E1、13A1、8F10、12C4、9B12、3H5、18A6、10A6、10H7、15A10、12D2、9B10、17D3、15G11、14D7、18F3、17D9、21F8、22B9、21D10、14A6、11D6、10A9、16E3、14G7、5H3、2B12、26H7、26C12、2H11、及び18H9と称される抗体のうち1つの重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。

【0063】

別の実施形態では、本発明は、9D6、2C3、14C9、8B12、16A4、16E1、13A1、8F10、12C4、9B12、3H5、18A6、10A6、10H7、15A10、12D2、9B10、17D3、15G11、14D7、18F3、17D9、21F8、22B9、21D10、14A6、11D6、10A9、16E3、14G7、5H3、2B12、26H7、26C12、2H11、または18H9の軽鎖可変ドメインの配列とは、15、14、13、12、11、10、9つ、8つ、7つ、6つ、5つ、4つ、3つ、2つ、または1つの残基（複数可）においてのみ異なるアミノ酸の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗IL-2抗体を提供し、このような各配列の差異は、独立して1つのアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換のいずれかである。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、9D6、2C3、14C9、8B12、16A4、16E1、13A1、8F10、12C4、9B12、3H5、18A6、10A6、10H7、15A10、12D2、9B10、17D3、15G11、14D7、18F3、17D9、21F8、22B9、21D10、14A6、11D6、10A9、16E3、14G7、5H3、2B12、26H7、26C12、2H11、または18H9の軽鎖可変ドメインの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%同一のアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、図27のヌクレオチド配列の相補体に中程度のストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸の配列を含む。

【0064】

別の実施形態では、本発明は、9D6、2C3、14C9、8B12、16A4、16E1、13A1、8F10、12C4、9B12、3H5、18A6、10A6、10H7、15A10、12D2、9B10、17D3、15G11、14D7、18F3、17D9、21F8、22B9、21D10、14A6、11D6、10A9、16E3、14G7、5H3、2B12、26H7、26C12、2H11、または18H9の重鎖可変ドメインの配列とは、15、14、13、12、11、10、9つ、8つ、7つ、6つ、5つ、4つ、3つ、2つ、または1つの残基（複数可）においてのみ異なるアミノ酸の配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗IL-2抗体を提供し、このような各配列の差異は、独立して1つのアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換のいずれかである。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、9D6、2C3、14C9、8B12、16A4、16E1、13A1、8F10、12C4、9B12、3H5、18A6、10A6、10H7、15A10、12D2、9B10、17D3、15G11、14D7、18F3、17D9、21F8、22B9、21D10、14A6、11D6、10A9、16E3、14G7、5H3、2B12、26H7、26C12、2H11、または18H9の重鎖可変ドメインの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%同一のアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、図29のヌクレオチド配列の相補体に中程度のストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸の配列を含む。

【0065】

別の実施形態では、本発明は、抗体9D6、2C3、14C9、8B12、16A4、16E1、13A1、8F10、12C4、9B12、3H5、18A6、10A6、1

10

20

30

40

50

0 H 7、1 5 A 1 0、1 2 D 2、9 B 1 0、1 7 D 3、1 5 G 1 1、1 4 D 7、1 8 F 3、1 7 D 9、2 1 F 8、2 2 B 9、2 1 D 1 0、1 4 A 6、1 1 D 6、1 0 A 9、1 6 E 3、1 4 G 7、5 H 3、2 B 1 2、2 6 H 7、2 6 C 1 2、2 H 1 1、または1 8 H 9の3つ全ての軽鎖C D R配列及び3つ全ての重鎖C D R配列を含む抗I L - 2抗体を提供する。

【0066】

別の実施形態では、本発明は、実施例15に記載されるようなI L - 2への結合について交差阻害する抗I L - 2抗体を提供する。

【0067】

延長された血清半減期を有するI L - 2変異タンパク質及び抗I L - 2抗体

10

本明細書で提供されるI L - 2変異タンパク質は、例えば、T e f fまたはN K細胞よりもT r e gを選択的に増殖させるので、患者に投与される場合の安全性プロファイルが、野生型I L - 2またはP R O L E U K I N（登録商標）（アルデスロイキン；N o v a r t i s、パーゼル、スイス）のプロファイルとは異なるだろうと予想される。野生型I L - 2またはP R O L E U K I N（登録商標）に関連する副作用としては、インフルエンザ様症状、寒気／悪寒、関節痛、発熱、発疹、掻痒、注射部位反応、低血圧、下痢、悪心、不安、錯乱、及びうつ病が挙げられる。本明細書で提供されるI L - 2変異タンパク質は、変異タンパク質の血清半減期を延長する分子を含むように変化されてよく、またはそれに融合されてよく、このような半減期の延長が、患者の副作用または有害事象の可能性または強度を高めるだろうリスクを増加させることはない。このように血清半減期が延長された変異タンパク質の皮下投薬は、より低い最大全身曝露量（C_{max}）で標的範囲の長期化を可能にしてよい。血清半減期の延長は、より少ないまたはより頻度の低い変異タンパク質の投薬レジメンを可能にしてよい。

20

【0068】

本明細書で提供されるI L - 2変異タンパク質の血清半減期は、当該技術分野において既知の本質的に任意の方法によって延長されてよい。このような方法は、I L - 2変異タンパク質の配列を、新生児F c 受容体に結合するペプチドを含むように、または延長された血清半減期を有するタンパク質、例えば、I g Gもしくはヒト血清アルブミンに結合するように変化させることを含む。その他の実施形態では、I L - 2変異タンパク質は、融合分子に対して延長された半減期を付与するポリペプチドに融合される。このようなポリペプチドとしては、I g G F cもしくは新生児F c 受容体に結合するその他のポリペプチド、ヒト血清アルブミン、または延長された血清半減期を有するタンパク質に結合するポリペプチドが挙げられる。好ましい実施形態では、I L - 2変異タンパク質は、I g G F c分子に融合される。

30

【0069】

I L - 2変異タンパク質は、I g G F c領域のN末端またはC末端に融合されてよい。実施例に示されるように、I g G F c領域のC末端への融合は、I g G F cのN末端に融合される場合よりも大幅にI L - 2変異タンパク質活性を維持する。

【0070】

本発明の一実施形態は、I L - 2変異タンパク質を抗体のF c領域に融合することにより作製される2つのF c融合ポリペプチドを含む二量体を対象とする。二量体は、例えば、融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクター中に挿入し、組換え発現ベクターで質質転換した宿主細胞中で遺伝子融合体を発現させて、発現した融合タンパク質を抗体分子と非常に類似するように組み立てることにより作製され得、結果としてF c部分間で鎖間結合が形成されて二量体を生じる。

40

【0071】

「F cポリペプチド」または「F c領域」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体のF c領域に由来するポリペプチドの天然形態及び変異タンパク質形態を含み、本発明のI L - 2変異タンパク質融合タンパク質または抗I L - 2抗体のいずれかの一部であり得る。二量体化を促進するヒンジ領域を含有するこのようなポリペプチドの切断形態も

50

また含まれる。特定の実施形態では、F c 領域は、抗体の C H 2 及び C H 3 ドメインを含む。延長された血清半減期と共に、F c 部分を含む融合タンパク質（及びそれらから形成されるオリゴマー）は、プロテイン A またはプロテイン G カラム上でのアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製という利点を提供する。好ましい F c 領域はヒト I g G に由来し、これは I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 を含む。本明細書では、F c 中の特定の残基は位置により同定される。全ての F c 位置は、E U 番号付けスキームに基づいている。

【 0 0 7 2 】

抗体の F c 部分における 1 つの機能は、抗体がその標的と結合する場合に免疫系に伝達することである。これは、「エフェクター機能」と考えられる。伝達は、抗体依存性細胞傷害（A D C C）、抗体依存性細胞食作用（A D C P）、及び/または補体依存性細胞傷害（C D C）をもたらす。A D C C 及び A D C P は、免疫系の細胞表面上の F c 受容体に F c が結合することにより媒介される。C D C は、F c と補体系のタンパク質、例えば、C 1 q との結合により媒介される。

10

【 0 0 7 3 】

I g G サブクラスは、エフェクター機能を媒介するそれらの能力で異なる。例えば、I g G 1 は、A D C C 及び C D C を媒介することにおいて、I g G 2 及び I g G 4 よりもはるかに優れている。したがって、エフェクター機能が望ましくない実施形態では、I g G 2 F c が好ましいだろう。しかしながら、I g G 2 F c 含有分子は、I g G 1 F c 含有分子と比較した場合に、製造がより困難であって、より短い半減期などのあまり魅力的ではない生物物理学的特性を有することが知られている。

20

【 0 0 7 4 】

抗体のエフェクター機能は、F c に 1 つ以上の変異を導入することにより増加、または減少させることができる。本発明の実施形態は、エフェクター機能を高めるように操作された F c を有する I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質を含む（U . S . 7 , 3 1 7 , 0 9 1 及び S t r o h l , C u r r . O p i n . B i o t e c h . , 2 0 : 6 8 5 - 6 9 1 , 2 0 0 9 ; 両方ともその全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。高いエフェクター機能を有する例示的な I g G 1 F c 分子としては、以下の置換を有する分子が挙げられる：

S 2 3 9 D / I 3 3 2 E

30

S 2 3 9 D / A 3 3 0 S / I 3 3 2 E

S 2 3 9 D / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E

S 2 9 8 A / D 3 3 3 A / K 3 3 4 A

P 2 4 7 I / A 3 3 9 D

P 2 4 7 I / A 3 3 9 Q

D 2 8 0 H / K 2 9 0 S

D 2 8 0 H / K 2 9 0 S / S 2 9 8 D

D 2 8 0 H / K 2 9 0 S / S 2 9 8 V

F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L

F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / P 3 9 6 L

40

F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / V 3 0 5 I / P 3 9 6 L

G 2 3 6 A / S 2 3 9 D / I 3 3 2 E

K 3 2 6 A / E 3 3 3 A

K 3 2 6 W / E 3 3 3 S

K 2 9 0 E / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A

K 2 9 0 N / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A

K 2 9 0 E / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A / K 3 2 6 E

K 2 9 0 N / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A / K 3 2 6 E

【 0 0 7 5 】

I g G F c 含有タンパク質のエフェクター機能を高める別の方法は、F c のフコシル

50

化を減少させることによるものである。Fcに結合された二分岐複合型オリゴ糖からコアフコースを除去することにより、抗原結合またはCDCエフェクター機能を変化させることなく、ADCCエフェクター機能が大幅に増大した。Fc含有分子、例えば、抗体のフコシル化を減少または無効にするためのいくつかの方法が知られている。これらとしては、特定の哺乳動物細胞系、例えば、FUT8ノックアウト細胞系、バリアントCHO系Lecl3、ラットハイブリドーマ細胞系YB2/0、FUT8遺伝子に対して特異的な低分子干渉RNAを含む細胞系、ならびに - 1, 4 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII及びゴルジ - マンノシダーゼIIを共発現する細胞系を含むものにおける組換え発現が挙げられる。あるいは、Fc含有分子は、非哺乳動物細胞、例えば、植物細胞、酵母、または原核細胞、例えば、E. coliなどにおいて発現されてよい。

10

【0076】

特定の実施形態では、本発明のIL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質または抗IL-2抗体は、エフェクター機能を減少させるように操作されたFcを含む。低いエフェクター機能を有する例示的なFc分子としては、以下の置換を有する分子が挙げられる：

N297AまたはN297Q (IgG1)

L234A / L235A (IgG1)

V234A / G237A (IgG2)

L235A / G237A / E318A (IgG4)

H268Q / V309L / A330S / A331S (IgG2)

C220S / C226S / C229S / P238S (IgG1)

C226S / C229S / E233P / L234V / L235A (IgG1)

L234F / L235E / P331S (IgG1)

S267E / L328F (IgG1)

20

【0077】

ヒトIgG1がN297 (EU番号付けシステム) にグリコシル化部位を有すると、グリコシル化が、IgG1抗体のエフェクター機能に寄与することが知られている。例示的なIgG1配列が、配列番号3に提供される：

【0078】

30

40

50

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130

135

140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145

150

155

160

10

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165

170

175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180

185

190

20

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210

215

220

30

Pro Gly Lys

225

【 0 0 7 9 】

群は、非グリコシル化抗体を作製するために変異した N 2 9 7 を有する。この変異は、N 2 9 7 を、生化学的性質においてアスパラギンに類似しているアミノ酸、例えば、グルタミンなど (N 2 9 7 Q) と、または極性基を有しないアスパラギンを模倣するアラニン (N 2 9 7 A) と置換することに焦点を置いている。

40

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用される場合、「非グリコシル化抗体」または「非グリコシル化 f c 」は、F c の 2 9 7 位にある残基のグリコシル化状態を指す。抗体またはその他の分子は、1 つ以上のその他の場所にグリコシル化を含有してよいが、依然として非グリコシル化抗体または非グリコシル化 F c 融合タンパク質であると見なされてよい。

【 0 0 8 1 】

エフェクター機能を有しない I g G 1 F c を作製する取り組みでは、ヒト I g G 1 のアミノ酸 N 2 9 7 のグリシンへの変異、すなわち N 2 9 7 G が、その残基におけるその他の

50

アミノ酸置換よりもはるかに優れた精製効率及び生物物理学的特性を提供することが発見された。実施例 8 を参照のこと。したがって、好ましい実施形態では、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、N 2 9 7 G 置換を有するヒト I g G 1 F c を含む。N 2 9 7 G 置換を含む F c は、分子がヒト I g G 1 F c を含むいずれの状況においても有用であり、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合体との関連における使用に限定されない。特定の実施形態では、抗体は、N 2 9 7 G 置換を有する F c を含む。

【 0 0 8 2 】

N 2 9 7 G 変異を有するヒト I g G 1 F c を含む F c はまた、挿入、欠失、及び置換をさらに含んでよい。特定の実施形態では、ヒト I g G 1 F c は N 2 9 7 G 置換を含み、配列番号 3 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 1 % 同一、少なくとも 9 2 % 同一、少なくとも 9 3 % 同一、少なくとも 9 4 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 6 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一、または少なくとも 9 9 % 同一である。特に好ましい実施形態では、C 末端リジン残基が置換される、または欠失される。N 2 9 7 G 置換及び C 末端リジンの欠失を含むヒト I g G 1 のアミノ酸配列は、配列番号 4 に記載される。

10

【 0 0 8 3 】

グリコシル化 I g G 1 F c 含有分子は、グリコシル化 I g G 1 F c 含有分子よりも安定ではないことが示された。F c 領域は、非グリコシル化分子の安定性を増加させるようにさらに操作されてよい。いくつかの実施形態では、1 つ以上のアミノ酸が、二量体状態でジスルフィド結合を形成するようにシステインに置換される。配列番号 3 に記載されるアミノ酸配列の残基 V 2 5 9、A 2 8 7、R 2 9 2、V 3 0 2、L 3 0 6、V 3 2 3、または I 3 3 2 は、システインで置換されてよい。好ましい実施形態では、特定の残基対が互いにジスルフィド結合を選択的に形成し、それゆえジスルフィド結合のスクランプリングを制限または防止するような置換である。好ましい対としては、A 2 8 7 C 及び L 3 0 6 C、V 2 5 9 C 及び L 3 0 6 C、R 2 9 2 C 及び V 3 0 2 C、ならびに V 3 2 3 C 及び I 3 3 2 C が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 8 4 】

F c 含有分子が本明細書で提供され、残基 V 2 5 9、A 2 8 7、R 2 9 2、V 3 0 2、L 3 0 6、V 3 2 3、または I 3 3 2 のうち 1 つ以上がシステインで置換されて、その例としては、A 2 8 7 C 及び L 3 0 6 C、V 2 5 9 C 及び L 3 0 6 C、R 2 9 2 C 及び V 3 0 2 C、または V 3 2 3 C 及び I 3 3 2 C 置換を含むものが挙げられる。

30

【 0 0 8 5 】

I g G 1 F c に対して行われてよいさらなる変異は、F c 含有ポリペプチドの中でもヘテロ二量体形成を促進するものを含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、細胞中で共発現される場合に 2 つの異なる F c 含有ポリペプチド鎖のヘテロ二量体形成を促進させる「ノブ」及び「ホール」を作製するように操作される。U . S . 7 , 6 9 5 , 9 6 3 。その他の実施形態では、F c 領域は、静電ステアリングを使用して、細胞中で共発現される場合に 2 つの異なる F c 含有ポリペプチドのホモ二量体形成を妨げながら、ヘテロ二量体形成を促すように変化される。W O 0 9 / 0 8 9 , 0 0 4 は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。好ましいヘテロ二量体 F c としては、F c の一方の鎖が D 3 9 9 K 及び E 3 5 6 K 置換を含み、F c の他方の鎖が K 4 0 9 D 及び K 3 9 2 D 置換を含むものが挙げられる。その他の実施形態では、F c の一方の鎖が、D 3 9 9 K、E 3 5 6 K、及び E 3 5 7 K 置換を含み、F c の他方の鎖が、K 4 0 9 D、K 3 9 2 D、及び K 3 7 0 D 置換を含む。

40

【 0 0 8 6 】

特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質が単量体であること、すなわち、単一の I L - 2 変異タンパク質分子のみを含有することが有利であってよい。同様に、1 つ以上のさらなる標的と特異的に結合し得る二重、三重、または四重特異性抗体が望ましい場合もある。このような実施形態では、融合タンパク質または抗体の F c 領域は、ヘテロ二量体形成を促進する 1 つ以上の変異を含有してよい。融合タンパク質ま

50

たは抗体は、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合ポリペプチド中の F c 領域に相互変異を有するが、I L - 2 変異タンパク質または抗 I L - 2 重鎖可変ドメインを欠いている F c 領域と共発現される。2 つの F c 含有ポリペプチドのヘテロ二量体が形成される場合、得られたタンパク質は、単一の I L - 2 変異タンパク質または抗 I L - 2 結合ドメインのみを含む。

【 0 0 8 7 】

単量体 I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質を作製する別の方法は、I L - 2 変異タンパク質を、単量体 F c、すなわち、二量体化しない F c 領域に融合することである。安定した単量体 F c は、二量体化を妨げて、単量体形態の分子を安定化させる変異を含む。好ましい単量体 F c は、W O 2 0 1 1 / 0 6 3 3 4 8 に開示され、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、V 3 9 7、L 3 9 8、F 4 0 5、または Y 4 0 7 のトレオニン置換と共に、3 9 2 位及び 4 0 9 位に負荷電アミノ酸を含む F c を含む。

【 0 0 8 8 】

特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、F c と I L - 2 変異タンパク質との間にリンカーを含む。多くの異なるリンカーポリペプチドが、当該技術分野において既知であり、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質との関連において使用されてよい。好ましい実施形態では、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、F c と I L - 2 変異タンパク質との間に G G G G S (配列番号 5)、G G N G T (配列番号 6)、または Y G N G T (配列番号 7) からなるペプチドの 1 つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、F c 領域と I L - 2 変異タンパク質領域との間のポリペプチド領域は、G G G G S (配列番号 5)、G G N G T (配列番号 6)、または Y G N G T (配列番号 7) の単一コピーを含む。本明細書に示されるように、リンカーの G G N G T (配列番号 6) または Y G N G T (配列番号 7) は、適切な細胞中で発現される場合にグリコシル化され、このようなグリコシル化は、溶液中で、かつ / またはインビボで投与される場合にタンパク質を安定化させるのに役立つ場合がある。したがって、特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質融合タンパク質は、F c 領域と I L - 2 変異タンパク質領域との間にグリコシル化リンカーを含む。

【 0 0 8 9 】

グリコシル化リンカーは、ポリペプチドとの関連において配置される場合に有用な場合があると考えられている。ポリペプチドのアミノ酸配列中に挿入される、またはポリペプチドのアミノ酸配列中における 1 つ以上のアミノ酸に取って代わる G G N G T (配列番号 6) または Y G N G T (配列番号 7) を含むポリペプチドが、本明細書で提供される。好ましい実施形態では、G G N G T (配列番号 6) または Y G N G T (配列番号 7) は、ポリペプチド三次構造のループ中に挿入される。その他の実施形態では、ループの 1 つ以上のアミノ酸が、G G N G T (配列番号 6) または Y G N G T (配列番号 7) で置き換えられる。

【 0 0 9 0 】

F c の C 末端部分及び / または I L - 2 変異タンパク質のアミノ末端部分は、哺乳動物細胞中で発現される場合に I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質のグリコシル化プロファイルを変化させる 1 つ以上の変異を含有してよい。特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質は、T 3 置換、例えば、T 3 N または T 3 A をさらに含む。I L - 2 変異タンパク質は、S 5 T などの S 5 置換をさらに含んでよい。

【 0 0 9 1 】

I L - 2 変異タンパク質及び I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質ならびに抗 I L - 2 抗体の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれて、一般に翻訳後に行われるが、必ずしもそうとは限らない。例えば、いくつかの種類の共有結合修飾は、そのアミノ酸残基のいくつかを、選択された側鎖または N 末端もしくは C 末端残基と反応させることができる有機誘導体化剤と反応させることにより分子中に導入される。

【 0 0 9 2 】

最も一般的にはシステニル残基を、 α -ハロアセテート（及び対応するアミン）、例えば、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドなどと反応させて、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 α -ブromo- β -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルリン酸、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリ安息香酸塩、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応により誘導体化される。

【 0 0 9 3 】

ヒスチジル残基は、pH 5.5 ~ 7.0 のジエチルピロカーボネートとの反応により誘導化されるが、その理由とは、この薬剤がヒスチジル側鎖に比較的特異的であるからである。パラ-ブromoフェナシルプロミドも有用であり；反応は、好ましくはpH 6.0 の0.1 M カコジル酸ナトリウム中で実施される。

【 0 0 9 4 】

リジニル及びアミノ末端残基は、コハク酸またはその他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤を用いた誘導体化は、リジニル残基の電荷を反転させる効果を有する。アルファ-アミノ含有残基を誘導体化するためのその他の好適な試薬としては、ピコリンイミド酸メチルなどのイミドエステル；リン酸ピリドキサル；ピリドキサル；クロロボロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2,4-ペンタンジオン；及びグリオキシル酸塩とのトランスアミナーゼ触媒反応物が挙げられる。

【 0 0 9 5 】

アルギニル残基は、1つまたはいくつかの従来の試薬、中でもフェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン、及びニンヒドリンとの反応により修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の pK_a が高いため、アルカリ性条件で反応が実施されることを必要とする。さらに、これらの試薬は、リジン基に加えてアルギニンイブシロンアミノ基と反応してよい。

【 0 0 9 6 】

チロシル残基の特異的修飾は、スペクトル標識をチロシル残基中に導入することに特に関心を払いながら、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応により行われてよい。最も一般的には、N-アセチルイミジゾール及びテトラニトロメタンが、それぞれO-アセチルチロシル種及び3-ニトロ誘導体を形成するために使用される。チロシル残基は、好適な上記ラジオイムノアッセイのクロラミンT法に使用するための標識タンパク質を調製するために、 ^{125}I または ^{131}I を使用してヨウ素化される。

【 0 0 9 7 】

カルボキシ側基（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミド（ $R'-N=C=N-R'$ ）（式中、R及びR'は、場合により異なるアルキル基である）、例えば、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドなどとの反応により選択的に修飾される。さらに、アスパルチル残基及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニル残基及びグルタミニル残基に変換される。

【 0 0 9 8 】

二官能性剤を用いた誘導体化は、様々な方法に使用するために、抗原結合タンパク質を非水溶性支持体マトリックスまたは表面に架橋するのに有用である。一般的に使用される架橋剤としては、例えば、1,1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル、例えば、3,3'-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）などのジスクシンイミジルエステルを含み、及びビス-N-マレイミド-1,8-オクタンなどの二官能性マレイミドが挙げられる。メチル-3-[（p-アジドフェニル）ジチオ]プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架

10

20

30

40

50

橋を形成することができる光活性化可能な中間体をもたらす。あるいは、反応性非水溶性マトリックス、例えば、米国特許第3,969,287号;第3,691,016号;第4,195,128号;第4,247,642号;第4,229,537号;及び第4,330,440号に記載されている臭化シアン活性化炭水化物及び反応基質などが、タンパク質固定化に用いられる。

【0099】

グルタミル残基及びアスパラギン残基は、それぞれ対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基へと頻繁に脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も、本発明の範囲内である。

【0100】

その他の修飾としては、プロリン及びリジンの水酸化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79 - 86)、N末端アミンのアセチル化、ならびに任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0101】

本発明の範囲内に含まれるIL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体における別の種類の共有結合修飾は、タンパク質のグリコシル化パターンを変化させることを含む。当該技術分野において既知のように、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列 (例えば、以下で述べられる特定のグリコシル化アミノ酸残基の有無)、またはタンパク質が産生される宿主細胞もしくは生物の両方に依存し得る。特定の発現系は以下で述べられる。

【0102】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型は、アスパラギン残基側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン (式中、Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である) は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在が、潜在的なグリコシル化部位を形成する。O結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうち1つの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンが使用されてもよい。

【0103】

IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列が (N結合型グリコシル化部位の) 上記トリペプチド配列のうち1つ以上を含有するようにその配列を変化させることにより簡便に行われてよい。この変化はまた、(O結合型グリコシル化部位の) 開始配列に対する1つ以上のセリンもしくはトレオニン残基の付加、またはそれらによる置換によって行われてもよい。容易にするために、IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体のアミノ酸配列は、DNAレベルでの変化により、特に所望のアミノ酸に翻訳されるだろうコドンを生成するように、あらかじめ選択された塩基で標的ポリペプチドをコードするDNAを変異させることにより好ましくは変化される。

【0104】

IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドとタンパク質との化学的カップリングまたは酵素カップリングによるものである。これらの手順は、それらがN結合型及びO結合型グリコシル化のためにグリコシル化能を有する宿主細胞において、タンパク質の産生を必要としないという点で有利である。使用されるカップリング手法に応じて、糖 (複数可) は、(a) アルギニン及びヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c)

10

20

30

40

50

システインの基などの遊離スルフヒドリル基、(d)セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリンの基などの遊離ヒドロキシル基、(e)フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンの基などの芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基に結合されてよい。これらの方法は、1987年9月11日公開のWO87/05330に、及びApplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されている。

【0105】

出発IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的にまたは酵素的に行われてよい。化学的脱グリコシル化は、化合物のトリフルオロメタンスルホン酸、または同等の化合物へのタンパク質の曝露を必要とする。この処理により、ポリペプチドは無傷のまま、結合する糖(N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン)を除く、ほとんどまたは全ての糖の切断がもたらされる。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52により、及びEdge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350により記載されるように、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。潜在的なグリコシル化部位におけるグリコシル化は、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105により記載されるように、化合物ツニカマイシンの使用により防止されてよい。ツニカマイシンは、タンパク質-N-グリコシド結合の形成をブロックする。

【0106】

IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体における別の種類の共有結合修飾は、タンパク質を様々な非タンパク質性ポリマーに、例えば、これらに限定されないが、様々なポリオール、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンなどを含むポリマーに、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号または第4,179,337号に記載されている手法で結合することを含む。加えて、アミノ酸置換が、IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体内の様々な位置で行われて、PEGなどのポリマーの付加を促進してよい。したがって、本発明の実施形態は、PEG化IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体を含む。このようなPEG化タンパク質は、それらの非PEG化形態よりも増加した半減期及び/または減少した免疫原性を有する場合がある。

【0107】

IL-2変異タンパク質及びIL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド

IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体をコードする核酸が、本発明内に包含される。本発明の態様は、本明細書に記載されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドバリエーション(例えば、縮重による)を含む。

【0108】

核酸の単離のためのプローブもしくはプライマーとして、またはデータベース検索のためのクエリー配列として使用される、本明細書に記載されるアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列は、アミノ酸配列からの「逆翻訳」により得られ得る。周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)手順を用いて、IL-2変異タンパク質及びIL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質をコードするDNA配列を単離かつ増幅することができる。DNA断片の組合せにおいて所望の末端を画定するオリゴヌクレオチドが、5'及び3'プライマーとして用いられる。オリゴヌクレオチドは、増幅したDNA断片の組合せの、発現ベクター中への挿入を促進するために、制限エンドヌクレアーゼの認識部位をさらに含有し得る

。PCR技術は、Saiki et al., Science 239:487(1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego(1989), pp.189-196; 及びPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, Inc.(1990)に記載されている。

【0109】

本発明の核酸分子は、一本鎖形態及び二本鎖形態の両方のDNA及びRNA、加えて対応する相補的配列を含む。「単離核酸」は、天然に存在する供給源から単離された核酸の場合、その核酸が単離された生物のゲノム中に存在する隣接した遺伝子配列から分離されている核酸である。鋳型から酵素的に、または化学的に合成される核酸、例えば、PCR産物、cDNA分子、またはオリゴヌクレオチドなどの場合、このようなプロセスから得られる核酸が単離核酸であると理解される。単離核酸分子は、分離した断片の形態で、またはより大きな核酸構築物の成分としての核酸分子を指す。好ましい一実施形態では、核酸は、汚染する内因性物質を実質的に含まない。核酸分子は、実質的に純粋形態であり、標準的な生化学的方法(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1989)で概要が述べられているものなど)により、その成分であるヌクレオチド配列の同定、操作、及び回収を可能にする量または濃度で、少なくとも1回単離されたDNAまたはRNAに好ましくは由来している。このような配列は、典型的には真核生物遺伝子中に存在する内部非翻訳配列、またはイントロンによって中断されることなく、オープンリーディングフレームの形態で好ましくは提供かつ/または構築される。非翻訳DNAの配列は、オープンリーディングフレームから5'または3'に存在し得、それらはコード領域の操作または発現に干渉しない。

【0110】

本発明によるIL-2変異タンパク質は通常、カセットもしくはPCR変異誘発または当該技術分野において周知のその他の技術を使用した、IL-2変異タンパク質またはIL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質をコードするDNA中のヌクレオチドの部位特異的変異誘発により、バリエントをコードするDNAを産生し、その後、本明細書で概要が述べられているような細胞培養物中で組換えDNAを発現させることにより調製される。しかしながら、IL-2変異タンパク質及びIL-2変異タンパク質Fc融合体は、確立された技術を使用してインビトロ合成により調製されてよい。バリエントは、典型的には天然に存在する類似体と同じ定性的生物活性、例えば、Treg増殖を示すが、バリエントはまた、以下により詳細に概要が述べられるだろうように、改変された特徴を有するものも選択され得る。

【0111】

当業者には理解されるだろうように、遺伝子コードの縮重によって、本発明の各IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、及び抗IL-2抗体は、極めて多数の核酸によりコードされ、その各々が本発明の範囲内であり、標準的な技術を使用して作製され得る。したがって、特定のアミノ酸配列を同定すると、当業者は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させない方法で1つ以上のコドンの配列を単純に修飾することにより、任意の数の異なる核酸を作製することができる。

【0112】

本発明はまた、上記の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、発現ベクター、転写または発現カセットの形態で発現系及び構築物を提供する。加えて、本発明は、このような発現系または構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0113】

典型的には、宿主細胞のいずれにおいても使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニング及び発現のための配列を含有

するだろう。このような配列は、特定の実施形態では「フランキング配列」と総称され、典型的には以下のヌクレオチド配列のうち1つ以上を含むだろう：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナー及びアクセプタースプライス部位を含有する完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能マーカーエレメント。これらの配列の各々は、以下で述べられる。

【0114】

場合により、ベクターは、「タグ」コード配列、すなわち、IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体コード配列の5'または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含有してよく；オリゴヌクレオチド配列は、市販の抗体が存在するポリHis（ヘキサHis（配列番号21）など）、または別の「タグ」、例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）、もしくはmycなどをコードする。このタグは、典型的にはポリペプチドの発現時にポリペプチドに融合され、宿主細胞からのポリペプチドのアフィニティー精製または検出のための手段として機能し得る。アフィニティー精製は、例えば、タグに対する抗体をアフィニティマトリックスとして使用するカラムクロマトグラフィーにより行われ得る。場合により、タグはその後、様々な手段、例えば、切断のために特定のペプチダーゼを使用することなどにより除去され得る。

【0115】

フランキング配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種及び/もしくは株に由来する）、異種（すなわち、宿主細胞種もしくは株以外の種に由来する）、ハイブリッド（すなわち、2つ以上の供給源からのフランキング配列の組合せ）、合成または天然であってよい。したがって、フランキング配列の供給源は、任意の原核生物もしくは真核生物、任意の脊椎生物もしくは無脊椎生物、または任意の植物であってよいが、ただし、フランキング配列が宿主細胞機構において機能的であり、この機構により活性化され得ることを条件とする。

【0116】

本発明のベクターに有用なフランキング配列は、当該技術分野において周知のいくつかの方法のいずれかによって得られてよい。典型的には、本明細書で有用なフランキング配列は、マッピングにより、かつ/または制限エンドヌクレアーゼ消化によりあらかじめ同定されているだろうし、それゆえ、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して適切な組織源から単離され得る。いくつかの場合には、フランキング配列の全ヌクレオチド配列が既知であってよい。本明細書では、フランキング配列は、核酸合成またはクローニングについて本明細書に記載される方法を使用して合成されてよい。

【0117】

フランキング配列の全てまたは一部のみが既知であろうとなかろうと、この配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、かつ/または好適なプローブ、例えば、同じ種もしくは別の種からのオリゴヌクレオチド及び/もしくはフランキング配列断片などでゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られてよい。フランキング配列が未知である場合、フランキング配列を含有するDNAの断片は、例えば、コード配列または別の遺伝子（複数可）でさえ含有する場合があるより大きなDNA片から単離されてよい。単離は、制限エンドヌクレアーゼ消化により適切なDNA断片を産生し、続いてアガロースゲル精製、QiaGen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（チャットワース、カリフォルニア州）、または当業者に既知のその他の方法を使用して単離することにより行われてよい。この目的を達成するための好適な酵素の選択は、当業者には容易に明らかとなるだろう。

【0118】

複製起点は、典型的には市販購入されたこれらの原核生物発現ベクターの一部であり、起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅に役立つ。好適なベクターが複製起点部位を含

10

20

30

40

50

有しない場合、部位は既知の配列に基づいて化学的に合成されて、ベクターに連結されてよい。例えば、プラスミド pBR322 (New England Biolabs、ビバリー、マサチューセッツ州)からの複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に好適であり、様々なウイルス起点(例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、またはパピローマウイルス、例えば、HPVもしくはBPVなど)が、哺乳動物細胞中でベクターをクローニングするのに有用である。一般に、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない(例えば、SV40起点が使用されることが多いのは、単に起点がウイルス初期プロモーターも含有するからである)。

【0119】

転写終結配列は、典型的にはポリペプチドコード領域末端の3'側に位置し、転写を終結させるように機能する。通常、原核細胞の転写終結配列は、G-Cリッチ断片に続いてポリT配列である。この配列は、ライブラリーから容易にクローニングされる、あるいはベクターの一部として市販購入されるが、これはまた、本明細書に記載されるものなどの核酸合成の方法を使用して容易に合成され得る。

【0120】

選択可能マーカー遺伝子は、選択的培養培地中で成長した宿主細胞の生存及び増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、(a)原核生物宿主細胞に抗生物質もしくはその他の毒素、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、もしくはカナマイシンに対する耐性を付与する；(b)細胞の栄養要求欠損を補完する；または(c)複合培地もしくは合成培地から入手不可能な重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。具体的な選択可能マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。有利には、ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物及び真核生物宿主細胞の両方における選択に使用されてよい。

【0121】

その他の選択可能な遺伝子が、発現されるだろう遺伝子を増幅するために使用されてよい。増幅は、増殖または細胞生存のために重要なタンパク質の産生に必要とされる遺伝子が、組換え細胞の連続世代の染色体中でタンデムに反復するプロセスである。哺乳動物細胞に好適な選択可能マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)及びプロモーターレスのチルニジン(thyridine)キナーゼ遺伝子が挙げられる。哺乳動物細胞の形質転換体は、形質転換体のみが、ベクター中に存在する選択可能な遺伝子によって生存するように一意的に適合されるような選択圧下に置かれる。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に増加する条件下で形質転換細胞を培養することにより課され、それによって、選択可能な遺伝子、ならびに結果として、所望のポリペプチド、例えば、IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体の重鎖及び/もしくは軽鎖などをコードする遺伝子の両方の増幅をもたらす。結果として、増加した量のポリペプチドが、増幅したDNAから合成される。

【0122】

リボソーム結合部位は通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、Shine-Dalgarno配列(原核生物)またはKozak配列(真核生物)を特徴とする。このエレメントは、典型的にはプロモーターの3'側及び発現されるべきポリペプチドのコード配列の5'側に位置する。特定の実施形態では、1つ以上のコード領域が内部リボソーム結合部位(IRES)に作動可能に連結されてよく、単一のRNA転写産物から2つのオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする。

【0123】

いくつかの場合には、例えば、真核生物宿主細胞発現系においてグリコシル化が望ましいなどの場合、様々なプレ配列またはプロ配列を操作して、グリコシル化または収率を改善してよい。例えば、ある場合には特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変化させてよく、またはプロ配列を付加してよく、これはまたグリコシル化に影響を及ぼす場合がある。最終タンパク質産物は、-1位(成熟タンパク質の最初のアミノ酸と比較して)に発現に伴う1つ以上のさらなるアミノ酸を有する場合があり、これは完全に除去さ

10

20

30

40

50

れていない場合がある。例えば、最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合された、ペプチダーゼ切断部位に見られる１つまたは２つのアミノ酸残基を有してよい。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用により、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、わずかに切断された形態の所望のポリペプチドが生じる場合がある。

【 0 1 2 4 】

本発明の発現ベクター及びクローニングベクターは、宿主生物によって認識され、かつ IL - 2 変異タンパク質、IL - 2 変異タンパク質 F c 融合体、または抗 IL - 2 抗体の重鎖及び／もしくは軽鎖をコードする分子に作動可能に連結されるプロモーターを典型的には含有するだろう。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子の開始コドンの上流（すなわち、5'側）（一般に、約 100 ~ 1000 bp 以内）に位置する非転写配列である。従来、プロモーターは、２つのクラス：すなわち、誘導性プロモーター及び構成的プロモーターのうち１つに分類される。誘導性プロモーターは、培養条件における若干の変化、例えば、栄養素の有無または温度の変化などに応答するそれらの制御下で DNA から高レベルの転写を開始させる。他方では、構成的プロモーターは、それらが作動可能に連結された遺伝子を一様に転写する、すなわち、遺伝子発現をほとんどまたは全く制御しない。様々な潜在的宿主細胞により認識される多数のプロモーターが周知である。

【 0 1 2 5 】

酵母宿主との使用に好適なプロモーターもまた、当該技術分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に好適なプロモーターが周知であり、これらとしては、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス 2 など）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス及び最も好ましくはシミアンウイルス 40（SV40）などのウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。その他の好適な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター、例えば、熱ショックプロモーター及びアクチンプロモーターが挙げられる。

【 0 1 2 6 】

対象となってよいさらなるプロモーターとしては、SV40 初期プロモーター（Benoit and Chambon, 1981, Nature 290:304-310）；CMV プロモーター（Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U. S. A. 81:659-663）；ラウス肉腫ウイルスの 3' 長末端反復に含有されるプロモーター（Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1444-1445）；メタロチオネイン遺伝子からのプロモーター及び調節配列 Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42）；ならびにベータ - ラクターマーゼプロモーターなどの原核生物プロモーター（Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727-3731）；または tac プロモーター（DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21-25）が挙げられるが、これらに限定されない。同様に対象となるのは、以下の動物転写制御領域であり、これらは組織特異性を示し、トランスジェニック動物で利用されている：膵腺房細胞で活性なエラスターゼ I 遺伝子制御領域（Swift et al., 1984, Cell 38:639-646；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515）；膵ベータ細胞で活性なインスリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, Nature 315:115-122）；リンパ細胞で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658；Adames et al., 1985, Nature 318:533-538；Alexander et al.,

, 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436 - 1444); 精巣細胞、乳房細胞、リンパ細胞及び肥満細胞で活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域 (Leder et al., 1986, Cell 45: 485 - 495); 肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268 - 276); 肝臓で活性なアルファ-フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639 - 1648; Hammer et al., 1987, Science 253: 53 - 58); 肝臓で活性なアルファ1-アンチトリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161 - 171); 骨髄細胞で活性なベータグロビン遺伝子制御領域 (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338 - 340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89 - 94); 脳内のオリゴデンドロサイト細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703 - 712); 骨格筋で活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature 314: 283 - 286); ならびに視床下部で活性な性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason et al., 1986, Science 234: 1372 - 1378)。

【0127】

エンハンサー配列は、高等真核生物による転写を増加させるためにベクター中に挿入されてよい。エンハンサーは、プロモーターに作用して転写を増加させる、通常約10～3000bp長のDNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは、比較的、方向性及び位置に依存せず、転写単位の5'及び3'の両方の位置に見出されている。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が、既知である(例えば、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、アルファ-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的にはウイルス由来のエンハンサーが使用される。当該技術分野において既知のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーター活性化のための例示的な促進エレメントである。エンハンサーは、コード配列の5'または3'のいずれかでベクター内に配置されてよいが、典型的にはプロモーターの部位5'に位置する。適切な天然または異種シグナル配列(リーダー配列またはシグナルペプチド)をコードする配列が、IL-2変異タンパク質、IL-2変異タンパク質Fc融合体、または抗IL-2抗体の重鎖及び/もしくは軽鎖の細胞外分泌を促進するために発現ベクター中に組み込まれ得る。シグナルペプチドまたはリーダーの選択は、タンパク質が産生されるだろう宿主細胞の種類に依存し、異種シグナル配列が、天然シグナル配列に取って代わり得る。哺乳動物宿主細胞において機能的なシグナルペプチドの例としては、以下のものが挙げられる：米国特許第4,965,195号に記載されているインターロイキン-7(IL-7)のシグナル配列; Cosman et al., 1984, Nature 312: 768に記載されているインターロイキン-2受容体のシグナル配列; 欧州特許第0367566号に記載されているインターロイキン-4受容体シグナルペプチド; 米国特許第4,968,607号に記載されているI型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド; 欧州特許第0460846号に記載されているII型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド。一実施形態では、本発明のIL-2変異タンパク質Fc融合体は、図24に示されるようなリーダー配列を含む。

【0128】

ベクターは、ベクターが宿主細胞ゲノム中に組み込まれる場合に発現を促進する1つ以上のエレメントを含有してよい。例としては、EASEエレメント(Aldrich et al., 2003 Biotechnol Prog. 19: 1433 - 38)及びマトリックス結合領域(MAR)が挙げられる。MARは、クロマチンの構造的構成を媒介し、統合されたベクターを「位置」効果から遮断する場合がある。したがって、MARは、ベクターが安定したトランスフェクタントを作製するために使用される場合に特に有用である

。多数の天然及び合成M A R含有核酸が、当該技術分野、例えば、米国特許第6, 239, 328号；第7, 326, 567号；第6, 177, 612号；第6, 388, 066号；第6, 245, 974号；第7, 259, 010号；第6, 037, 525号；第7, 422, 874号；第7, 129, 062号において既知である。

【0129】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターなどの出発ベクターから構築されてよい。このようなベクターは、所望のフランキング配列の全てを含有してよい、または含有していてもよい。本明細書に記載されるフランキング配列のうち1つ以上がまだベクター中に存在していない場合、それらを個別に得てベクターに連結してよい。フランキング配列の各々を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

10

【0130】

ベクターが構築されて、I L - 2変異タンパク質、I L - 2変異タンパク質F c融合体、または抗I L - 2抗体の重鎖及び／もしくは軽鎖をコードする核酸分子が、ベクターの適切な部位中に挿入された後、完全なベクターが、増幅及び／またはポリペプチド発現に好適な宿主細胞中に挿入されてよい。選択された宿主細胞への発現ベクターの形質転換は、周知の方法、例えば、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、またはその他の既知の技術を含む方法により行われてよい。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の種類の関数であるだろう。これらの方法及びその他の好適な方法は、当業者に周知であり、例えば、上記のS a m b r o o k e t a l . , 2001に記載されている。

20

【0131】

宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、I L - 2変異タンパク質、I L - 2変異タンパク質F c融合体、または抗I L - 2抗体の重鎖及び／もしくは軽鎖を合成し、これらは、その後に培養培地から収集され得る（宿主細胞が培地中に変異タンパク質などを分泌する場合）、または変異タンパク質などを産生する宿主細胞から直接収集され得る（変異タンパク質などが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、様々な要因、例えば、所望の発現レベル、活性に望ましいまたは必要なポリペプチド修飾（グリコシル化またはリン酸化など）及び生物学的に活性な分子へのフォールディングの容易さなどに依存するだろう。宿主細胞は、真核生物または原核生物であってよい。

30

【0132】

発現のための宿主として入手可能な哺乳動物細胞系は、当該技術分野において周知であり、これに限定されないが、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) から入手可能な不死化細胞系を含み、当該技術分野において既知の発現系に使用される任意の細胞系が、本発明の組換えポリペプチドを作製するために使用され得る。一般に、宿主細胞は、所望のI L - 2変異タンパク質、I L - 2変異タンパク質F c融合体、または抗I L - 2抗体をコードするDNAを含む組換え発現ベクターで形質転換される。用いられてよい宿主細胞の中には、原核生物、酵母または高等真核細胞がある。原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、E . c o l i またはバチルス属が挙げられる。高等真核細胞としては、昆虫細胞及び哺乳動物起源の確立された細胞系が挙げられる。好適な哺乳動物宿主細胞系の例としては、サル腎臓細胞のC O S - 7系 (A T C C C R L 1 6 5 1) (G l u z m a n e t a l . , 1 9 8 1 , C e l l 2 3 : 1 7 5)、L細胞、293細胞、C 1 2 7細胞、3 T 3細胞 (A T C C C C L 1 6 3)、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、もしくはそれらの誘導体、例えば、無血清培地中で増殖するV e g g i e C H O及び関連細胞系など (R a s m u s s e n e t a l . , 1 9 9 8 , C y t o t e c h n o l o g y 2 8 : 3 1)、H e L a細胞、B H K (A T C C C R L 1 0) 細胞系、及びM c M a h a n e t a l . , 1 9 9 1 , E M B O J . 1 0 : 2 8 2 1に記載されているようなアフリカミドリザル腎臓細胞系C V I (A T C C C C L 7 0) に由来するC V I / E B N A細胞系、ヒト胎児腎臓細胞、例えば、293、293 E B N AもしくはM S R 293など、ヒト表皮A 4 3 1

40

50

細胞、ヒトColo205細胞、その他の形質転換霊長類細胞系、正常二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養物に由来する細胞株、一次外植片、HL-60、U937、HaKまたはJurkat細胞が挙げられる。場合により、哺乳動物細胞系、例えば、HepG2/3B、KB、NIH3T3またはS49などが、様々なシグナル伝達アッセイまたはレポーターアッセイでポリペプチドを使用するのが望ましい場合に、ポリペプチドの発現に使用され得る。

【0133】

あるいは、酵母などの下等真核生物において、または細菌などの原核生物においてポリペプチドを産生することが可能である。好適な酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、クルイベロマイセス属株、カンジダ属、または異種ポリペプチドを発現することができる任意の酵母株が挙げられる。好適な細菌株としては、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Salmonella typhimurium*、または異種ポリペプチドを発現することができる任意の細菌株が挙げられる。ポリペプチドが酵母または細菌中で作製される場合、機能的ポリペプチドを得るために、例えば、適切な部位のリン酸化またはグリコシル化によって、酵母または細菌中で産生されるポリペプチドを修飾することが望ましい場合がある。このような共有結合は、既知の化学的または酵素的方法を使用して行われ得る。

【0134】

ポリペプチドはまた、本発明の単離核酸を、1種以上の昆虫発現ベクター内の好適な制御配列に作動可能に連結させて、昆虫発現系を用いることにより産生され得る。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料及び方法は、例えば、Invitrogen、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国からキット形態で市販されていて(MaxBac(登録商標)キット)、このような方法は、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)、及びLuckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)に記載されているように、当該技術分野において周知である。無細胞翻訳系も、本明細書に開示される核酸構築物に由来するRNAを使用して、ポリペプチドを産生させるために用いられ得る。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物細胞宿主と共に使用するための適切なクローニングベクター及び発現ベクターは、Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)により記載されている。好ましくは少なくとも1つの発現制御配列に作動可能に連結された、本発明の単離核酸を含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」である。

【0135】

特定の態様では、本発明は、制御性T細胞を優先的に刺激し、D20E、D20G、D20W、D84A、D84S、H16D、H16G、H16K、H16R、H16T、H16V、I92K、I92R、L12K、L19D、L19N、L19T、N88D、N88R、N88S、V91D、V91G、V91K、及び/またはV91S置換ならびに配列番号1に記載されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一のアミノ酸配列を含むヒトIL-2変異タンパク質をコードする単離核酸を含む。

【0136】

本明細書に記載される例示的なIL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質のいずれかをコードする単離核酸もまた含まれる。好ましい実施形態では、抗体のFc部分及びヒトIL-2変異タンパク質は、場合によりFc領域とIL-2変異タンパク質との間にコードされるリンカーを用いて、単一のオープンリーディングフレーム内にコードされる。

【0137】

別の態様では、プロモーターに作動可能に連結された、上記IL-2変異タンパク質ま

たは I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターが、本明細書で提供される。

【 0 1 3 8 】

別の態様では、上記 I L - 2 変異タンパク質、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質、または抗 I L - 2 抗体をコードする単離核酸を含む宿主細胞が、本明細書で提供される。宿主細胞は、E . c o l i などの原核細胞であってよい、または哺乳動物細胞などの真核細胞であってよい。特定の実施形態では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞系である。

【 0 1 3 9 】

別の態様では、ヒト I L - 2 変異タンパク質を作製する方法が、本明細書で提供される。方法は、ヒト I L - 2 変異タンパク質に作動可能に連結されるプロモーターが発現される条件下で、宿主細胞を培養することを含む。その後、ヒト I L - 2 変異タンパク質は、培養物から採取される。I L - 2 変異タンパク質は、培養培地及び / または宿主細胞溶解物から採取されてよい。

【 0 1 4 0 】

別の態様では、ヒト I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質を作製する方法が、本明細書で提供される。方法は、ヒト I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質に作動可能に連結されるプロモーターが発現される条件下で、宿主細胞を培養することを含む。その後、ヒト I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、培養物から採取される。ヒト I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、培養培地及び / または宿主細胞溶解物から採取されてよい。

【 0 1 4 1 】

別の態様では、抗 I L - 2 抗体を作製する方法が、本明細書で提供される。方法は、抗 I L - 2 抗体の重鎖及び軽鎖に作動可能に連結されるプロモーターが発現される条件下で、宿主細胞を培養することを含む。その後、抗 I L - 2 抗体は、培養物から採取される。抗 I L - 2 抗体は、培養培地及び / または宿主細胞溶解物から採取されてよい。

【 0 1 4 2 】

医薬組成物

いくつかの実施形態では、本発明は、治療有効量の I L - 2 変異タンパク質または抗 I L - 2 抗体を、薬学的に有効な希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤、及び / またはアジュバントと共に含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質は、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質の枠内である。本発明の医薬組成物としては、液体組成物、凍結組成物、及び凍結乾燥組成物が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 4 3 】

好ましくは、製剤材料は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントにとって非毒性である。具体的な実施形態では、治療分子を含有する治療有効量の I L - 2 変異タンパク質、例えば、I L - 2 変異タンパク質 F c 融合体を含む医薬組成物が提供される。

【 0 1 4 4 】

特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、組成物の p H、オスモル濃度、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解速度または放出速度、吸着または浸透を変更、維持または保持するための製剤材料を含有してよい。このような実施形態では、好適な製剤材料としては、アミノ酸 (グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、プロリン、もしくはリジンなど) ; 抗菌剤 ; 抗酸化剤 (アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムもしくは亜硫酸水素ナトリウムなど) ; 緩衝剤 (ホウ酸塩、重炭酸塩、T r i s - H C l、クエン酸塩、リン酸塩もしくはその他の有機酸など) ; 増量剤 (マンニトールもしくはグリシンなど) ; キレート剤 (エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) など) ; 錯化剤 (カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ - シクロデキストリンもしくはヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリンなど) ; 充填剤 ; 単糖類 ; 二糖類 ; 及びその他の炭水化物 (グルコース、マンノースもしくはデキストリンなど) ; タンパク質 (血清アルブ

10

20

30

40

50

ミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンなど)；着色剤、香味剤及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸もしくは過酸化水素など）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マンニトールもしくはソルビトールなど）；懸濁化剤；界面活性剤もしくは湿潤剤（pluronic、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート20などのポリソルベート、ポリソルベート、triton、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパル（tyloxapal）など）；安定性増強剤（スクロースもしくはソルビトールなど）；張度増強剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、マンニトールソルビトールなど）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤ならびに／または薬学的アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。REMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Companyを参照のこと。

10

【0145】

特定の実施形態では、最適な医薬組成物は、例えば、目的の投与経路、送達形式及び所望の投与量に応じて、当業者により決定されるだろう。例えば、上記のREMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCESを参照のこと。特定の実施形態では、このような組成物は、本発明の抗原結合タンパク質の物理的状態、安定性、インビボ放出速度及びインビボクリアランス速度に影響を及ぼす場合がある。特定の実施形態では、医薬組成物中の主なビヒクルまたは担体は、本質的に水性または非水性のいずれかであってよい。例えば、好適なビヒクルまたは担体は、注射用水、生理食塩水または人工脳脊髄液であってよく、非経口投与用の組成物において一般的なその他の材料を補充する可能性がある。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水が、さらなる例示的なビヒクルである。具体的な実施形態では、医薬組成物は、約pH7.0～8.5のTris緩衝液、または約pH4.0～5.5の酢酸緩衝液を含み、ソルビトールまたはそれに好適な代替物をさらに含んでよい。本発明の特定の実施形態では、IL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体組成物は、所望の純度を有する選択された組成物を、任意の製剤用薬剤（上記のREMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES）と混合することにより、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で保存のために調製されてよい。さらに、特定の実施形態では、IL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体生成物は、スクロースなどの適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤化されてよい。

20

30

【0146】

本発明の医薬組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、組成物は、吸入のために、または消化管を通過する送達、例えば、経口送達などのために選択されてよい。このような薬学的に許容される組成物の調製は、当業者の技能範囲内である。製剤成分は、投与の部位に許容される濃度で好ましくは存在する。特定の実施形態では、緩衝液は、組成物を生理学的pHで、またはそれよりもわずかに低いpHで、典型的には約5～約8のpH範囲内に維持するために使用される。

40

【0147】

非経口投与が検討される場合、本発明に使用するための治療用組成物は、薬学的に許容されるビヒクル中に所望のIL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体組成物を含む、発熱物質非含有の非経口的に許容される水溶液の形態で提供されてよい。非経口注射に特に好適なビヒクルは滅菌蒸留水であり、その中で変異タンパク質または抗IL-2抗体組成物が、滅菌等張液として製剤化されて、適切に保持される。特定の実施形態では、調製は、所望の分子と、デポー注射により送達され得る生成物の制御放出または持続放出を提供する場合のある薬剤、例えば、注射用ミクロスフェア、生体浸食性粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸もしくはポリグリコール酸など）、ビーズまたはリポソームなどとの製剤化

50

を含み得る。特定の実施形態では、循環中の持続期間を促進する効果を有するヒアルロン酸もまた使用されてよい。特定の実施形態では、移植可能な薬物送達デバイスが、IL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体組成物を導入するために使用されてよい。

【0148】

持続送達または制御送達製剤中にIL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体組成物を含む製剤を含む、さらなる医薬組成物が当業者には明らかだろう。様々なその他の持続送達または制御送達手段、例えば、リポソーム担体、生体浸食性微粒子または多孔質ビーズ及びデポー注射などを製剤化するための技術もまた、当業者には既知である。例えば、国際特許出願第PCT/US93/00829号を参照し、これは参照によって組み込まれ、医薬組成物の送達のための、多孔質ポリマー微粒子の制御放出について記載している。持続放出調製物は、成形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態で半透性ポリマーマトリックスを含んでよい。持続放出マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号及び欧州特許出願公開第EP058481号に開示されるようなもので、その各々が参照によって組み込まれる）、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556）、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）（Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277及びLanger, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレン酢酸ビニル（上記のLanger et al., 1981）またはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第EP133,988号）を挙げてよい。持続放出組成物はまた、当該技術分野において既知のいくつかの方法のうちいずれかにより調製され得るリポソームを含んでよい。例えば、Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692；欧州特許出願公開第EP036,676号；第EP088,046号及び第EP143,949号を参照し、これらは参照によって組み込まれる。

【0149】

インビボ投与に使用される医薬組成物は、典型的には滅菌調製物として提供される。滅菌は、滅菌濾過膜に通して濾過することにより行われ得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥及び再構成の前または後のいずれかに実施されてよい。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態で、または溶液中に保存され得る。非経口組成物は、一般に滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針により刺し通し可能な栓を有する静脈内輸液バッグまたはバイアル中に配置される。

【0150】

本発明の態様は、自己緩衝IL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体製剤を含み、これらは、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる国際特許出願第WO06138181(A2)号（PCT/US2006/022599）に記載されているような医薬組成物として使用され得る。

【0151】

上述のように、特定の実施形態は、IL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体組成物、特にIL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体組成物に加えて、本節及び本明細書内の他の箇所に例示的に記載されているものなどの1種以上の賦形剤を含む、医薬IL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質を提供する。賦形剤は、この点に関して多様な目的、例えば、製剤の物理的、化学的、もしくは生物学的特性を調整すること、例えば、粘度の調整など、ならびにまたは本発明のプロセスを調整し、有効性を改善する、かつもしくははこのような製剤ならびに例えば、製造中、輸送中、保存中、使用前の調製中、投与中、及びその後生じるストレスによる分解及び損傷に対してプロセスを安定化させることなどのために本発明で使用され得る。

【0152】

タンパク質安定化ならびにこの点に関して有用な製剤材料及び方法に関する様々な説明

10

20

30

40

50

、例えば、Arakawa et al., 「Solvent interactions in pharmaceutical formulations,」 Pharm Res. 8 (3) : 285 - 91 (1991); Kendrick et al., 「Physical stabilization of proteins in aqueous solution,」 in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61 - 84 (2002), 及び Randolph et al., 「Surfactant - protein interactions,」 Pharm Biotechnol. 13: 159 - 75 (2002) などが、その各々全体が参照によって本明細書に組み込まれて、特に本発明に従う自己緩衝タンパク質製剤のための賦形剤及びそのプロセスに関する部分において、特に獣医学的用途及び/またはヒト医学的用途のタンパク質医薬製品及びプロセスに関して利用可能である。

10

【0153】

塩は、本発明の特定の実施形態に従って、例えば、製剤のイオン強度及び/もしくは等張性を調整するために、かつ/または本発明に従う組成物のタンパク質もしくはその他の成分の溶解度及び/もしくは物理的安定性を改善するために使用されてよい。

【0154】

周知の通り、イオンは、タンパク質の表面上で荷電残基に結合することにより、ならびにタンパク質中の荷電基及び極性基を遮蔽して、それらの静電相互作用、引力相互作用、及び反発相互作用の強度を減少させることによりタンパク質の天然状態を安定化し得る。イオンはまた、特にタンパク質の変性ペプチド結合(-CONH)に結合することにより、タンパク質の変性状態を安定化し得る。さらに、タンパク質中の荷電基及び極性基とのイオン相互作用もまた、分子間静電相互作用を減少させて、それによってタンパク質の凝集及び不溶性を防止または減少させることができる。

20

【0155】

イオン種は、タンパク質に対するそれらの効果の点で有意に異なる。イオン及びタンパク質に対するそれらの効果に関する多数のカテゴリー別順位が開発されていて、本発明に従って医薬組成物を製剤化する際に使用され得る。一例としてはホフマイスター系列であり、これはイオン性及び極性非イオン性溶質を、溶液中のタンパク質のコンフォメーション安定性に対するそれらの効果により順位付けする。安定化溶質は、「コスモトロピック」と称される。不安定化溶質は、「カオトロピック」と称される。コスモトロブは、溶液からタンパク質を沈殿させる(「塩析」)ために高濃度(例えば、>1モルの硫酸アンモニウム)で一般的に使用される。カオトロブは、タンパク質を変性かつ/または可溶化させる(「塩溶」)ために一般的に使用される。「塩溶」及び「塩析」するためのイオンの相対的有効性は、ホフマイスター系列におけるそれらの位置を規定する。

30

【0156】

遊離アミノ酸は、本発明の様々な実施形態に従ってIL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体製剤に、増量剤、安定剤、及び抗酸化剤、加えてその他の標準的な用途として使用され得る。リジン、プロリン、セリン、及びアラニンは、製剤中のタンパク質を安定化するために使用され得る。グリシンは、正確なケーキ構造及び特性を確保するために凍結乾燥において有用である。アルギニンは、液体製剤及び凍結乾燥製剤の両方で、タンパク質凝集を阻害するために有用であってよい。メチオニンは、抗酸化剤として有用である。

40

【0157】

ポリオールとしては、糖、例えば、マンニトール、スクロース、及びソルビトールならびに多価アルコール、例えば、グリセロール及びプロピレングリコールなど、ならびに本明細書における考察の目的で、ポリエチレングリコール(PEG)及び関連物質が挙げられる。ポリオールは、コスモトロピックである。それらは、物理的及び化学的分解プロセスからタンパク質を保護するために、液体製剤及び凍結乾燥製剤の両方で有用な安定化剤である。ポリオールはまた、製剤の張度を調整するのに有用である。

50

【 0 1 5 8 】

ポリオールの中でも、本発明の選択実施形態において有用なものはマンニトールであり、これは凍結乾燥製剤においてケーキの構造安定性を確保するために一般的に使用される。マンニトールは、ケーキの構造安定性を確保する。マンニトールは、一般にリオプロテクタント、例えば、スクロースと共に使用される。ソルビトール及びスクロースは、好ましい薬剤の中でも、張度を調節するための薬剤、及び輸送中の凍結融解ストレスまたは製造プロセス中のバルクの調製から保護するための安定剤として好ましい薬剤である。還元糖（遊離アルデヒドまたはケトン基を含有する）、例えば、グルコース及びラクトースなどは、表面のリジン残基及びアルギニン残基を糖化し得る。したがって、それらは、一般に本発明に従った使用に好ましいポリオールの中には入らない。加えて、このような反応種を形成する糖、例えばスクロースなども、酸性条件下でフルクトース及びグルコースへと加水分解され、結果として糖化を引き起こし、この点に関して本発明の好ましいポリオールの中には入らない。PEGは、タンパク質を安定化するために、及びクライオプロテクタントとして有用であり、この点に関して本発明で使用され得る。

10

【 0 1 5 9 】

IL - 2 変異タンパク質及び/または抗IL - 2 抗体製剤の実施形態は、界面活性剤をさらに含む。タンパク質分子は、表面上での吸着ならびに気 - 液、固 - 液、及び液 - 液界面における変性及び結果として生じる凝集の影響を受けやすい場合がある。これらの効果は、一般にタンパク質濃度に反比例して増減する。これらの有害な相互作用は、一般にタンパク質濃度に反比例して増減し、典型的には物理的攪拌、例えば、製品の輸送及び取り扱い中に生じた攪拌などにより悪化する。

20

【 0 1 6 0 】

界面活性剤は、表面吸着を防止する、最小限に抑える、または減少させるために日常的に使用される。この点に関して本発明で有用な界面活性剤としては、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ソルビタンポリエトキシレートその他の脂肪酸エステル、及びポロキサマー188が挙げられる。

【 0 1 6 1 】

界面活性剤はまた、タンパク質のコンフォメーション安定性を制御するためにも一般的に使用される。この点に関して界面活性剤の使用は、タンパク質特異的であり、その理由とは、任意の所与の界面活性剤が、典型的にはあるタンパク質を安定化し、その他のタンパク質を不安定化するだろうからである。

30

【 0 1 6 2 】

ポリソルベートは酸化分解の影響を受けやすく、供給される場合、タンパク質残基側鎖、特にメチオニンの酸化を引き起こすのに十分な過酸化物量を多くの場合に含有する。結果として、ポリソルベートは慎重に使用されるべきであり、使用される場合、それらの最低有効濃度で用いられるべきである。この点に関して、ポリソルベートは、賦形剤がそれらの最低有効濃度で使用されるべきであるという原則を例示している。

【 0 1 6 3 】

IL - 2 変異タンパク質または抗IL - 2 抗体製剤の実施形態は、1種以上の抗酸化剤をさらに含む。タンパク質の有害な酸化は、医薬製剤において周囲酸素及び周囲温度の適切なレベルを維持することにより、かつ光への曝露を回避することにより、ある程度まで防止され得る。抗酸化賦形剤も同様に、タンパク質の酸化分解を防止するために使用され得る。この点に関して有用な抗酸化剤の中には、還元剤、酸素/フリーラジカルスカベンジャー、及びキレート剤がある。本発明に従う治療用タンパク質製剤に使用するための抗酸化剤は、好ましくは水溶性であり、製品の有効期限全体を通してそれらの活性を維持する。EDTAが、この点に関して本発明に従った好ましい抗酸化剤である。

40

【 0 1 6 4 】

抗酸化剤は、タンパク質を損傷し得る。例えば、特にグルタチオンなどの還元剤は、分子内ジスルフィド結合を破壊し得る。したがって、本発明に使用するための抗酸化剤は、とりわけ、それら自体が製剤中のタンパク質を損傷する可能性を排除または十分に減少さ

50

せるように選択される。

【0165】

本発明に従う製剤は、タンパク質補因子であり、かつタンパク質配位錯体を形成するのに必要な、例えば、特定のインスリン懸濁液を形成するのに必要な亜鉛などの金属イオンを含んでよい。金属イオンはまた、タンパク質を分解するいくつかのプロセスを阻害し得る。しかしながら、金属イオンはまた、タンパク質を分解する物理的及び化学的プロセスも触媒する。

【0166】

マグネシウムイオン ($10 \sim 120 \text{ mM}$) は、イソアスパラギン酸へのアスパラギン酸の異性化を阻害するために使用され得る。 Ca^{+2} イオン (最大 100 mM) は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼの安定性を増加し得る。しかしながら、 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 、及び Zn^{+2} は、 r h D N a s e を不安定化し得る。同様に、 Ca^{+2} 及び Sr^{+2} は、第 V I I 因子を安定化し得、これは Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 及び Zn^{+2} 、 Cu^{+2} ならびに Fe^{+2} により不安定化され得、その凝集は Al^{+3} イオンにより増加され得る。

【0167】

I L - 2 変異タンパク質または抗 I L - 2 抗体製剤の実施形態は、1 種以上の防腐剤をさらに含む。防腐剤は、同じ容器からの 2 回以上の抽出を伴う、複数回用量の非経口製剤を開発する場合に必要である。それらの主な機能は、微生物の増殖を阻害し、医薬品の有効期限または使用期間全体を通して製品の無菌性を確保することである。一般的に使用される防腐剤としては、ベンジルアルコール、フェノール及び m - クレゾールが挙げられる。防腐剤は、小分子非経口剤と共に使用されるという長い歴史を有するが、防腐剤を含むタンパク質製剤の開発は困難であり得る。防腐剤は、ほぼ必ずタンパク質に対して不安定化効果 (凝集) を有し、これは複数回用量のタンパク質製剤におけるそれらの使用を制限する主な要因となっている。今日まで、ほとんどのタンパク質薬物は、単回使用のみのために製剤化されてきた。しかしながら、複数回用量製剤が可能な場合、それらは、患者の利便性、及び市場性の増加を可能にするというさらなる利点を有する。好例は、ヒト成長ホルモン (h G H) の例であり、保存製剤の開発により、より利便性の高い複数回使用注射ペンの提案が商品化につながった。h G H の保存製剤を含有する少なくとも 4 本のこのようなペンデバイスは、現在市場で入手可能である。Norditropin (液体、Novo Nordisk)、Nutropin AQ (液体、Genentech) 及び Genotropin (凍結乾燥 - デュアルチャンバカートリッジ、Pharmacia & Upjohn) がフェノールを含有する一方で、Somatropo (Eli Lilly) は、m - クレゾールを用いて製剤化される。

【0168】

一実施形態では、I L - 2 変異タンパク質または I L - 2 変異タンパク質の F c 融合体、例えば、F c . I L - 2 (H16T)、F c . I L - 2 (H16K)、F c . I L - 2 (H16R)、F c . I L - 2 (L19N)、F c . I L - 2 (L19D)、F c . I L - 2 (D20E)、F c . I L - 2 (D20G)、F c . I L - 2 (D20T)、F c . I L - 2 (N88D)、F c . I L - 2 (N88R)、F c . I L - 2 (N88S)、F c . I L - 2 (V91D)、F c . I L - 2 (V91G)、F c . I L - 2 (V91K)、または F c . I L - 2 (V91S) などは、pH 5.2 で、 10 mM の L - グルタミン酸、 3.0% (w/v) の L - プロリン中において 10 mg/mL に製剤化される。別の実施形態では、I L - 2 変異タンパク質または I L - 2 変異タンパク質の F c 融合体、例えば、F c . I L - 2 (H16T)、F c . I L - 2 (H16K)、F c . I L - 2 (H16R)、F c . I L - 2 (L19N)、F c . I L - 2 (L19D)、F c . I L - 2 (D20E)、F c . I L - 2 (D20G)、F c . I L - 2 (D20T)、F c . I L - 2 (N88D)、F c . I L - 2 (N88R)、F c . I L - 2 (N88S)、F c . I L - 2 (V91D)、F c . I L - 2 (V91G)、F c . I L - 2 (V91K)、または F c . I L - 2 (V91S) などは、pH 7.6 で、 10 mM の K P i、 161 mM の L - アルギニン中で製剤化される。

【 0 1 6 9 】

いくつかの態様は、保存剤形の製剤化及び開発中に考慮される必要がある。医薬品中の有効防腐剤濃度が最適化されなければならない。これは、タンパク質の安定性を損なうことなく、抗菌有効性を付与する濃度範囲を有する剤形の所与の防腐剤を試験することを必要とする。

【 0 1 7 0 】

別の態様では、本発明は、IL - 2 変異タンパク質、抗 IL - 2 抗体、または IL - 2 変異タンパク質のFc融合体を凍結乾燥製剤で提供する。凍結乾燥製品は、防腐剤なしで凍結乾燥されて、使用時に防腐剤を含有する希釈剤で再構成され得る。これにより、防腐剤がタンパク質と接触している時間が短縮されて、付随する安定性リスクを有意に最小限に抑える。液体製剤では、防腐剤の有効性及び安定性が、製品の有効期限（約18～24か月）全体にわたって維持されるべきである。留意すべき重要な点は、防腐剤の有効性が、活性薬物及び全ての賦形剤成分を含有する最終製剤において実証されるべきであるということである。

10

【 0 1 7 1 】

IL - 2 変異タンパク質または抗 IL - 2 抗体製剤は一般に、特定の投与経路及び投与方法のために、特定の投与量及び投与頻度のために、特定の疾患における特定の治療のために、とりわけ、バイオアベイラビリティ及び持続性の範囲で設計されるだろう。したがって、製剤は、任意の好適な経路、例えば、これらに限定されないが、経口的、経耳的、経眼的、経直腸的、及び経腔的を含む経路による、ならびに非経口経路、例えば、静脈内及び動脈内注射、筋肉注射、ならびに皮下注射を含む経路による送達のために本発明に従って設計されてよい。

20

【 0 1 7 2 】

医薬組成物が製剤化されると、それは溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、結晶として、または脱水粉末もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアル中に保存されてよい。このような製剤は、すぐに使用できる形態または投与前に再構成される形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかで保存されてよい。本発明はまた、単回用量投与単位を作製するためのキットも提供する。本発明のキットは各々、乾燥タンパク質を有する第1容器及び水性製剤を有する第2容器の両方を含有してよい。本発明の特定の実施形態では、シングルチャンバー及びマルチチャンバーのプレフィルドシリンジ（例えば、液体シリンジ及びリオシリンジ）を含有するキットが提供される。

30

【 0 1 7 3 】

用いられるIL - 2 変異タンパク質または抗 IL - 2 抗体を含有する医薬組成物の治療有効量は、例えば、治療内容及び目的に依存するだろう。当業者は、処置に適切な投与量レベルが、送達される分子、IL - 2 変異タンパク質または抗 IL - 2 抗体が使用されている適応症、投与経路、ならびに患者のサイズ（体重、体表面もしくは器官サイズ）ならびに／または状態（年齢及び全身の健康状態）に部分的に応じて変動するだろうことを理解するだろう。特定の実施形態では、臨床医は、最適な治療効果を得るために投与量を滴定し、投与経路を変更してよい。典型的な投与量は、上述の要因に応じて、約0.1 µg / kg ~ 最大約1 mg / kg の範囲またはそれを超えてもよい。具体的な実施形態では、投与量は、0.5 µg / kg ~ 最大約100 µg / kg、場合により2.5 µg / kg ~ 最大約50 µg / kg の範囲であってよい。

40

【 0 1 7 4 】

治療有効量のIL - 2 変異タンパク質または抗 IL - 2 抗体は、好ましくは疾患症状の重症度の減少、疾患無症状期間の頻度もしくは期間の増加、または疾患の苦痛による損傷もしくは障害の予防をもたらす。

【 0 1 7 5 】

医薬組成物は、医療デバイスを使用して投与されてよい。医薬組成物を投与するための医療デバイスの例は、米国特許第4,475,196号；第4,439,196号；第4,447,224号；第4,447,233号；第4,486,194号；第4,487

50

、603号；第4,596,556号；第4,790,824号；第4,941,880号；第5,064,413号；第5,312,335号；第5,312,335号；第5,383,851号；及び第5,399,163号に記載されていて、これらは全て参照によって本明細書に組み込まれる。

【0176】

一実施形態では、医薬組成物は、を含むものが提供される。

【0177】

自己免疫障害または炎症性障害の処置方法

特定の実施形態では、本発明のIL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体は、自己免疫障害または炎症性障害を処置するために使用される。好ましい実施形態では、IL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質が使用される。

10

【0178】

本明細書に開示されるIL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体を用いた処置に特に適している障害としては、炎症、自己免疫疾患、アトピー性疾患、腫瘍随伴性自己免疫疾患、軟骨炎症、関節炎、関節リウマチ、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、SEA症候群（血清反応陰性、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、若年性血管炎、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、SEA症候群（血清反応陰性、腱付着部症、関節症症候群）、皮膚筋炎、乾癬性関節炎、強皮症、血管炎、ミオリチス（myolitis）、多発性ミオリチス（polymyolitis）、皮膚ミオリチス（dermatomyolitis）、結節性多発動脈炎、ウェグナー肉芽腫症、動脈炎、リウマチ性プロイ筋痛症（polymyalgia rheumatica）、サルコイドーシス、硬化症、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、シェーグレン症候群、乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、逆乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、アテローム性動脈硬化症、ループス、スティル病、全身性エリテマトーデス（SLE）、重症筋無力症、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、多発性硬化症（MS）、喘息、COPD、鼻副鼻腔炎、ポリープを伴う鼻副鼻腔炎、好酸球性食道炎、好酸球性気管支炎、ギラン・バレー病、I型糖尿病、甲状腺炎（例えば、グレーブス病）、アジソン病、レイノー現象、自己免疫性肝炎、GVHD、移植拒絶、腎障害、C型肝炎誘発性血管炎、自然流産などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0179】

好ましい実施形態では、自己免疫障害または炎症性障害は、ループス、移植片対宿主病、C型肝炎誘発性血管炎、I型糖尿病、多発性硬化症、自然流産、アトピー性疾患、及び炎症性腸疾患である。

【0180】

別の実施形態では、自己免疫障害または炎症性障害を有する、またはそれを発症するリスクのある患者は、IL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体（例えば、本明細書に開示されるIL-2変異タンパク質、例えば、本明細書に開示されるようなIL-2変異タンパク質Fc融合体など、または当該技術分野において既知の別のIL-2変異タンパク質もしくは野生型IL-2を、場合により本明細書に記載される種類のFc融合分子の一部として）を用いて処置されて、その処置に対する患者の応答がモニターされる。モニターされる患者の応答は、処置に対するいずれの検出可能もしくは測定可能な患者の応答でも、またはこのような応答のいずれの組合せでもあり得る。例えば、応答は、患者の生理学的状態、例えば、体温または発熱、欲求、発汗、頭痛、悪心、疲労、空腹、口渇、精神的鋭敏さなどの変化であり得る。あるいは、応答は、例えば、患者から採取した末梢血試料中の細胞型または遺伝子産物（例えば、タンパク質、ペプチド、もしくは核酸）の量の変化であり得る。一実施形態では、患者の処置レジメンは、患者が処置に対する検出可

40

50

能もしくは測定可能な応答を有する場合、またはこのような応答が特定の閾値を超える場合に変更される。この変更は、投薬頻度の減少もしくは増加、または1用量あたりに投与されるIL-2変異タンパク質もしくは抗IL-2抗体の量の減少もしくは増加、または投薬の「休止」(すなわち、特定の期間、もしくは処置を行う医師が処置を継続すべきであると決定するまで、もしくはモニターされる患者の応答が処置を再開すべき、もしくは再開できると示すまでのいずれかにおける一時的な処置の中断)、または処置の終了であり得る。一実施形態では、応答は、患者の体温またはCRPレベルの変化である。例えば、応答は、患者の体温上昇、もしくは末梢血試料中のCRPレベルの上昇、またはその両方であり得る。特定の一実施形態では、患者の処置は、処置過程に患者の体温が、少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、1、1.5、2、または2.5上昇する場合に減少される、一時中断される、または終了される。別の特定の実施形態では、患者の処置は、処置過程に患者の末梢血試料中におけるCRPの濃度が、少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、1、1.5、または2mg/mL上昇する場合に減少される、一時中断される、または終了される。処置を変更、減少、一時中断、または終了するか否かを決定する上でモニターかつ使用され得るその他の患者反応としては、毛細管漏出症候群(低血圧及び心血管不安定)の発症もしくは悪化、好中球機能障害(例えば、感染の発症もしくは悪化をもたらす、もしくは検出される)、血小板減少症、血栓性血管症、注射部位反応、血管炎(C型肝炎ウイルス血管炎など)、または炎症症状もしくは疾患が挙げられる。処置を変更、減少、増加、一時中断、または終了するか否かを決定する上でモニターかつ使用され得るさらなる患者反応としては、NK細胞、Treg細胞、FOXP3⁻CD4⁺T細胞、FOXP3⁺CD4⁺T細胞、FOXP3⁻CD8⁺T細胞、または好酸球の数の増加が挙げられる。これらの細胞型の増加は、例えば、末梢血の単位当たりのこのような細胞数の増加として(例えば、血液1ミリリットル当たりの細胞の増加として表される)、または血液試料中における別の細胞型(複数可)と比較したこのような細胞型の割合の増加として検出され得る。モニターされ得る別の患者反応は、患者の末梢血試料中のCD25⁺細胞上に細胞表面結合したIL-2変異タンパク質または抗IL-2抗体の量の増加である。

【0181】

Treg細胞の増殖方法

IL-2変異タンパク質、抗IL-2抗体、またはIL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質は、対象または試料中のTreg細胞を増殖するために使用されてよい。非制御性T細胞に対するTregの比率を増加させる方法が、本明細書で提供される。本方法は、T細胞集団を有効量のヒトIL-2変異タンパク質、抗IL-2抗体またはIL-2変異タンパク質Fc融合体と接触させることを含む。比率は、T細胞集団内のCD3⁺FOXP3⁻細胞に対するCD3⁺FOXP3⁺細胞の比率を決定することにより測定されてよい。ヒト血液中の典型的なTreg頻度は、全CD4⁺CD3⁺T細胞の5~10%であるが、上に列挙された疾患では、この割合がより低いまたはより高い場合がある。好ましい実施形態では、Tregの割合は、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、少なくとも600%、少なくとも700%、少なくとも800%、少なくとも900%、または少なくとも1000%増加する。Tregの最大増加倍率は、特定の疾患ごとに異なる場合があるが; IL-2変異タンパク質処置により得られる可能性のある最大Treg頻度は、全CD4⁺CD3⁺T細胞の50%または60%である。特定の実施形態では、IL-2変異タンパク質、抗IL-2抗体、またはIL-2変異タンパク質Fc融合タンパク質が対象に投与されると、対象の末梢血中の非制御性T細胞に対する制御性T細胞(Treg)の比率が増加する。

【0182】

IL-2変異タンパク質、抗IL-2抗体、及びIL-2変異タンパク質Fc融合タン

10

20

30

40

50

パク質は、その他の細胞型よりもT r e gを選択的に増殖させるため、それらは対象の末梢血中におけるナチュラルキラー（NK）細胞に対する制御性T細胞（T r e g）の比率を増加させるためにも有用である。比率は、C D 1 9 - 及びC D 3 - であるC D 1 6 + 及び/またはC D 5 6 + リンパ球に対するC D 3 + F O X P 3 + 細胞の比率を決定することにより測定されてよい。

【 0 1 8 3 】

I L - 2 変異タンパク質、抗 I L - 2 抗体、または I L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質は、患者の末梢血中の非制御性T細胞またはNK細胞に対するT r e gの比率を有意に増加させることなく、患者内の疾患または障害に対して治療効果を有する場合があると考えられる。治療効果は、炎症部位または自己免疫部位におけるI L - 2 変異タンパク質、抗 I L - 2 抗体、またはI L - 2 変異タンパク質 F c 融合タンパク質の局所活性に起因する場合がある。

【実施例】

【 0 1 8 4 】

実際の、かつ予測の両方である以下の実施例は、本発明の特定の実施形態または特徴を例証する目的で提供され、その範囲を限定することを意図するものではない。

【 0 1 8 5 】

実施例 1 - C D 2 5 に対して高い親和性を付与する変異数を減少させること

C D 2 5 に対する親和性が高く、I L - 2 R によるシグナル伝達強度が低いI L - 2 変異タンパク質は、T r e gの増殖及び機能を選択的に促進する。潜在的な免疫原性を減少させるために、C D 2 5 に対して高い親和性を達成するのに必要な変異の最小数を求めた。その3つの受容体と複合したI L - 2 (P D Bコード - 2 B 5 I) の結晶構造は、V 6 9 A 及びQ 7 4 P がC D 2 5 と相互作用するヘリックス構造内に位置していることを示す。このことは、なぜV 6 9 A 及びQ 7 4 P が、高いC D 2 5 結合親和性についての2つの独立したI L - 2 変異誘発スクリーニングにおいて頻繁に単離されたのかを説明する可能性がある(R a o e t a l . 2 0 0 5 ; T h a n o s e t a l . 2 0 0 6) 。本実施例では、R a o らのスクリーニングで同定されたI L - 2 変異タンパク質「2 - 4」の他方の変異のうち、どれがV 6 9 A 及びQ 7 4 P 単独で観察された親和性を超えてそれを増加させるのに最も重要であるかを調査する。以下のタンパク質を、活性化T細胞の表面上におけるC D 2 5 への結合についてフローサイトメトリーによりスクリーニングした。全ての構築物は、精製及び検出のためにC末端F L A G 及びポリ - H i s タグも含んだ。特定の変異を丸括弧内に提供する。

H a M u t 1 D (V 6 9 A 、 Q 7 4 P 、 N 8 8 D 、 C 1 2 5 A) (配列番号 8)

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

H a M u t 2 D (N 3 0 S 、 V 6 9 A 、 Q 7 4 P 、 N 8 8 D 、 C 1 2 5 A) (配列番号 9)

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

H a M u t 3 D (K 3 5 R 、 V 6 9 A 、 Q 7 4 P 、 N 8 8 D 、 C 1 2 5 A) (配列番号 1 0)

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

H a M u t 4 D (T 3 7 A 、 V 6 9 A 、 Q 7 4 P 、 N 8 8 D 、 C 1 2 5 A) (配列番号 1 1)

10

20

30

40

50

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

HaMut 5D (K 4 8 E、V 6 9 A、Q 7 4 P、N 8 8 D、C 1 2 5 A) (配列番号 1
2)

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

HaMut 6D (E 6 8 D、V 6 9 A、Q 7 4 P、N 8 8 D、C 1 2 5 A) (配列番号 1
3)

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

HaMut 7D (N 7 1 R、V 6 9 A、Q 7 4 P、N 8 8 D、C 1 2 5 A) (配列番号 1
4)

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

HaMut 8D (K 3 5 R、K 4 8 E、E 6 8 D、N 8 8 D、C 1 2 5 A) (配列番号 1
5)

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

【0186】

HaMut 7Dが、元の分離物「2 - 4」(約200 pM)とほぼ同じ親和性でCD 2
5に結合したため、変異N 7 1 Rは、V 6 9 A、Q 7 4 P単独(HaMut 1D、約2 n
M)で観察された親和性を大きく超えて親和性を増加させることができたことを示してい
る。他方の構築物は、HaMut 8Dの親和性がWT IL - 2の親和性よりもわずかに
高かったことだけを除けば、HaMut 1Dと同様の、またはそれよりもわずかに高い親
和性を有していた。

【0187】

実施例 2 - 半減期改善のためにIgG 1 - Fcドメインに融合されたIL - 2 変異タンパ
ク質

IL - 2 変異タンパク質を用いたTreg濃縮を達成するのに必要な投薬頻度を減少さ
せるために、IL - 2とIgG 1 - Fcドメインとの間の様々な融合体を評価した。Fc
ドメインは、IgG 1により媒介されるエフェクター機能、例えば、標的細胞溶解などを
無効にする点変異を含有していた。利用されたFcエフェクター機能変異は、A 3 2 7 Q
、A 1 a A 1 a (L 2 3 4 A + L 2 3 5 A)またはN 2 9 7 Gのいずれかであった。T
reg選択的IL - 2 変異タンパク質は、IL - 2 効力を一部減少させるため、IL - 2
Rシグナル伝達に有意に影響を及ぼすことのないような方法でIL - 2をFcに融合する
ことが重要であった。したがって、Fc融合を含む場合と含まない場合のIL - 2 変異タ
ンパク質をIL - 2 R活性化について試験した。

【0188】

Fc融合によるIL - 2二量体化が、IL - 2 Rに対するアビディティ増加によってIL
- 2 Rシグナル伝達強度を増加させるかどうかを決定するために、より弱いIL - 2 変

10

20

30

40

50

異タンパク質 (h a D 5) (U S 2 0 1 1 0 2 7 4 6 5 0) を、G G G G S (配列番号 5) リンカー配列により分離した F c のアミノ末端に融合した。この変異タンパク質は、I L - 2 R シグナル伝達に影響を及ぼす 3 つの変異 (E 1 5 Q、H 1 6 N、N 8 8 D)、C D 2 5 に対する高い親和性を付与する 8 つの変異 (N 2 9 S、Y 3 1 H、K 3 5 R、T 3 7 A、K 4 8 E、V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P) (R a o e t a l . 2 0 0 5)、ならびにシステイン誤対合及び凝集を防止する C 1 2 5 S を有していた。このような手法による F c への融合は、h a D 5 の生物活性を完全に無効にする一方で、細胞表面 C D 2 5 に対するその高親和性結合が増強されて、恐らくこれは二量体化によるアビディティ増加に起因していた。

【 0 1 8 9 】

I L - 2 変異タンパク質を F c ヘテロ二量体の N 末端または C 末端のいずれかにも融合し、その結果、F c 二量体の一方の鎖のみが I L - 2 ドメインを持つようにした。2 つの非対称 F c 鎖間のヘテロ二量体対合を、一方の F c 鎖上に導入したリジンと他方の F c 鎖上に導入したアスパラギン酸との間の静電相互作用により促進した。I L - 2 変異タンパク質 h a D 6 を一方の F c 鎖または他方の F c 鎖の N 末端に融合し、1 つの配置が好ましかった場合に、h a D 6 . F c D D 及び h a D 6 . F c K K と称される 2 つのタンパク質構築物を得た。変異タンパク質 h a M u t 7 D も、1 つまたは 2 つの G G G G S (配列番号 5) リンカーを用いて F c ヘテロ二量体の C 末端に融合した (F c K K (G 4 S) h a M u t 7 D、F c K K (G 4 S) 2 h a M u t 7 D)。I L - 2 変異タンパク質 h a D 6 と F c ヘテロ二量体の N 末端との融合は、p S T A T 5 及び T 細胞増殖実験の両方において遊離 h a D 6 と比較して活性の部分的な損失をもたらした。対照的に、1 つまたは 2 つのいずれかの G G G G S (配列番号 5) リンカーを用いた h a M u t 7 D と F c ヘテロ二量体の C 末端との融合は、h a M u t 7 D の効力を変化させなかった。

【 0 1 9 0 】

I L - 2 変異タンパク質と F c ホモ二量体の C 末端との融合についても調査した。全 P B M C を、T 7 5 組織培養フラスコ中において 1 0 0 m l 当たり 3 億個の細胞で、1 0 0 n g / m l の抗 C D 3 (O K T 3) を用いて活性化した。培養 3 日目に、細胞を 3 回洗浄し、新鮮な培地中で 3 日間静止させた。次いで、細胞を、I L - 2 バリエーションを用いて 5 0 μ l の最終体積において 1 p M ~ 1 0 n M の範囲の 1 0 \times 用量滴定で刺激した。S T A T 5 リン酸化のレベルを、B D p h o s p h o r e 緩衝液キットを使用して測定した。簡潔に述べると、1 m l の B D 溶解 / 固定 p h o s p h o r e 緩衝液を添加して刺激を停止させた。細胞を 3 7 $^{\circ}$ C で 2 0 分間固定し、氷上で 1 \times B D p h o s p h o r e p e r m 緩衝液を用いて透過処理した後に C D 4、C D 2 5、F O X P 3 及び p S T A T 5 について染色した。

【 0 1 9 1 】

図 1 に見ることができるように、変異タンパク質 h a M u t 1 D 及び h a M u t 7 D の生物活性は、F c ホモ二量体の C 末端への融合によって変化しなかった。したがって、I L - 2 の N 末端と F c の C 末端との間の融合は、F c . I L - 2 ホモ二量体との関連であっても I L - 2 変異タンパク質のアゴニスト活性を損なうことはなかった。これらの構築物では、製造性改善のために C 1 2 5 S の代わりに C 1 2 5 A 変異を使用した。

【 0 1 9 2 】

実施例 3 - 選択的 T r e g 増殖を達成するように I L - 2 変異タンパク質効力を調整すること

I L - 2 変異タンパク質の最初のパネルは、N 8 8 D を単独で、または I L - 2 R シグナル伝達に影響を及ぼす 1 つもしくは 2 つのさらなる変異と共に含有した。変異タンパク質の第 2 パネルは、N 8 8 D 系列のものと同様の、またはそれよりもわずかに強力なアゴニズムのいずれかを有する変異タンパク質を同定することを目指して、全て単一の点変異を有するように設計した。2 4 のシグナル伝達変異のパネルを、予測した I L - 2 R と相互作用するアミノ酸 (結晶構造、P D B コード - 2 B 5 I) に基づいて同定した。特定の置換を、変異タンパク質と I L - 2 R との間の結合自由エネルギーの予測した減少

10

20

30

40

50

に基づいて選択した。結合自由エネルギーを、E G A D 計算アルゴリズム (H a n d e l ' s L a b o r a t o r y、米国、サンディエゴのカリフォルニア大学) を使用して算出した。変異体の結合自由エネルギーを、 $G_{mut} = \mu (G_{mut} - G_{wt})$ と定義する。式中、 μ (一般に $= 0.1$) は、実験的エネルギーと比較する場合、1 の勾配を有するように結合親和性の予測した変化を正規化するために使用されるスケーリング係数である (P o k a l a a n d H a n d e l 2005)。解離の自由エネルギー (G) を、複合状態 ($G_{結合}$) と自由状態 ($G_{自由}$) との間のエネルギー差として定義した。解離エネルギー G_{mut} を、各置換について算出した。

【0193】

以下の置換 (H 1 6 E、H 1 6 Q、L 1 9 K、D 2 0 R、D 2 0 K、D 2 0 H、D 2 0 Y、M 2 3 H、D 8 4 K、D 8 4 H、S 8 7 Y、N 8 8 D、N 8 8 K、N 8 8 I、N 8 8 H、N 8 8 Y、V 9 1 N、V 9 1 K、V 9 1 H、V 9 1 R、I 9 2 H、E 9 5 K、E 9 5 R、または E 9 5 I) を有する I L - 2 変異タンパク質のパネルを、F c ヘテロ二量体への C 末端融合体として発現させた。これらの構築物はまた、高い C D 2 5 結合親和性のための h a M u t 7 変異 (V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P) 及び効率的なフォールディングのための C 1 2 5 A も含有した。

10

【0194】

パネルを、実施例 2 の T 細胞 S T A T 5 リン酸化アッセイで効力についてスクリーニングすると、H 1 6 E、D 8 4 K、V 9 1 N、V 9 1 K、及び V 9 1 R が、野生型 I L - 2 よりも低く、N 8 8 D よりも高い活性を有することが見出された (図 2)。

20

【0195】

H 1 6 E、D 8 4 K、V 9 1 N、V 9 1 K、及び V 9 1 R は、野生型 I L - 2 よりも低く、N 8 8 D よりも高い活性を有していた。

【0196】

選択した変異タンパク質を、T 細胞及び NK 増殖アッセイにおいても試験した。

【0197】

T 細胞アッセイについては、全 P B M C を、1 0 0 n g の O K T 3 を用いて 3 0 0 万 / m l で活性化した。2 日目に、細胞を 3 回洗浄し、新鮮な培地中で 5 日間静止させた。次いで、細胞を C F S E で標識し、2 4 ウェルプレートにおいて 5 0 万 / ウェルで、F A C S 分析前に 7 日間 I L - 2 含有培地中でさらに培養した。T 細胞サブセットの増殖を、C F S E 希釈物 (中央 C F S E 蛍光) として図 3 に提示する。

30

【0198】

N K 細胞アッセイについては、M A C S 選別 C D 1 6 + N K 細胞を、I L - 2 含有培地中で 3 日間、1 0 万 / ウェルで 9 6 ウェルプレート中において培養した。0 . 5 μ C i の 3 H - チミジンを、インキュベーションの最後の 1 8 時間中に各ウェルに添加した。結果を図 4 に示す。

【0199】

変異体の H 1 6 E、D 8 4 K、V 9 1 N、V 9 1 K、及び V 9 1 R 変異体は、W T I L - 2 と同様に T r e g 増殖を刺激することができたが、その他の T 細胞に対する効力はおおよそ 1 0 \times 低く (図 3)、N K 細胞に対する効力はおおよそ 1 0 0 \times 低かった (図 4)。

40

【0200】

F c . I L - 2 融合タンパク質の別個のパネルを設計し、この中で、F c ヘテロ二量体と変異タンパク質 h a M u t 7 (V 6 9 A、N 7 1 R、Q 7 4 P、C 1 2 5 A) との間の距離を、一連の個々のアミノ酸切断により縮小した。

【0201】

【化 2】

Fc.haMut7 Fc...TQKSLSLSPGKGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7
(配列番号：22)

Trunc1 Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：23)

Trunc2 Fc...TQKSLSL-STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：24)

Trunc3 Fc...TQKSLSL--TKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：25)

Trunc4 Fc...TQKSLSL---KKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：26)

Trunc5 Fc...TQKSLSL----KTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：27)

Trunc6 Fc...TQKSLSL-----TQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：28)

Trunc7 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：29)

Trunc8 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (配列番号：30)

10

20

【0202】

Trunc1～Trunc4は、図2、図3、及び図4に記載されるように、STAT5リン酸化により、ならびにT細胞及びNK細胞増殖により測定した場合、全長親構築物Fc.haMut7と等しい効力を有していた。Trunc5及びTrunc6は、より弱い応答ではあったが、N88D変異(haD及びhaMut7D)により刺激されるものよりも強く、V91Kにより刺激されるものと非常に類似した応答を刺激した。Trunc7は、N88D変異タンパク質よりも弱く、Trunc8はごくわずかな活性を有した。しかしながら、NK細胞上で試験した場合、Trunc5及びTrunc6はV91Kよりも強力なアゴニストであったため、Treg選択性が、近位Fcドメインによる立体障害ではなく、シグナル伝達変異によってより容易に達成されたことを示している。

30

【0203】

実施例4 - Fcホモ二量体との関連におけるCD25高親和性変異

高いCD25結合親和性を付与した変異は、それらがCD25-high T細胞に対する向性を増加させたため、及びそれらが長期にわたるCD25：IL-2変異タンパク質会合を促進し、シグナル伝達を延長したために有益であると考えられた。しかしながら、変異数を減少させることは、免疫原性の可能性を減少させる場合がある。haMut1高親和性変異のV69A及びQ74Pを含む場合と含まない場合のN88DまたはV91K変異タンパク質を、Fcホモ二量体のC末端に対する融合体として発現させて生物活性について比較した。pSTAT5刺激アッセイでは、ホモ二量体化は、単量体変異タンパク質と比較してシグナル強度に対して全く影響を及ぼさなかった。高親和性変異V69A及びQ74Pの復帰変異も、pSTAT5シグナル伝達に影響を及ぼさなかった。T細胞増殖アッセイでは、高親和性変異は、従来のCD4 T細胞及びCD8 T細胞に対する活性を減少させたが、制御性T細胞に対する活性は減少させなかった(図5)。高親和性変異はまた、NK細胞における増殖応答も変化させなかった(図6)。

40

【0204】

高親和性変異が、インビボでT細胞応答に影響を及ぼしたかどうかを決定するために、ヒト化マウス(ヒトCD34+造血幹細胞で再構成したNOD.SCID.I12rg-ヌルマウス)にFc.IL-2変異タンパク質融合タンパク質を投薬し、Treg増殖をモニターした。7週齢のNOD.SCID.I12rg-ヌル(NSG)マウス(Jackson Labs、バーハーバー、メイン州)に放射線を照射し(180rad)、9

50

4,000個のヒト胎児肝臓CD34⁺造血幹細胞で再構成した。21週目に、マウスを、パーセントキメラ現象の均等分布(PBLのフローサイトメトリーにより決定した)に基づいて6つの群に分配し、0日目及び7日目に、1μgの示したFc_γ変異タンパク質融合タンパク質またはPBSを皮下注射した。11日目に、血液中のT細胞サブセット頻度をフローサイトメトリーにより決定した。動物1匹当たり1μgの低用量では、高親和性変異は、N88DまたはV91K変異単独で観察した増殖を超えてTreg増殖を改善することはなかった(図7)。

【0205】

Treg増殖は、FOX P3⁺CD4⁺T細胞が、ヒトB細胞及びT細胞、ならびにマウス骨髄細胞の混合物を含む全末梢血白血球(PBL)と比較して存在量を増加させなかったという点で選択的であった。さらに、より高い用量では、高親和性変異はCD25⁺FOX P3⁺T細胞の増加を促進し、それゆえTreg選択性を減少させた。したがって、Fcホモ二量体との関連において、高親和性変異は、選択的Treg増殖を促進するのに必要であるとは見なされなかった。

【0206】

10

20

30

40

50

【化 3】

Fc. WT IgG1Fc (N297G__欠失K) : : G4S : : huIL-2 (C125A) (配列番号: 16)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVQLHQLNGLNKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMFKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIIISTLT

10

Fc. haMut1V91K IgG1Fc (N297G__欠失K) : : G4S : : huIL-2 (V69A, Q74P, V91K, C125A) (配列番号: 17)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVQLHQLNGLNKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMFKKATELKHLCLEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIIISTLT

20

Fc. V91K (またはFc. IL-2 (V91K)) IgG1Fc (N297G__欠失K) : : G4S : : huIL-2 (V91K, C125A) (配列番号: 18)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVQLHQLNGLNKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMFKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIIISTLT

30

Fc. haMut1N88D IgG1Fc (N297G__欠失K) : : G4S : : huIL-2 (V69A, Q74P, N88D, C125A) (配列番号: 19)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVQLHQLNGLNKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMFKKATELKHLCLEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLI
SDINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIIISTLT

40

F c . N 8 8 D (またはF c . I L - 2 (N 8 8 D)) I g G 1 F c (N 2 9 7 G 欠失
K) : : G 4 S : : h u I L - 2 (N 8 8 D、C 1 2 5 A) (配列番号 : 2 0)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREQYGGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNYHTQKSLSLSPG

GGGGG

AFTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTFMLTFKFTMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIISTLT

10

【 0 2 0 7 】

実施例 5 - F c . I L - 2 変異タンパク質の細胞表面 C D 2 5 長期会合

ヒト化マウス研究からの予期せぬ結果は、それらのシグナル伝達能の減少にもかかわらず、変異タンパク質が、F c . W T I L - 2 と比較してより強力な T r e g 濃縮を誘導したことであった。F c . W Tで見られるものと比較してより高い T r e g 濃縮及び F O X P 3 上方制御を、1 μ g / マウスの用量で (図 7)、及びより低用量の 0 . 5 μ g / マウスで (図 8) 観察した。このインビボでの効力増加は、T 細胞による消費の減少に起因している場合があり、より多くの F c . I L - 2 変異タンパク質を長期シグナル伝達のために利用可能にする。

20

【 0 2 0 8 】

しかしながら、インビトロ及びインビボ P K 研究では、活性化 T 細胞培養物からの上清中または投薬したマウスからの血清中において、F c . W T と比較して F c . V 9 1 K または F c . N 8 8 D の持続性が有意に増加したことを実証できなかった。F c 融合体は 2 つの I L - 2 変異タンパク質ドメインを持つため、エンドソームリサイクリングの増加が、C D 2 5 に対するアビディティ増加による長期の細胞表面会合をもたらす場合がある。事実、F c . V 9 1 K 及び F c . N 8 8 D が、融合タンパク質の短時間曝露後に、あらかじめ活性化した T 細胞の表面上で F c . W T よりも効率的に残留したことを見出した (図 9 A 及び図 9 B)。

30

【 0 2 0 9 】

初代 P B M C を、2 日間 1 0 0 n g / m l の O K T 3 で予備刺激した。細胞を採取し、4 回洗浄して、培地中で一晩静止させた。次いで、細胞を 4 0 0 p M の F c . I L - 2 で 3 0 分間、3 7 ° でパルスした。パルス後、細胞を 1 回洗浄後に T 0 で採取、または 1 2 m l の温培地中でさらに 3 回洗浄し、4 時間の培養のいずれかを行った。細胞会合 F c . I L - 2 を検出するために、細胞を抗ヒト I g G - F I T C (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h、ウェストグロープ、ペンシルベニア州) 及び抗 C D 2 5 - A P C で染色した (図 9 A)。

【 0 2 1 0 】

F c . W T と比較した、F c . V 9 1 K 及び F c . N 8 8 D を用いた I L - 2 R シグナル伝達の持続性を、同時点におけるホスホ - S T A T 5 の細胞内免疫検出により観察した。F O X P 3 + C D 4 + T 細胞のホスホ - S T A T 5 M F I を示す (図 9 B)。

40

【 0 2 1 1 】

実施例 6 - 融合配列の最適化

マウスの前臨床研究では、F c . I L - 2 変異タンパク質が、無傷の分子の血清濃度をヒト F c 部分のみの濃度と比較した場合に差次的曝露を示したことは、ヒト F c カタボライトの循環を表す。F c . I L - 2 変異タンパク質のインビボ安定性及び薬物動態を最適化するために、融合配列修飾を、体循環中、及び細網内皮系によるリサイクリング中に F c . I L - 2 変異タンパク質のタンパク質分解に与えるそれらの影響について特徴付けた。以下の構築物を、インビトロ及びインビボでのタンパク質分解について評価した。

50

【 0 2 1 2 】

【 化 4 】

(Ala_Ala)_G4S	...TQKSLSLSPGKGGGGAPTSSSTKKTQLQ...	ha7N88D	(配列番号: 31)
(N297G_欠失K)_G4S	...TQKSLSLSPG GGGGAPTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K	(配列番号: 32)
(N297G_KtoA)_AAPT	...TQKSLSLSPG APTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K	(配列番号: 33)
(N297G_KtoA)_AAPA	...TQKSLSLSPG APASSSTKKTQLQ...	ha1V91K	(配列番号: 34)

【 0 2 1 3 】

安定性を、全ヒトFcの経時的な濃度を無傷のFc・IL-2変異タンパク質の濃度と比較する定量的イムノアッセイにより測定した。Fc・IL-2変異タンパク質のタンパク質分解を、抗IL-2及び抗ヒトFc抗体を利用したウェスタンブロット分析、続いてカタボライトの免疫捕獲及び質量分析による特徴付けにより検証した。インビトロ及びインビボ試料からの(A1a_A1a)_G4Sのカタボライトにおける質量分析による特徴付けは、FcドメインのC末端Lysをタンパク質分解切断部位として同定した。FcドメインのC末端リジンの欠失または変異((N297G_欠失K)_G4S及び(N297G_KtoA)_AAPT)は、C末端リジンを含むFc構築物((A1a_A1a)_G4S)と比較して、37でマウス血清中の長期インビトロ安定性をもたらした。この長期インビトロ血清安定性は、Fc・IL-2変異タンパク質血清濃度対時間曲線下面積(AUC)によって測定されるように、マウス中においてより高い曝露量となって現れた。C末端Fcリジンを欠くFc・IL-2変異タンパク質のこの長期安定性は、カニクイザル及びヒトからの血清中においてインビトロでも観察された。IL-2のThr-3からA1aへの変異((N297G_KtoA)_AAPA)は、マウス血清中で、ならびに組換えヒトカテプシンD及びLを含む別個のインキュベーション中において、((N297G_KtoA)_AAPTと比較して)37でインビトロ安定性の減少をもたらした。このインビトロ血清安定性の減少は、(N297G_KtoA)_AAPTと比較して(N297G_KtoA)_AAPAで、マウス中におけるインビボでのより低い曝露量(AUC)となって現れた。質量分析による、インビトロ及びインビボ試料からの(N297G_KtoA)_AAPAのカタボライトの特徴付けにより、IL-2変異タンパク質ドメインのLys8及びLys9を、(N297G_KtoA)_AAPTの同等の試料では観察されなかったタンパク質分解の影響を受けやすい残基として同定した。37での(N297G_KtoA)_AAPTの安定性に対する(N297G_KtoA)_AAPAの安定性の減少は、カニクイザル及びヒトからの血清中においてインビトロでも観察された。

【 0 2 1 4 】

この領域におけるグリコシル化の重要性ゆえに、また融合タンパク質の製造性を潜在的に改善するために、融合配列をO結合型グリコシル化ではなく、N結合型グリコシル化を促進するように以下の通りに変化させた。

【 0 2 1 5 】

10

20

30

40

50

【化 5】

元の配列

I g G 1 F c (N 2 9 7 G__欠失K) : : G 4 S : : h u I L - 2 (V 9 1 K、C 1 2 5 A)

TQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ (配列番号 : 3 2)

変化させた配列

I g G 1 F c (N 2 9 7 G__欠失K) : : G 4 S : : h u I L - 2 (T 3 N、V 9 1 K、C 1 2 5 A)

TQKSLSLSPGGGGGSAPNSSSTKKTQLQ (配列番号 : 3 5)

I g G 1 F c (N 2 9 7 G__欠失K) : : G 4 S : : h u I L - 2 (T 3 N、S 5 T、V 9 1 K、C 1 2 5 A)

TQKSLSLSPGGGGGSAPNSTSTKKTQLQ (配列番号 : 3 6)

I g G 1 F c (N 2 9 7 G__欠失K) : : G G N G T : : h u I L - 2 (T 3 A、V 9 1 K、C 1 2 5 A)

TQKSLSLSPGGNGTAPASSSTKKTQLQ n (配列番号 : 3 7)

I g G 1 F c (N 2 9 7 G__欠失K) : : Y G N G T : : h u I L - 2 (T 3 A、V 9 1 K、C 1 2 5 A)

TQKSLSLSPGYGNGTAPASSSTKKTQLQ (配列番号 : 3 8)

【 0 2 1 6 】

実施例 7 - カニクイザル P K / P D の決定

標準的な I L - 2 免疫刺激療法は、望ましくない副作用を回避するために投薬サイクルの間に休薬期間（曝露なし）を必要とする。対照的に、T r e g 増殖または刺激療法は、T r e g 刺激に十分な持続的トラフ薬物レベル（血清 C_{min}）であるが、免疫活性化をもたらす薬物レベル未満の最大曝露量（血清 C_{max}）での長期曝露を必要とする場合がある。本実施例は、炎症性免疫活性化に必要であると思われる薬物レベル未満の最大曝露量（血清 C_{max}）を維持しながら、延長された標的範囲（血清 C_{min}）についての、カニクイザルにおける半減期延長変異タンパク質の投薬戦略を実証する。

【 0 2 1 7 】

カニクイザルに、4つの群（A～D）において F c . V 9 1 K (I g G 1 F c (N 2 9 7 G__欠失K) : : G 4 S : : h u I L - 2 (V 9 1 K、C 1 2 5 A)) を投薬し、3つの群（A～C）には皮下投薬し、1つの群（D）には静脈内投薬する。各群では、4匹の生物学的にナীবなオスのカニクイザルに、以下で概要を述べる投薬戦略により投薬する。半減期延長変異タンパク質の皮下投薬は、より多くのリンパ吸収を可能にし、より低い最大曝露量（血清 C_{max}）及び/またはより強力な薬理学的応答（T r e g 増殖）をもたらす場合がある。群 A の投薬戦略は、サイクル 1 の 0 日目、2 日目、及び 4 日目に 1 キロ

10

20

30

40

50

グラム当たり 10 マイクログラムの 3 連続用量ならびに 14 日目に 1 キログラム当たり 10 マイクログラムの用量からなり、より低い最大曝露量 (C_{max}) を維持しながら、1 キログラム当たり 50 マイクログラムのより高い初期用量と同様の長期標的範囲を可能にする。群 B の投薬戦略は、群 A と比較するために 0 日目及び 14 日目に投薬したのが 1 キログラム当たり 50 マイクログラムである。群 C の投薬戦略は、0 日目及び 28 日目に投薬したのが 1 キログラム当たり 50 マイクログラムである。Treg 濃縮を持続させるためにトラフ範囲が必要であるか否か、または投薬サイクル間の休薬期間が有益であるか否かの決定を可能にする。静脈内投薬アーム群 D の投薬戦略は、0 日目に投薬したのが 1 キログラム当たり 50 マイクログラムであり、最大曝露量 (C_{max}) 及び Treg 濃縮の差と皮下投薬の場合とを比較することができる。

10

【0218】

薬物動態 (無傷の分子及び全ヒト Fc の定量的イムノアッセイ)、抗薬物抗体、放出された可溶性 CD25、ならびに血清サイトカイン (IL-1、TNF-、IFN-、IL-10、IL-5、IL-4、及び IL-13) を、指定した各用量群について以下の時点で測定する：

【0219】

群 A：投薬前 (第 1 サイクル；用量 1)、48 (投薬前第 1 サイクル；用量 2)、96 (投薬前第 1 サイクル；用量 3)、100、104、120、168、216、264、336 (投薬前第 2 サイクル)、340、344、360、408、456、504、576、672、744、840、及び 1008 時間。

20

【0220】

群 B：投薬前 (第 1 サイクル)、4、8、24、72、120、168、240、336 (投薬前第 2 サイクル)、340、344、360、408、456、504、576、672、744、840、及び 1008 時間。

【0221】

群 C：投薬前 (第 1 サイクル)、4、8、24、72、120、168、240、336、408、504、672 (投薬前第 2 サイクル)、676、680、696、744、792、840、912、1008、1080、及び 1176 時間。

【0222】

群 D：投薬前 (第 1 サイクル)、0.25、1、4、8、24、72、120、168、240、336、408、504、及び 672 時間。

30

【0223】

薬力学 (末梢血 Treg、非制御性 CD4 及び CD8 T 細胞、ならびに NK 細胞の免疫表現型検査及び計数) を、指定した各用量群について以下の時点で測定する：

【0224】

群 A：投薬前 (第 1 サイクル；用量 1)、96 (投薬前第 1 サイクル；用量 3)、168、336 (投薬前第 2 サイクル)、456、及び 576 時間。

【0225】

群 B：投薬前 (第 1 サイクル)、120、240、336 (投薬前第 2 サイクル)、456、及び 576 時間。

40

【0226】

群 C：投薬前 (第 1 サイクル)、120、240、672 (投薬前第 2 サイクル)、792、及び 912 時間。

【0227】

群 D：投薬前 (第 1 サイクル)、120 及び 240 時間。

【0228】

血液学及び臨床化学を、全ての動物及び用量群について、用量群ごとに投薬前及び初期用量後 24 時間で評価する。以下のパラメータを評価する。

血液学：

・白血球数 (全微分及び絶対微分)

50

- ・赤血球数
- ・ヘモグロビン
- ・ヘマトクリット
- ・平均赤血球ヘモグロビン、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン濃度（算出値）
- ・絶対網状赤血球
- ・血小板数
- ・血球形態
- ・赤血球分布幅
- ・平均血小板容積

臨床化学：

10

- ・アルカリホスファターゼ
- ・総ビリルビン（総ビリルビンが 1 mg / dL を超える場合は直接ビリルビンも）
- ・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
- ・アラニンアミノトランスフェラーゼ
- ・ガンマグルタミルトランスフェラーゼ
- ・尿素窒素
- ・クレアチニン
- ・総タンパク質
- ・アルブミン
- ・グロブリン及び A / G （アルブミン / グロブリン）比（算出値）
- ・グルコース
- ・総コレステロール
- ・トリグリセリド
- ・電解質（ナトリウム、カリウム、塩化物）
- ・カルシウム
- ・リン

20

【0229】

実施例8 - 非グリコシル化 IgG1Fc

天然に存在する IgG 抗体は、重鎖の定常ドメイン 2 (CH2) にグリコシル化部位を有する。例えば、ヒト IgG1 抗体は、Asn297 位 (EU 番号付け) に位置するグリコシル化部位を有する。今日まで、非グリコシル化抗体を作製するための戦略は、物理化学的特性に関して Asn に類似しているアミノ酸 (例えば、Gln) で、または極性基を有しない Asn 側鎖を模倣する Ala 残基で Asn 残基を置き換えることを含む。本実施例は、Asn をグリシンで置き換えること (N297G) の利益を実証する。N297GFc は、より良好な生物物理学的特性及び製造性という特質 (例えば、精製中の回収率) を有する非グリコシル化分子である。

30

【0230】

Fc 断片及び IgG 抗体における複数の既知の結晶構造に関する検査により、グリコシル化ループセグメントの周囲、特にグリコシル化された Asn297 位における大幅な構造的柔軟性が明らかとなった。既知の結晶構造の多くでは、Asn297 は、正の主鎖二面角に適合した。Gly は、側鎖原子の欠如により、正の主鎖二面角に適合する強い傾向を有する。したがって、このコンフォメーション及び構造上の理由に基づいて、Gly は、N297Q または N297A よりも良好な Asn の代替物であってよい。

40

【0231】

Asn297 を Gly で変異させることにより、精製プロセス中においてはるかに改善した回収率 (または効率) 及び生物物理学的特性を有する非グリコシル化分子がもたらされる。例えば、プロテイン A プールからの回収割合 (最終収率) は、N297Q の 45.6% 及び N297A の 39.6% と比較して、N297G 変異では 82.6% であった。SPHP カラム分析により、N297Q 及び N297A 変異体のより低い回収割合は、テーリングピークによるものであったことが明らかとなり、これは高分子量凝集及び / また

50

はミスフォールド種を示している。この結果は、より大規模な 2 L スケールの実験で再確認した。

【 0 2 3 2 】

生物製剤産業では、大規模生産に対する潜在的必要性、例えば、薬物として販売される潜在性を有する分子は、この分子が大規模生産及び精製に適していないというリスクを緩和するための多数の属性について評価される。製造性評価では、N 2 9 7 G は、p H 変化に対するロバスト性を明らかにした。N 2 9 7 G には凝集の問題はなかったが；それに対して、N 2 9 7 Q 及び N 2 9 7 A は、それぞれ 2 0 % 及び 1 0 % の凝集増加を示した。N 2 9 7 G はより良好な製造性という特質を有していたが、試験した全ての機能アッセイにおいて N 2 9 7 Q 及び N 2 9 7 A と同様であった。例えば、A D C C アッセイでは、N 2 9 7 G は、N 2 9 7 Q 及び N 2 9 7 A と同様に細胞傷害性を欠いていた。

10

【 0 2 3 3 】

実施例 9 - 安定化した非グリコシル化 I g G 1 F c

本実施例は、操作したジスルフィド結合（複数可）を導入することにより、I g G 抗体骨格の安定性を改善する方法について記載する。天然に存在する I g G 抗体は、安定した分子である。しかしながら、一部の治療用途のために、変異を行うこと、または非グリコシル化分子を作製することが必要な場合がある。例えば、非グリコシル化 I g G 分子は、A D C C 及び F c ガンマ受容体への結合を回避する必要がある治療適応症に使用されてよい。しかしながら、非グリコシル化 I g G 1 は、グリコシル化 I g G 1 よりもはるかに低い融解温度を有する（C H 2 ドメインの融解温度は、約 1 0 ° C ; 7 0 ° C ~ 6 0 ° C に減少する）。観察したより低い融解温度は、非グリコシル化 I g G 1 の様々な生物物理学的特性に悪影響を及ぼす。例えば、非グリコシル化 I g G 1 は、グリコシル化 I g G 1 と比較して低い p H で増加した凝集レベルを有する。

20

【 0 2 3 4 】

ジスルフィド結合を操作するために、C - アルファ原子間の距離計算を含む構造に基づく方法を最初に使用して、C y s への変異のために F c 領域中における 5 4 の残基対を同定した。これらの 5 4 の部位を、4 つの残基対（V 2 5 9 C - L 3 0 6 C、R 2 9 2 C - V 3 0 2 C、A 2 8 7 C - L 3 0 6 C、及び V 3 2 3 C - I 3 3 2 C）までさらに絞り込んだ。使用した基準は、（i）C H 2 ドメイン内の位置、（i i）ループ、ターン及び炭水化物からの距離、（i i i）F c ガンマ受容体及び F c R n 相互作用部位からの距離、（i v）溶媒露出度（好ましい埋没位置）などを含んだ。

30

【 0 2 3 5 】

対合システイン置換を、非グリコシル化 N 2 9 7 G F c との関連において作製した。非還元ペプチドマッピング分析により、4 つの操作した部位のうち 3 つが、その関連において予想かつ設計した通りにジスルフィド結合を形成したことが明らかとなった。V 2 5 9 C - L 3 0 6 C 変異は、ジスルフィド結合を正確に形成せず、C H 2 ドメイン中に既に存在する天然ジスルフィドとの誤対合を招いた。他方の 3 つの設計、すなわち、R 2 9 2 C - V 3 0 2 C、A 2 8 7 C - L 3 0 6 C、及び V 3 2 3 C - I 3 3 2 C は、予測かつ設計した通りにジスルフィド結合を正確に形成した。N 2 9 7 G 変異にジスルフィド結合を付加することは、N 2 9 7 G 変異単独よりも約 1 5 ° C の熱安定性の改善をもたらした。R 2 9 2 C - V 3 0 2 C、A 2 8 7 C - L 3 0 6 C、及び V 3 2 3 C - I 3 3 2 C ジスルフィドバリエーションのうち、R 2 9 2 C - V 3 0 2 C 及び A 2 8 7 C - L 3 0 6 C が、ラットに投与した場合に良好な薬物動態を有した（それぞれ、1 1 日間及び 9 日間の $t_{1/2}$ ）。これは、以前に公開された C H 2 ドメインジスルフィド結合（G o n g e t a l . , J . B i o l . C h e m . 2 0 0 9 2 8 4 : 1 4 2 0 3 - 1 4 2 1 0）についてラット中で観察された薬物動態プロファイルとは対照的であり、これは 5 日間の $t_{1/2}$ を示していた。

40

【 0 2 3 6 】

C H 2 ドメイン中のジスルフィド結合を操作することは、グリコシル化 I g G 1 分子と同等に非グリコシル化分子の安定性を改善する（示差走査熱量測定により決定されるよう

50

な、融解温度の10～15の改善)。本明細書に記載した操作部位は、ジスルフィドスクランプリングをもたらすことなく、集団のおよそ100%において予測した通りにジスルフィドを形成する。より重要なことには、公開されているCH2ドメインのジスルフィド結合部位とは異なり、本明細書に記載したジスルフィド結合は、ラットPKに影響を及ぼすことはない。

【0237】

実施例10

カニクイザル及びヒトからのT細胞及びNK細胞の応答に対するV91K及びN88D変異の効果をインビトロで比較した。CD25の存在下(全血pSTAT5応答におけるCD4⁺CD25⁺ゲートT細胞)では、カニクイザルIL-2Rシグナル伝達に対するV91K変異の効果は、ヒトIL-2Rに対するその減少した活性と比較してごくわずかであった。しかしながら、CD25の不存在下(全血pSTAT5応答及びNK細胞増殖における両方のCD25⁻ゲートT細胞)では、V91K変異は、カニクイザルIL-2Rシグナル伝達をさらに著しく減少させた。対照的に、Fc・N88Dは、カニクイザル全血中のCD25⁺T細胞中でシグナル伝達の減少を示し、これはヒト全血中のT細胞におけるFc・V91Kのシグナル伝達効果により類似している。表2にまとめたインビトロデータは、カニクイザルにおいてより弱いアゴニストのFc・N88Dで観察した治療濃度域が、ヒト対象におけるFc・V91Kの効果を予測するであろうことを示唆している。

【0238】

【表2】

表2. ヒト及びカニクイザル細胞のインビトロ応答に対するV91KまたはN88D変異の効果の概要

	全血 pSTAT5		NK 細胞増殖
	CD25 ⁺ T細胞	CD25 ⁻ T細胞	
カニクイザルに対するV91K	∅	↓	↓
ヒトに対するV91K	↓	↓↓	↓↓
カニクイザルに対するN88D	↓	↓↓	↓↓
ヒトに対するN88D	↓↓	↓↓	↓↓↓

【0239】

実施例11

2つのインビボ研究をカニクイザルで実施した。最初のカニクイザル研究は、Fc・V91Kの2週間及び4週間の投薬間隔を比較して、完全なまたは部分的な薬物動態(PK)及び薬力学的(PD)トラフが、第2用量に対する応答の大きさを变化させたかどうかを決定するように設計した(図10A及び図10B)。強力なTreg応答が得られると予測した第1用量(50µg/kg)、及び治療濃度域の下限值を調査するための第2用量(10µg/kg)を使用した。10µg/kgが少な過ぎるのか否か分からなかったため、用量を1日目、3日目、及び5日目に投与して応答の可能性を高めた。この投薬レジメンにより、50µg/kgの単回皮下(SC)用量で達成したのと同じ曝露量を5日目の後に得たが、C_{max}はより低かった。50µg/kgの静脈内(IV)群も、リンパ対血液区画におけるより高い薬物曝露量に応じたPDの生じ得る差を調査するために含んだ。この研究の結果は、用量レベルの各々が、有害事象(AE)またはTeffもしくはNK増殖なしに強力なTreg増殖応答を誘導し、かつ14日目または28日目のいずれかで第2用量に対する応答が同等であったことを立証した。

【 0 2 4 0 】

【表 3】

表 3. 第 1 カニクイザル研究の研究設計

群	動物数	投薬 (日)	用量Fc. V91K
1	4	1, 3, 5, 15	10 μ g/kg SC
2	4	1, 15	50 μ g/kg SC
3	4	1, 29	50 μ g/kg SC
4	4	1	50 μ g/kg IV

10

【 0 2 4 1 】

第 2 カニクイザル研究は、1、3、100、200 μ g/kg (SC) の Fc. V91K 用量で治療濃度域のマージンを調査して、これを 3、10、100、200 μ g/kg 用量 (SC) のより弱いアゴニストである Fc. N88D 及び 3、10、30、100 μ g/kg (SC QD \times 5) の PROLEUKIN (登録商標) と比較するように設計した。PROLEUKIN (登録商標) の用量を、公開されているヒト及び非ヒト霊長類研究 (Hartemann et al., 2013, Lancet Diabetes Endocrinol 1:295-305; Saadoun et al., 2011, NEJM 365:2067-77; Aoyama et al., 2012, Am J Transplantation 12:2532-37) に基づいて選択し、HCV 血管炎及び 1 型糖尿病 (T1D) における低用量 IL-2 臨床試験を模倣するように QD \times 5 で投与した。

20

【 0 2 4 2 】

【表 4】

表 4. 第 2 カニクイザル研究の研究設計

群	動物数	被験物質	第 1 サイクル処置 処置日：用量 (SC)	第 2 サイクル処置 処置日：用量 (SC)
1	4	PROLEUKIN (登録商標)	1～5 日目：3 μ g/kg	14～18 日目：30 μ g/kg
2	4	PROLEUKIN (登録商標)	1～5 日目：10 μ g/kg	14～18 日目：100 μ g/kg
3	4	Fc. V91K	1 日目：1 μ g/kg	14 日目：100 μ g/kg
4	4	Fc. V91K	1 日目：3 μ g/kg	14 日目：200 μ g/kg
5	4	Fc. N88D	1 日目：3 μ g/kg	14 日目：100 μ g/kg
6	4	Fc. N88D	1 日目：10 μ g/kg	14 日目：200 μ g/kg

30

40

【 0 2 4 3 】

図 11A～図 11F では、細胞応答、体温、及び血清 CRP の動態を示す。x 軸の時系列は、第 1 用量の日として 1 日目ではなく 0 日目から始まる。

【 0 2 4 4 】

50

組み合わせで、2つのカニクイザル研究は、I L - 2 変異タンパク質が、P R O L E U K I N (登録商標)で達成したものよりも幅広い治療濃度域を有する、より高いT r e g 濃縮を誘導したことを実証した(図12A及び図12B)。P R O L E U K I N (登録商標)では、T r e g 濃縮は、N K 及び好酸球の増殖と並行していた。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、好酸球増殖はI L - 2 療法に対する周知の応答であり、C D 2 5 + 自然リンパ細胞からのI L - 2 誘導I L - 5 の結果である可能性が高い。C D 4 及びC D 8 T e f f 増殖は、T r e g をC D 4 T 細胞の25~35%に増加させた用量で生じた。対照的に、F c . V 9 1 K 及びF c . N 8 8 D は、N K 細胞及び好酸球を上回るより高い選択性でT r e g 増殖を誘導し、T e f f 増殖を促進した用量は、T r e g をC D 4 T 細胞の>40%に濃縮した用量を上回った。

10

【0245】

文献で報告された低用量I L - 2 臨床試験では、最初に生じたA E はインフルエンザ様症状及び発熱であった。したがって、治療濃度域の比較に加えて、この研究の目的は、発熱に先行するバイオマーカーを発見することであった。図12Cに示すように、P R O L E U K I N (登録商標)のより高い2つの用量では、C R P レベルが体温と並行していることが見出された。F c . V 9 1 K では、中程度の体温上昇を最高用量で検出し、次により低い用量では、C R P のわずかな増加を観察した。したがって、C R P を使用して、本発明の分子を用いた処置に対する対象の応答をモニターすること、及び/または患者における用量漸増の上限値を定義することができる。

【0246】

20

P R O L E U K I N (登録商標)処置動物では、F c . V 9 1 K またはF c . N 8 8 D 処置動物にはあまり顕著ではなかった、または存在しなかったいずれかの特定の毒性も観察した(図12D)。血小板、好中球、及びアルブミンのレベルが、P R O L E U K I N (登録商標)を用いた処置により全て減少したことが見出されたのに対して、同様のまたはそれよりも高いT r e g 濃縮をもたらしたF c . V 9 1 K またはF c . N 8 8 D のいずれかの用量は、これらのパラメータをほとんどまたは全く減少させることはなかった。総合すると、これらのデータは、F c . V 9 1 K またはF c . N 8 8 D のいずれかを用いた患者の処置のための治療濃度域が、P R O L E U K I N (登録商標)を用いた場合よりも有意に広いことが予想されることを示している。

【0247】

30

実施例12

選択した時点において、実施例11の第1カニクイザル試験からの血清を抗薬物抗体(A D A)について試験した(図13)。F c . V 9 1 K 特異性が競合によって確認された試料のA D A シグナル/ノイズデータを示す。A D A を試験した時点をも、x 軸の上の縦線で示す。群1では、1匹の動物が最終用量から少なくとも15日後にA D A を生成し、群2では試験結果がA D A に陽性であった動物はならず、群3では、第1用量から15日後またはそれを超えて3匹の動物にA D A が一貫して現れた。162日目に群1及び群2に50µg/kgを反復投薬したところ、4週間後(190日目)にさらに試験結果がA D A に陽性であった動物はいなかった。最も強いA D A シグナル(210、212)を生成した群3の2匹の動物がP D 応答の減少を示し、これは、これらの動物において第2用量後に観察したC - m a x の減少と一致していた。群4(50µg/kg I V)では、試験結果がA D A に陽性であった動物はいなかった。A D A は、I L - 2 及びF c ドメインの両方に特異的であったことから、カニクイザルI L - 2 とヒトI L - 2 (V 9 1 K、C 1 2 5 A)との間の8つのアミノ酸差異によるものであると予想できる。A D A の中和活性は試験しなかった。

40

【0248】

実施例13

本実施例は、本発明の原理を使用して、所望のレベルまでI L - 2 R シグナル伝達を誘導するI L - 2 変異タンパク質を設計かつ同定し得ることを示す。

【0249】

50

IL - 2 R 結合及び IL - 2 R シグナル伝達強度を部分的に減弱させる IL - 2 変異を発見するために、計算アルゴリズムを適用して、IL - 2 変異が IL - 2 と IL - 2 R との間の会合エネルギーを減少させる程度を決定した。IL - 2 : IL - 2 R : IL - 2 R : c (P D B I D : 2 B 5 I (W a n g e t a l . , 2 0 0 5 , S c i e n c e 3 1 0 (5 7 5 1) : 1 1 5 9 - 6 3)) の構造を計算アルゴリズムへの入力値として使用し、構造に基づく計算エネルギー算出に基づいて 6 4 のバリエーションを推奨した。要約すると、ステップは、(i) エネルギー算出のために、その受容体と複合した IL - 2 の構造を調製すること、(i i) 他方の 1 9 の天然に存在するアミノ酸への変異のために IL - 2 : IL - 2 R 境界の界面残基を同定すること、(i i i) 2 つの異なる計算アルゴリズムを使用して変異エネルギー算出を実行すること、ならびに (i v) 算出したエネルギー値、アミノ酸のコンフォメーション、ならびにこれまでの経験及び知見を利用する基準を使用して変異タンパク質を選択することを含む。

10

【 0 2 5 0 】

IL - 2 : IL - 2 R : IL - 2 R : c 構造を、CHARMM 力場を使用して陰 (G B I M) 溶媒モデル中において全ての水分子の欠失、欠損原子の座標生成、及び複合構造のエネルギー最小化により調製した。上記ステップを、ACCELRYS (登録商標) からの Discovery Studio ソフトウェア (B I O V I A 、サンディエゴ、カリフォルニア州) 中で実施した。

【 0 2 5 1 】

IL - 2 : IL - 2 R 界面における以下の IL - 2 残基を複合構造から同定し、インシリコ変異誘発算出のために選択した : L 1 2 、 Q 1 3 、 E 1 5 、 H 1 6 、 L 1 9 、 D 2 0 、 M 2 3 、 R 8 1 、 D 8 4 、 S 8 7 、 N 8 8 、 V 9 1 、 I 9 2 、 L 9 4 、及び E 9 5 。インシリコ変異誘発を、Discovery Studio ソフトウェアの「Calculate Mutation Energy (Binding)」プロトコールを使用して実施した。このプロトコールは、結合自由エネルギーの変化、すなわち $G_{結合}$ (すなわち、[IL - 2 R に対する変異体 IL - 2 の結合自由エネルギー] - [IL - 2 R に対する野生型 IL - 2 の結合自由エネルギー]) を計算する。 $G_{結合}$ 値を陰溶媒モデル (Generalized Born with Implicit Membrane) 中で算出した。各変異タンパク質内の残基の番号付けは、野生型ヒト IL - 2 の配列 (配列番号 1) に対応している :

20

30

【 0 2 5 2 】

40

50

【化 6】

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

10

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

20

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

30

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

40

【0253】

全ての選択したIL-2残基を、299の単一アミノ酸置換バリエーションをもたらす19の他方のアミノ酸に変異させた。これらのバリエーションの各々に関するG結合を上記のように計算した。算出したG結合を図14に報告する。バリエーションを、選択した変異がG結合値 $>1.5 \text{ kcal/mol}$ をもたらす、プロリン残基を導入しないように選択した。多様性を高めるために、変異がG結合 $>1.5 \text{ kcal/mol}$ をもたらさない位置（例えば、L12）については、変異をG結合 $>1.0 \text{ kcal/mol}$ で選択した。

【0254】

50

IL - 2 : IL - 2 R : IL - 2 R : c 構造を、OPLS 2005 力場 (Banks et al., 2005, J Comp Chem 26:1752) を使用して、構造から全ての水分子の欠失、欠損原子の座標を生成すること及び構造の最小化により調製した。上記ステップを、BIOLUMINATE (登録商標) ソフトウェア (Schrodinger、ニューヨーク、ニューヨーク州) 中で実施した。

【0255】

IL - 2 : IL - 2 R 界面における以下の IL - 2 残基を複合構造から同定し、インシリコ変異誘発算出のために選択した: L12、Q13、E15、H16、L19、D20、M23、R81、D84、S87、N88、V91、I92、L94、E95。インシリコ変異誘発を、BIOLUMINATE (登録商標) の「Residue Scanning」機能を使用して実施した。算出した G 結合を図 15 に報告する。

10

【0256】

予測した G 結合を使用して、バリエントを以下の基準により選択した: 選択した変異がプロリン残基を導入しない; 選択した変異が、Discovery Studio ソフトウェアによって既に推奨されたものではない; 選択した変異が、G 結合値 > 10 kcal/mol をもたらす; 選択した変異がヒスチジン残基を導入しない (BIOLUMINATE (登録商標) によりヒスチジン残基への変異について計算された G 結合値は、信頼できないことが分かった)。

【0257】

変異 D20E、V91D、及び I92W は、BIOLUMINATE (登録商標) により提案された新規バリエントであって、これらを Discovery Studio ソフトウェアにより推奨された 57 のバリエントの一覧に加えた。バリエント L12K、L12Q、L19R 及び L19N も最終分析に含めて、以下の一覧となった: D20A、D20E、D20F、D20G、D20W、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、E15A、E15G、E15S、E95G、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、I92K、I92R、L12G、L12K、L12Q、L12S、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、M23R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、Q13G、R81A、R81G、R81S、R81T、S87R、V91D、V91E、V91G、V91K、及び V91S。全ての IL - 2 変異タンパク質が、製造性改善のために C125A 変異も含有した。

20

30

【0258】

G4S リンカーにより分離した IgG1Fc (N297G) の C 末端に融合した 66 の IL - 2 変異タンパク質のパネルを、予備活性化及び静止ヒト T 細胞上で IL - 2 R 刺激について試験した (図 16)。図 16A に示すように、33 pM は全ての変異タンパク質について準最適濃度であり、それゆえ変異タンパク質の活性を、この濃度での pSTAT5 MFI に基づいて順位付けした。この順位付けを、2PBMCD ナーについて図 16B に示す。上に示す通り、Treg がこのような減弱 IL - 2 変異タンパク質に対して選択的に応答するため、このパネルを使用して、最適な Treg 選択性をもたらす IL - 2 R シグナル伝達の上限值及び下限値を規定することができる。

40

【0259】

実施例 14

上清画分で得られた初期 pSTAT5 シグナル伝達データから、構築物のより小さなパネルを発現、精製、及びさらなる評価のために選択した。これらの分子の各々は、Fc - IL - 2 - G4S リンカー - IL - 2 変異タンパク質を含んでいて、各変異タンパク質は、C125A 及び次の変異: D20E、D20G、D20W、D84A、D84S、H16D、H16G、H16K、H16R、H16T、H16V、I92K、I92R、L12K、L19D、L19N、L19T、N88D、N88R、N88S、V91D、V9

50

1 G、V 9 1 K、V 9 1 Sのうち1つを含み、または追加の変異はなかった(「WT」)。これらの精製分子を、予備刺激及び静止ヒトT細胞中においてSTAT5リン酸化を活性化するそれらの能力について試験した(図17)。Fc・IL-2変異タンパク質もまた、T細胞サブセットの増殖を刺激し、FOX P3発現を増加させるそれらの能力について(図18)、及びNK細胞増殖を刺激するそれらの能力について(図19)試験した。

【0260】

Fc・IL-2変異タンパク質を、T細胞の表面上でCD25(IL-2R)と結合し、様々な時点において細胞表面CD25に結合したままにするそれらの能力について試験した(図20)。Fc・IL-2変異タンパク質がT細胞中でSTAT5リン酸化を刺激した程度(図17)は、細胞表面保持と高い負の相関関係($r = -0.87$)にあり、これは、IL-2Rを介するシグナル伝達による内在化速度が受容体アゴニズム効力と密接に関連していたことを示している。

【0261】

並行して行った実験では、pSTAT5シグナル伝達の持続性を、異なる時点におけるホスホ-STAT5の細胞内免疫検出により観察した。FOX P3 + CD25 + CD4 + T細胞のホスホ-STAT5 MFIを図21に示す。これらの結果は、中間のシグナル伝達強度を有する特定の変異タンパク質が、より遅い時点でのpSTAT5シグナル伝達の維持においてFc・WT IL-2よりも効果的であったことを実証した(例えば、H16T、H16K、H16R、L19N、L19D、D20T、N88D、N88R、N88S、V91D、V91G、V91K、V91S)。アンタゴニスト変異タンパク質(D20W)を除いて、IL-2Rシグナル伝達保持は、細胞表面保持と相関する傾向があったが、高い表面保持を示した特定の弱い変異タンパク質は、IL-2Rシグナル伝達の維持において最も効果的ではなかった(例えば、D20G及びD20T)(図22)。

【0262】

異なるFc・IL-2変異タンパク質がインビボでTreg頻度をどのように増加させたのかを決定するために、ヒト化マウス(4か月前にCD34⁺造血幹細胞で再構成したNSGマウス)に示した変異タンパク質を投薬し、Treg濃縮を血液中で4日目に測定した(図23A)。Treg濃縮の程度が、延長されたpSTAT5シグナルを送達する能力と最も密接に相関することが分かり(図23B)、V91位の置換はインビボでのTreg濃縮に特に効果的であって、インビトロでのIL-2Rシグナル伝達保持を増加させた。

【0263】

実施例15

一連のヒト抗ヒトIL-2抗体を、XENOMOUSE(登録商標)(Amgen Inc.、サウザンドオークス、カリフォルニア州)マウス中で生成し、ELISAアッセイにおいてヒト及びカニクイザルIL-2の両方と結合するそれらの能力に基づいて選択した。それらの軽鎖及び重鎖可変ドメインアミノ酸及び核酸配列を図26~図29に示す。

【0264】

これらの抗体を、DERL-2細胞(IL-2受容体 / / 陽性)による、及びNKL細胞(IL-2受容体 / / 陽性)によるIL-2応答を阻害するそれらの能力についてスクリーニングした。DERL2細胞に対しては高い阻害活性を、及びNKL細胞に対しては中程度から低い阻害活性を示した抗体を、さらなる分析のために選択した。クローンを配列決定し、満足のいく製造がより困難である姉妹クローン及びそれらのmAbを排除した。結合交差阻害試験を実施して、抗体は8つのビンに分類されることが見出された。試験したXENOMOUSE(登録商標)抗体の全てを、ビンA、B、C、D、E、及びE.1に分類した。ビンB、C、E及びE.1の抗体は、ヒトIL2Rに対するヒトIL-2結合に干渉することが見出されたが、ビンA及びDの抗体は干渉しなかった。ビンFを、ヒトIL-2に対するその結合により、サイトカインがIL-2受容体に結合するのを防止しない対照抗体によって定義し、ビンGを、対照抗体5344.11(カタログ番号555051、BD Biosciences、サンノゼ、カリフォ

10

20

30

40

50

ルニア州)によって定義した。試験したXENOMOUSE(登録商標)抗体には、ビンFまたはGに分類されるものはなかった。

【0265】

動態パラメータの K_D 、 k_{on} 及び k_{dis} もまた、BIACORE(登録商標)(GE Healthcare Bio-Sciences、ピッツバーグ、ペンシルベニア州)分析を使用して抗体の各々について定義した。36の抗体のサブセットを選択し、全てのビンならびに K_D 及び k_{dis} 値の範囲の代表例を含む、クローンの多様性を表した。これらのクローンの全てが、一般に非TregCD4T細胞(nTr)、CD8T細胞(CD8)またはナチュラルキラー(NK)細胞中よりも制御性T細胞(Treg)中においてより高い IC_{50} 値(より高い IC_{50} が、効果の弱い阻害を示す)で、ヒト全血リンパ球中においてIL-2シグナル伝達を阻害することが見出された。

【0266】

次いで、全ての36の抗体を、ヒト幹細胞で再構成したNSG SCID/Huマウス中における抗IL-2抗体/hIL-2免疫複合体(抗体:hIL-2の1:2モル比で)の一部として、低用量野生型IL-2・Fc、モデルIL-2変異タンパク質N88D・Fc、5344・111マウス抗ヒトIL-2/hIL-2複合体及びPBS処置対照マウスと比較した場合に、nTr、NK及びCD8細胞に対してTregを増殖させるそれらの能力について試験した。Treg/NK及びTr/nTr比を使用して、エフェクター細胞に対してTregを選択的に増殖させるXENOMOUSE(登録商標)抗体の相対的能力を評価した(比は、PBS処置マウスで観察した値を基準として正規化し、全ての抗体を分析するために必要ないくつかの実験間及び実験中において比較可能にした)。5344・111/I L-2対照物と同様に、またはそれよりも良好に実施された抗体は12あった。それらの特性を表5に列挙し、図30に示す。

【0267】

【表5】

表5

抗体	ビン	Hu WB pSTAT5 IC_{50} 対			
		Treg	非Treg CD4	CD8	NK
9B10	A	200	38	23	79
14G7	B	61	64	44	54
26C12	B	302	224	283	370
26H7	B	25	22	16	259
2H11	B	106	42	49	18
9D6	B	29	21	16	23
18F3	C	42	25	21	181
2C3	D	184	132	79	152
8F10	D	158	30	20	24
14D7	E	668	244	144	293
21F8	E	61	64	44	54
22B9	E.1	813	137	276	—

【0268】

【表 6】

表 6 : 抗 I L - 2 抗体の動態特性

抗体 ID	アイソタイプ	VH 生殖細胞系	HC CDR3	VL 生殖細胞系	エピトープ アピピン	KD ヒト	KD カニク イザル
14D7	G2	VH4 4-31/D7 7-27 RF3/JH3	DWGR-----DAFDI	VK1 O12/JK1	E	300 pM	140 pM
14G7	G4	VH5 5-51/D4 4-23 RF2/JH6	HRGGRS-----YYYGMDV	VK1 O18/JK3	B	280 pM	130 pM
18F3	G4	VH4 4-31/D3 3-3 RF1/JH4	EGRFGE-----LGSYYFDY	VL3 3p/JL2	C	50 pM*	50 pM*
21F8	G2	VH1 1-08/D2 2-21 RF1/JH4	SRQW-----LVLDY	VK1 A30/JK1	E	690 pM	500 pM
22B9	G2	VH1 1-08/D2 2-21 RF1/JH4	SRQW-----LVLDY	VK1 A30/JK1	E.1	450 pM	170 pM
26C12	G4	VH5 5-51/D3 3-10 RF2/JH6	HGHGSSSG-----RTYYYGLDV	VK1 O18/JK3	B	270 pM	130 pM
26H7	G4	VH5 5-51/D5 5-24 RF3/JH6	HGGYSGR-----SYYGMDV	VK1 O18/JK3	B	1.3 nM	310 pM
2C3	G2	VH5 5-51/D4 4-11 RF3/JH4	QQVA-----GMLDY	VK3 A27/JK4	D	150 pM	1.2 nM
2H11	G2/G4	VH5 5-51/D4 4-17 RF2/JH4	DTG-----YFDY	VL3 3p/JL2	B	30 pM	8.0 pM
8F10	G2	VH3 3-33/D1 1-26 RF1/JH6	GAVAGTGR-----	VK2 A19/JK4	D	1 pM*	460 pM*
9B10	G2	VH3 3-30.3/D5 5-18 RF3/JH4	GSYYDSSG-----YYFGEDFDY	VK2 A23/JK4	A	110 pM	160 pM
9D6	G2	VH5 5-51/D3 3-9 RF1/JH6	QGRSF-----YYYGMDV	VK2 O11/JK4	B	41 pM	16 pM

10

20

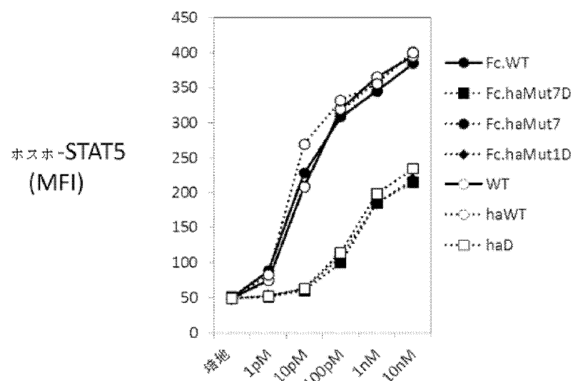
30

40

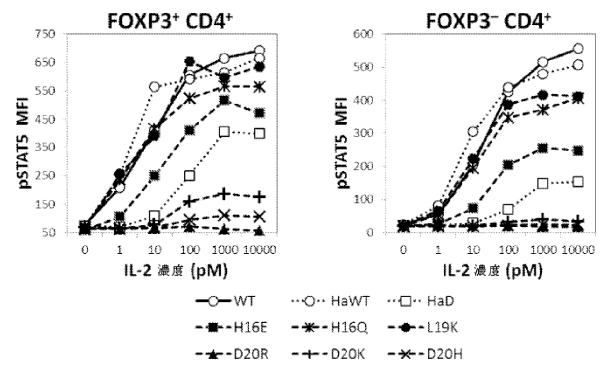
50

【図面】

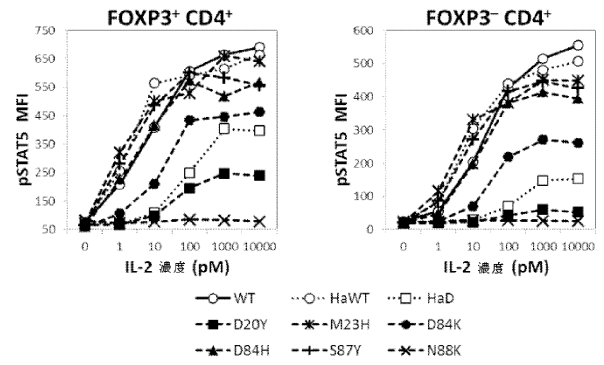
【図 1】



【図 2 A】

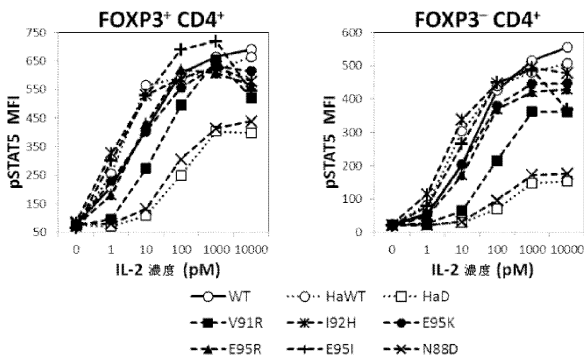
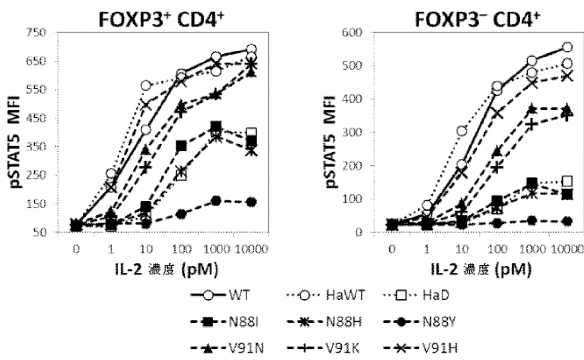


10

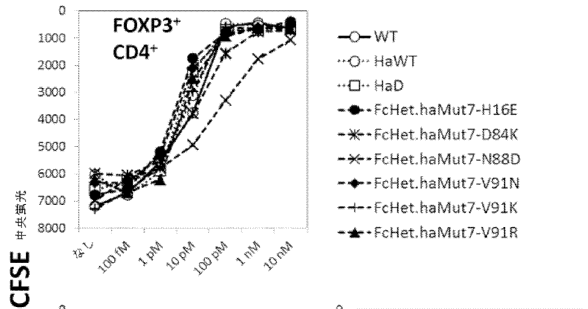


20

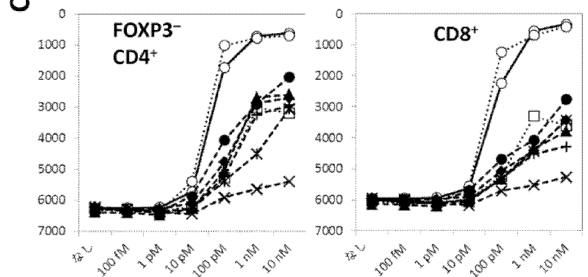
【図 2 B】



【図 3】



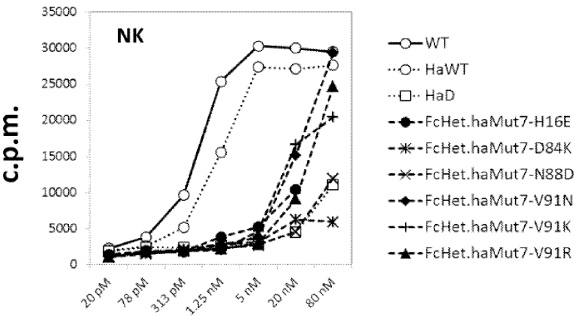
30



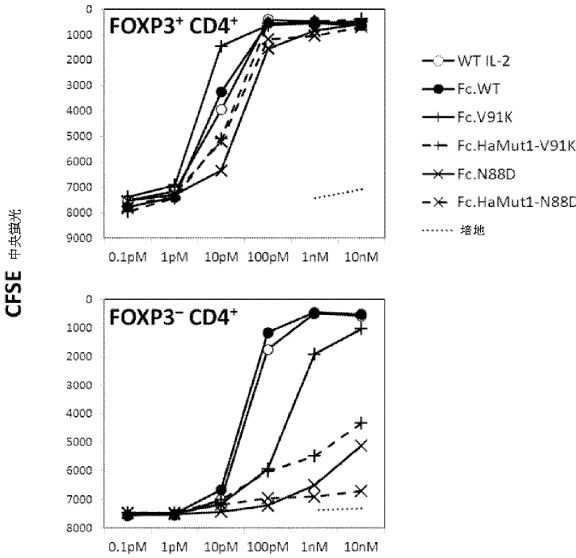
40

50

【 図 4 】

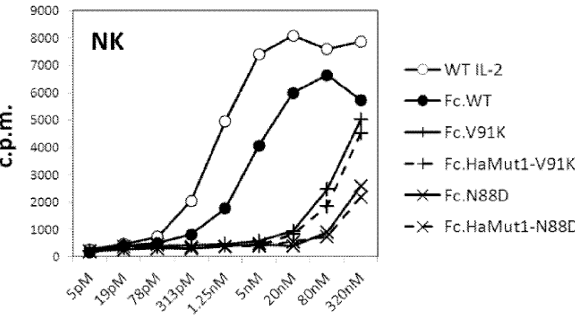


【 図 5 】

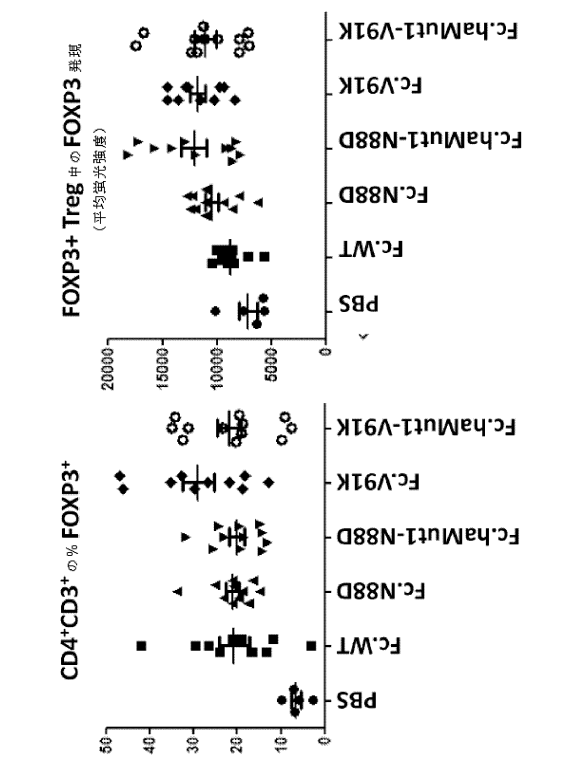


10

【 図 6 】



【 図 7 A 】



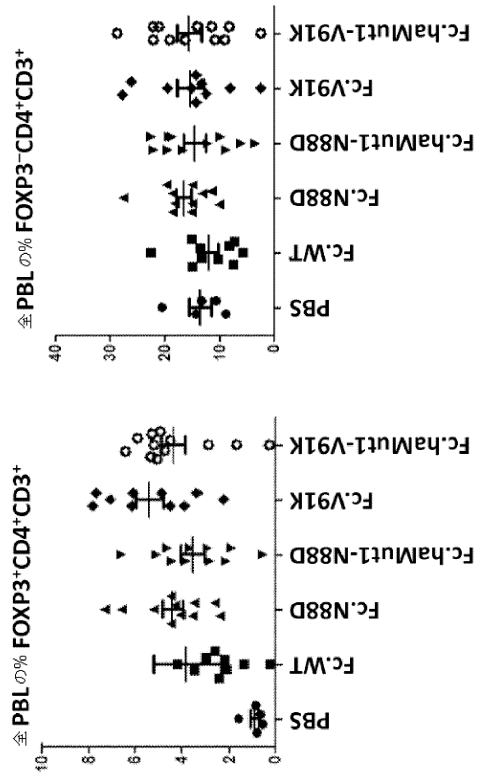
20

30

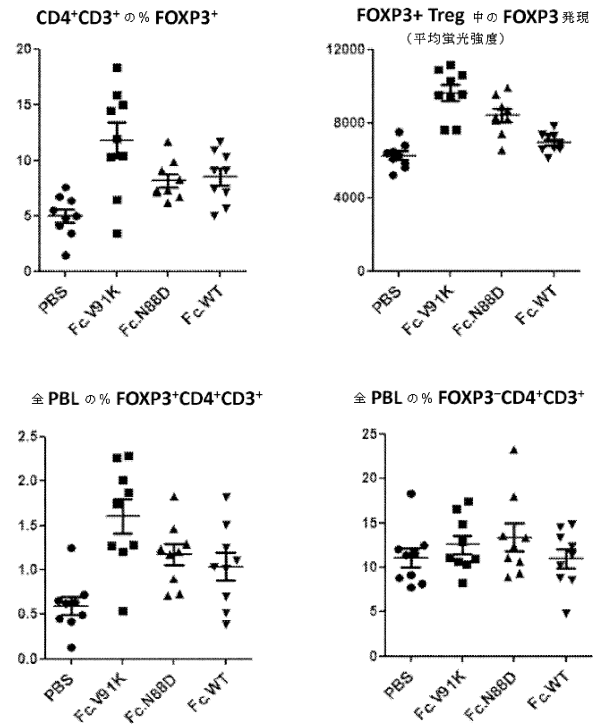
40

50

【図 7 B】



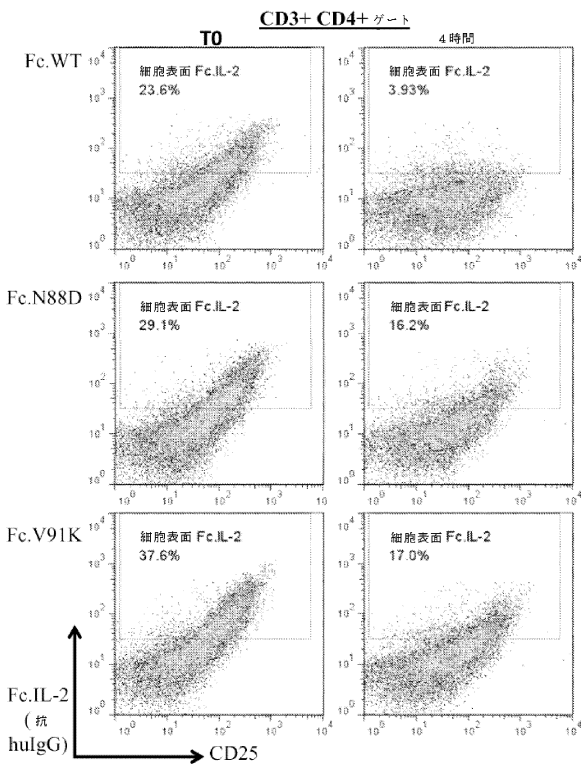
【図 8】



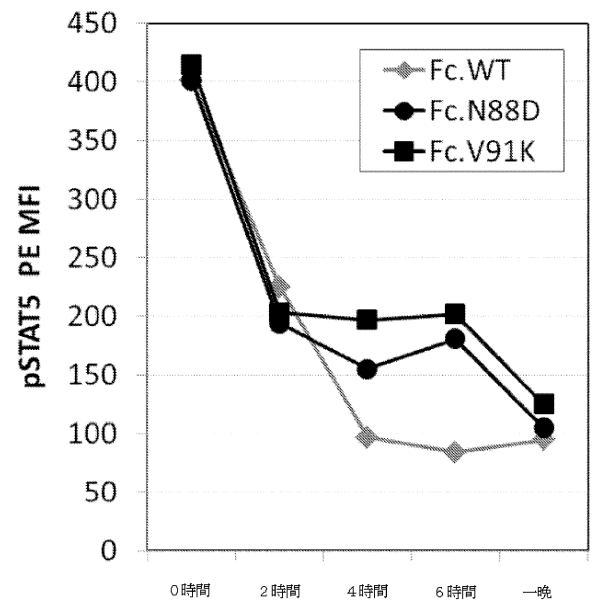
10

20

【図 9 A】



【図 9 B】

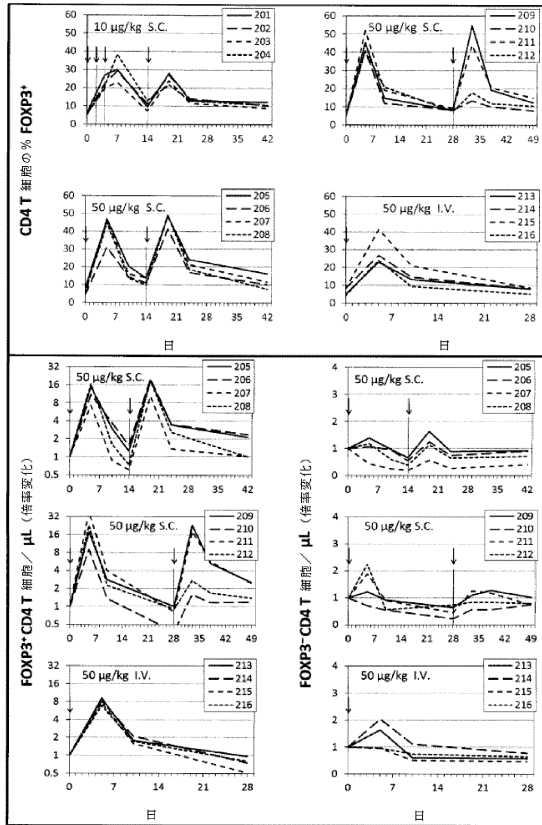


30

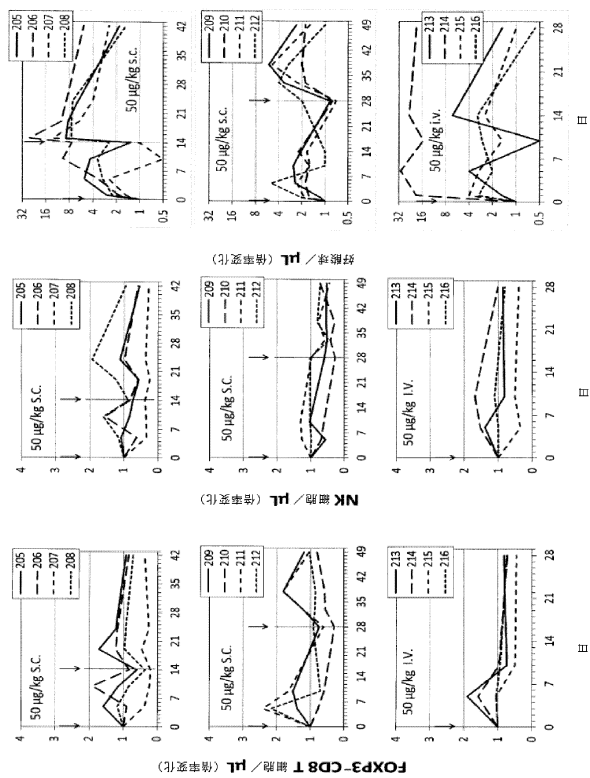
40

50

【図 10 A】



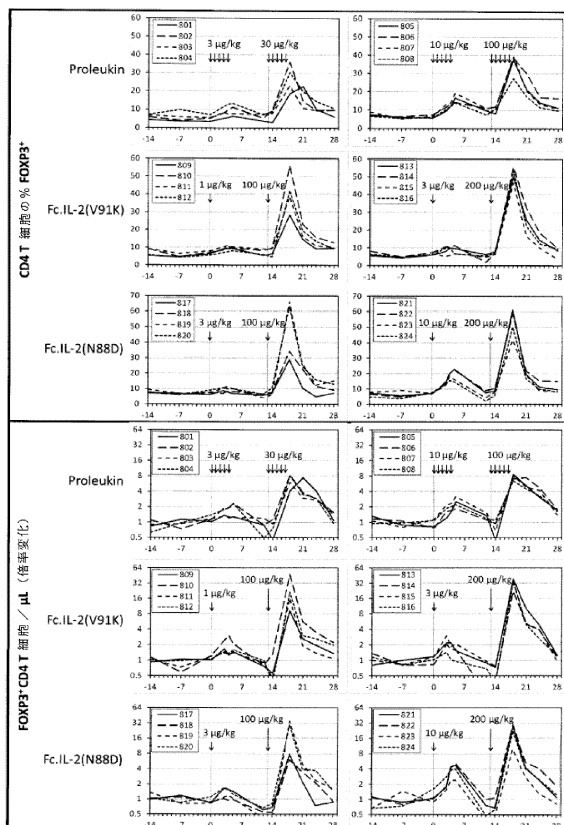
【図 10 B】



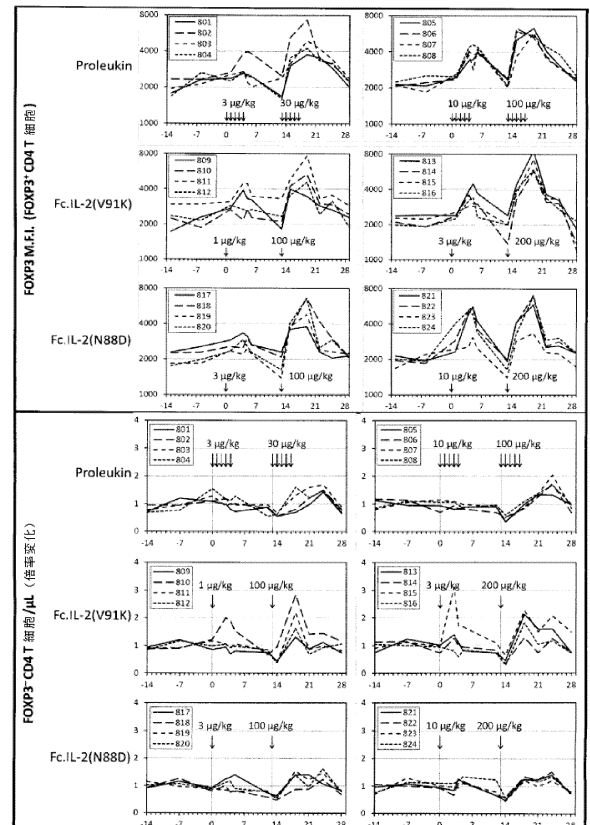
10

20

【図 11 A】



【図 11 B】

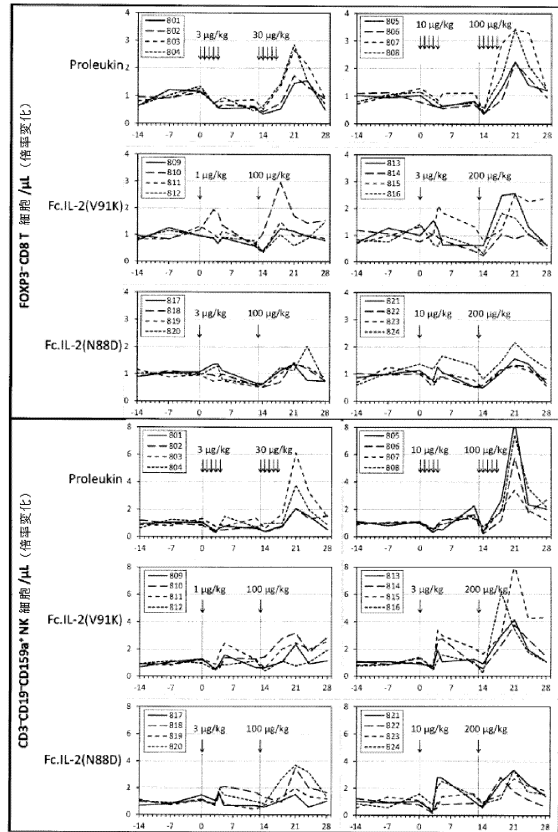


30

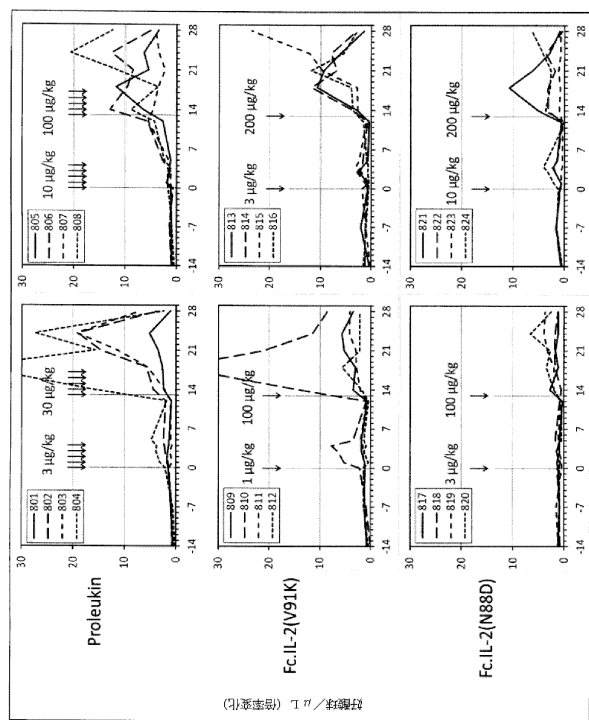
40

50

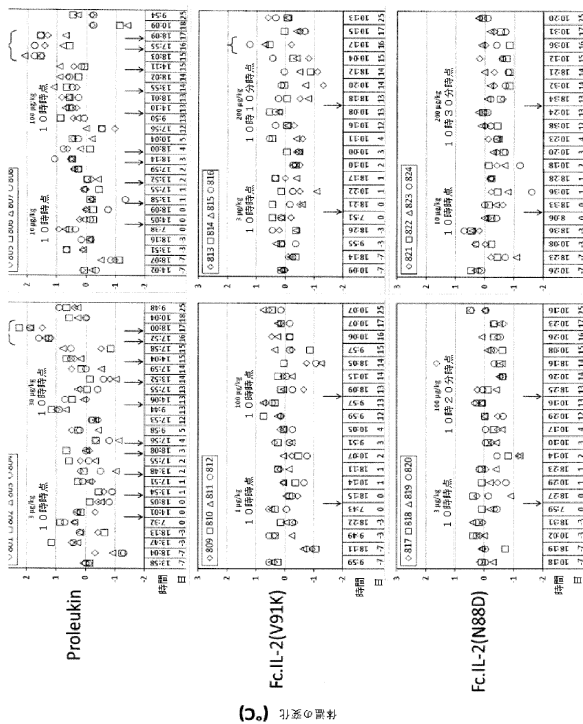
【図 11C】



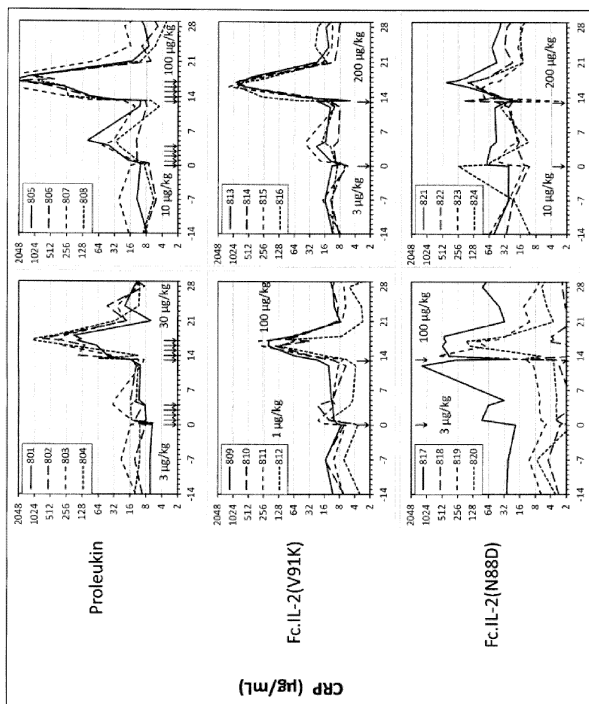
【図 11D】



【図 11E】



【図 11F】



10

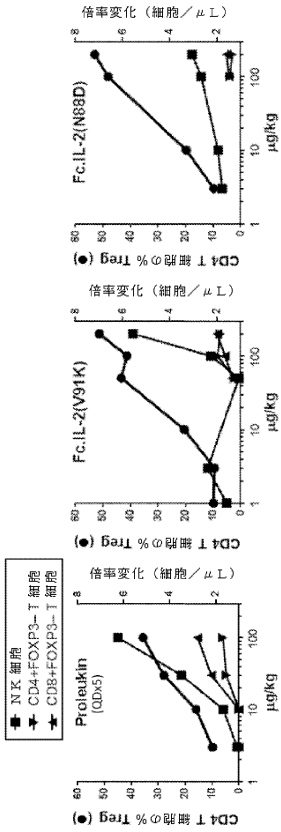
20

30

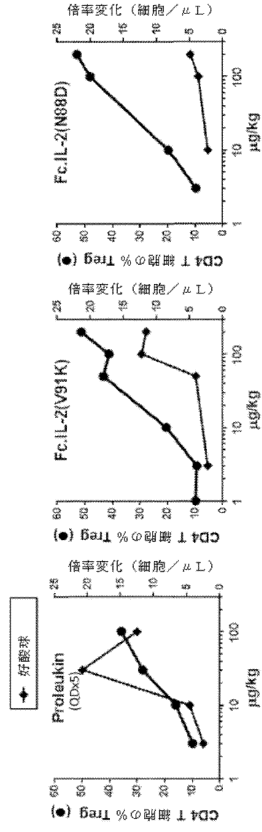
40

50

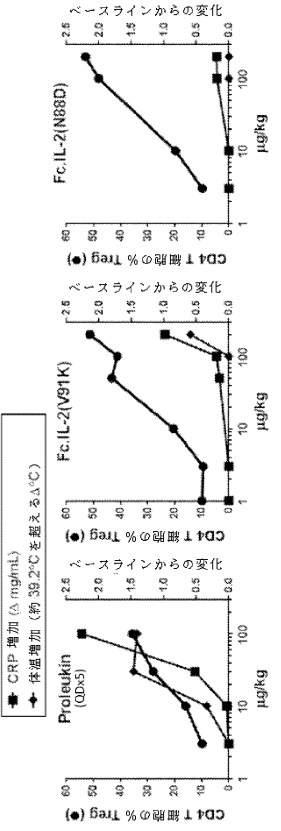
【図 1 2 A】



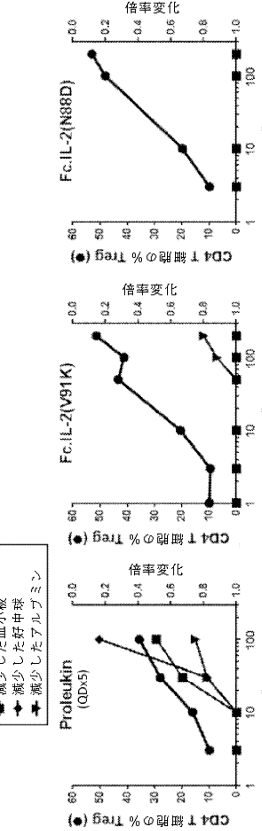
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 1 2 D】



10

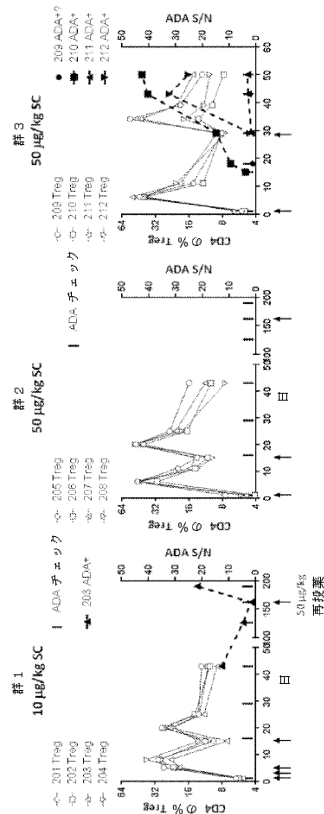
20

30

40

50

【 図 1 3 】



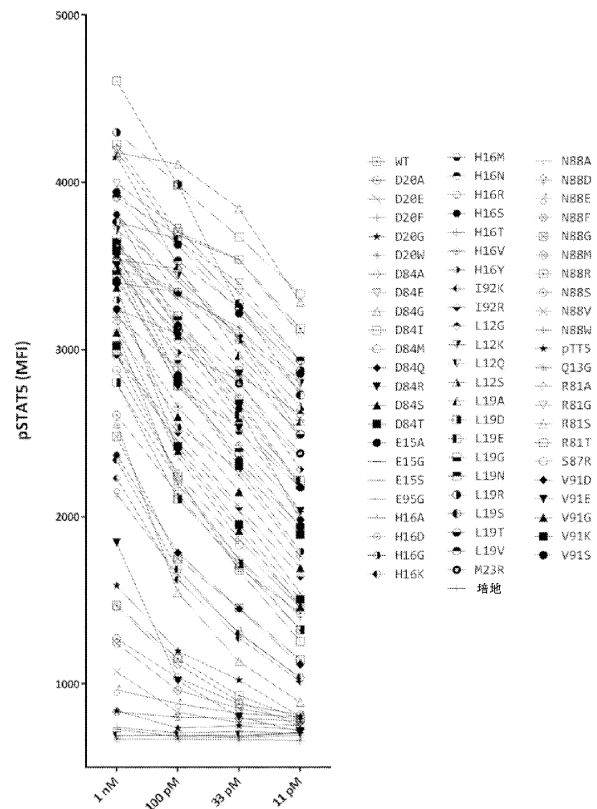
【 図 1 4 】

	L12	Q13	E15	H16	L19	D20	M23	R81	S87	N88	V91	I92	L94	E95
A	1.18	0.82	1.26	2.51	2.05	1.61	0.68	1.61	1.53	-0.1	2.13	1.22	1.04	0.21
D	0.49	0.81	0.99	2.39	1.17	0	0.41	1.19	0	-0.4	1.1	0.52	0.29	-0.2
E	0.93	-0.1	0	1.01	1.58	0.49	0.01	0.93	2.4	-0.4	2.15	1.89	0.75	-0.9
F	0.1	0.86	-0.5	0.97	-0.9	1.6	0.2	-0	0.98	-1.5	1.3	-0.6	0.18	-0
G	1.35	1.08	1.51	3.06	2.73	1.83	0.82	1.62	2.11	0.19	2.78	1.88	1.29	0.32
H	-0.1	-0	0.29	0.42	0.18	0.55	0.39	0.52	1.64	-0.3	1.69	0.5	-0.1	0.04
I	-0.1	0.45	0.06	0.91	0.73	0.74	-0.1	1.01	1.76	-0.9	0.25	0.98	0	0.48
K	1.19	0.25	0.85	3.98	-0.3	1.56	0.22	1.04	2.66	0.01	3.72	2.7	1.57	0.59
L	0	0.33	-0.1	1.47	0	0.57	0.14	1.11	1.16	-0.8	0.29	0.74	-0.3	0
M	1.09	-0.1	0.41	1.85	1.2	0.96	0	0.9	2.04	-1	2.17	1.09	0.72	0.09
N	0.26	0.66	0.68	1.58	1.31	0.16	0.26	1.38	0.66	-0.5	0	0.32	0.89	-0.3
P	0.89	0.24	1.01	2.18	0.97	0.86	0.34	1.36	1.18	-0.5	0.89	0.28	0.33	-0.1
Q	1.27	-0	0.21	0.94	0.98	0.61	-0.2	1.11	2.41	-0.2	1.46	0.73	-0.3	0.08
R	1.04	-0.2	0.48	2.69	1.17	1.33	1.19	0	1.69	1.15	2.19	1.23	1.8	0.47
S	1.35	0.85	1.3	2.73	2.33	1.25	0.89	1.71	2.06	0	2.19	1.54	0.8	0.24
T	1.11	0.6	0.88	1.91	1.58	1.16	0.67	1.69	2.3	-0.2	1.17	0.72	0.53	0.07
V	0.77	0.75	0.45	1.76	1.64	1.22	0.28	1.34	0.69	-0.3	2.2	-0	0.54	-0.1
W	-1.4	0.47	-0.7	-0.6	-2.4	3.88	0.08	-0.7	0.33	-0	2.88	-0.5	-0.3	-0.2
X	0.25	0.62	-0.2	1.55	-1.8	0.96	0.06	-0.3	0.82	-0.6	1.07	-0.4	-0.3	-0

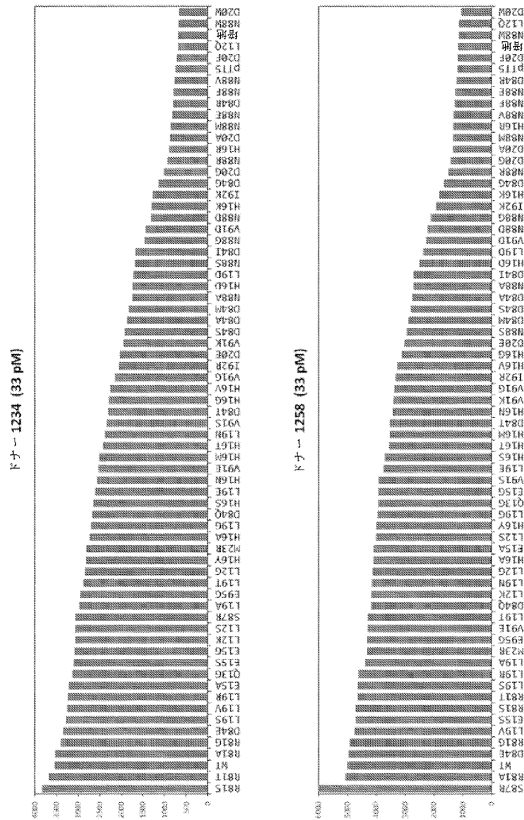
【 図 1 5 】

A	2.9	3.4	4.8	12.1	7.0	6.0	3.5	5.4	8.1	1.4	11.7	8.4	5.6	-0.3	6.5	E95
B	5.9	8.2	8.5	21.0	17.8			5.6	6.9		11.7	8.4	5.6	-0.3	6.5	E95
C	6.9	2.5		13.7	12.1	19.0	4.1	4.3	1.6	-0.4	14.4	13.5	9.8	0.1	3.6	E95
D	-3.0	-1.5	0.0	-3.9	-0.2	13.4	2.0	3.3	2.3	-7.7	26.4	0.3	4.1	-0.2	3.4	E95
E	3.2	4.8	6.4	15.1	9.8	6.8	3.8	5.8	9.8	2.1	13.5	12.8	7.5	-0.1	8.8	E95
F	4.4	1.1	-2.2	5.9	12.3	3.2	3.3	4.9	-5.9	21.3	4.2	12.0	-0.2	2.8	8.0	E95
G	1.2	3.9	2.2	2.9	1.9	4.6	0.9	2.5	6.0	-1.8	12.7	1.2	-0.2	4.1	8.8	E95
H	2.0	7.9	8.1			25.8	1.6	3.7	14.4	4.7	24.1	9.3	-3.0	1.3	8.6	E95
I	-4.2	-1.1	-3.5	3.1	-1.7	5.1	1.4	2.2	2.8	-2.3	1.9	0.5	-1.9	3.4	3.4	E95
J	-1.5	-0.6	-4.7	-4.0	-3.2	4.0		-2.2	7.0	-6.0	-0.9	-4.6	-7.4	0.0	-2.4	E95
K	-1.0	2.8	6.4	7.7	5.9	-0.4	2.3	5.3	4.7	-1.9	4.2	-1.8	-0.3	6.9	3.4	E95
L	2.4	2.6	3.9	7.1	7.0	7.5	3.1	4.7	6.9	0.2	13.1	4.0	2.1	-0.2	5.9	E95
M	0.9	0.2	-2.2	1.1	4.4	3.1	0.5	0.8	8.7	-2.7	3.0	-0.5	-5.7	0.1	1.4	E95
N	1.9	0.2	-2.2	1.1	4.4	3.1	0.5	0.8	8.7	-2.7	3.0	-0.5	-5.7	0.1	1.4	E95
O	1.9	0.2	-2.2	1.1	4.4	3.1	0.5	0.8	8.7	-2.7	3.0	-0.5	-5.7	0.1	1.4	E95
P	1.9	0.2	-2.2	1.1	4.4	3.1	0.5	0.8	8.7	-2.7	3.0	-0.5	-5.7	0.1	1.4	E95
Q	1.9	0.2	-2.2	1.1	4.4	3.1	0.5	0.8	8.7	-2.7	3.0	-0.5	-5.7	0.1	1.4	E95
R	1.9	0.2	-2.2	1.1	4.4	3.1	0.5	0.8	8.7	-2.7	3.0	-0.5	-5.7	0.1	1.4	E95
S	2.1	0.3	4.5	10.6	6.1	2.4	3.2	5.6	6.2	3.4	5.4	4.0	-4.5	1.3	4.7	E95
T	0.9	0.1	2.3	5.1	7.3	5.0	2.3	4.6	4.9	0.1	8.2	4.3	3.9	-0.5	4.2	E95
U	1.3	-2.1	2.1	7.8	3.9	4.2	2.0	4.8	5.9	0.4	5.6		1.4	-0.3	5.7	E95
V	-0.5	-1.9	-7.8	8.9	3.6	3.9	2.6	-0.5	-13.1	36.8	-0.9	2.9	-4.7	-1.2	3.7	E95
W	-0.5	-1.9	-7.8	8.9	3.6	3.9	2.6	-0.5	-13.1	36.8	-0.9	2.9	-4.7	-1.2	3.7	E95
X	-6.0		1.0	-3.2	4.9	37.4	1.7	2.0	4.4	-13.2	27.0	-0.6	5.4	-0.2	3.7	E95

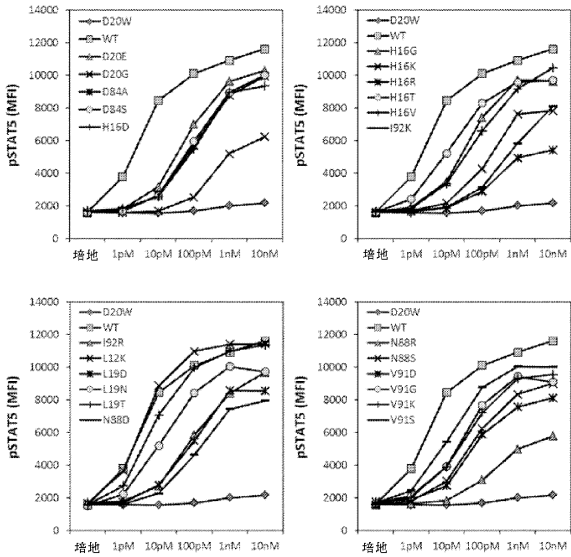
【 図 1 6 A 】



【図 16 B】



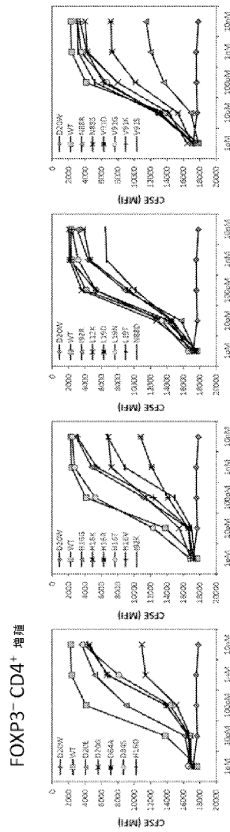
【図 17】



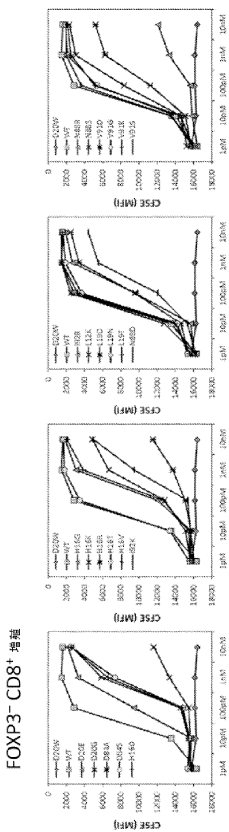
10

20

【図 18 A】



【図 18 B】

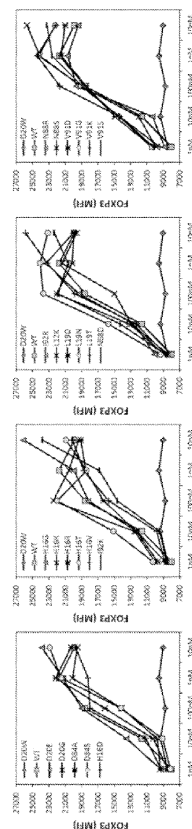


30

40

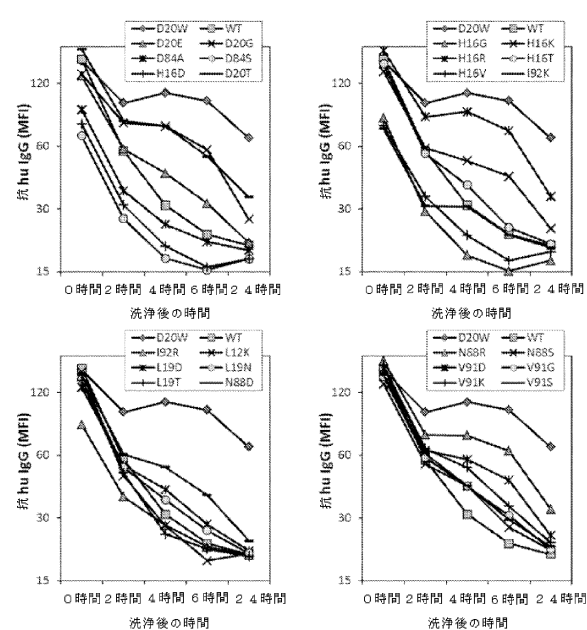
50

【 図 1 8 D 】



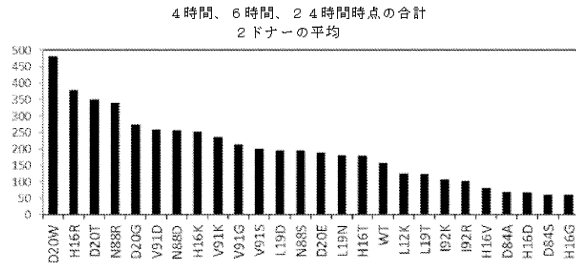
20

【図 20 A】

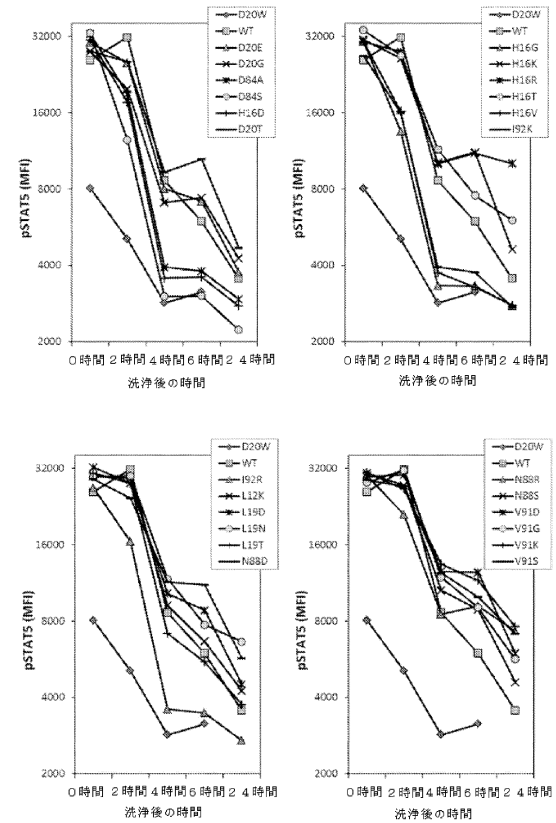


40

【図 20 B】



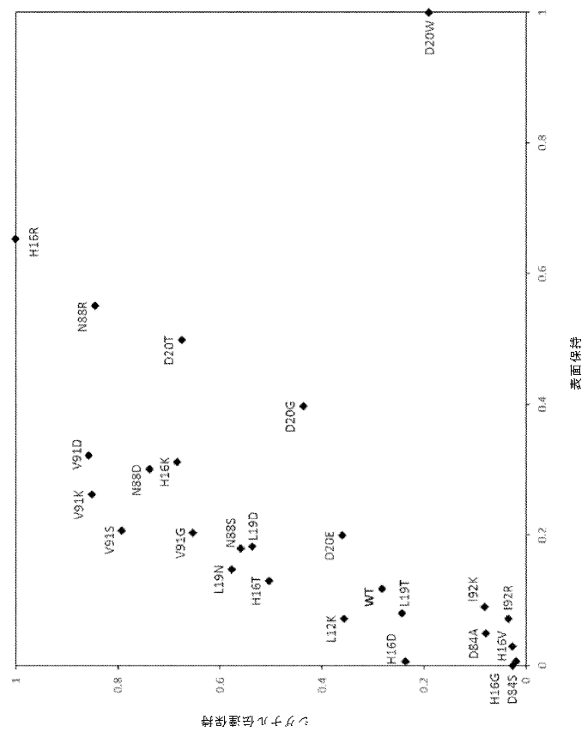
【図 21】



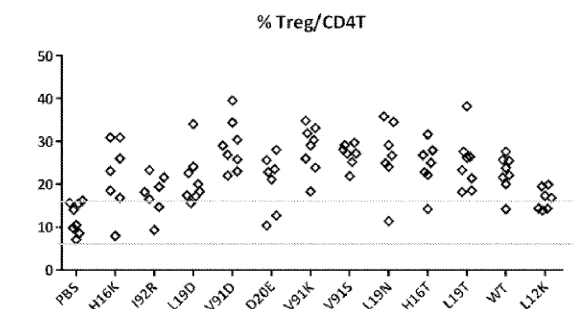
10

20

【図 22】



【図 23 A】

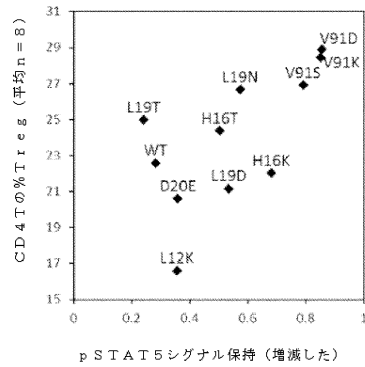


30

40

50

【図 2 3 B】



【図 2 4 A】

Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::IL-2(L12G, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(L12K, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(L12Q, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(L12S, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

【図 2 4 B】

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(Q13G, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(E15A, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(E15G, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(E15S, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

【図 2 4 C】

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(H16A, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(H16D, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(H16G, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_ 欠失 K):G4S::huIL-2(H16K, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFSPDAIWEVWESNGQPENNYKTTTPVL
DSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGSAPTSSSTKKTQGLLEHLLDLQMLINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP
KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVILELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

10

20

30

40

50

【 図 2 4 D 】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(H16M, C125A)

MDMRVPKELGLLLVLWRGARDCKTHTCPPCAPELLGGPSVFLPPKPK
 TRLMISRTPEVTCTVVDGSHDEPVKNFNVADGVVEVHNKATPREEQYS
 TYRVSLSTVLHQDWLVNKGYSKSNKALPAPIETKSKAGGPGEPQV
 VLPSPSEEMTKNLSCTLCKVGFPSDIAVEWSESGPENNKYTPPVL
 DSDGSEFYNKLVTKDSRWQQGVFNWMEALHNHYTKQLSLSPGGL
GGSAPTSSSTKTQQLQLEMLLQMLNGINNNKPKLTRLMTLTKFYMP
 KKATELKHQLCEEELPKLEVLNLQASKNFHLRPRDLINSLVLEL
 GSETTFMCEYADATIEFVNLNRWITFQAISSTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(H16N, C125A)

MDMRVAPKQLGLLLWLGRGAC DKHTKPCCPACELGGSPVYLPFKPKK
 TDLMSIRTEPVTCVYVDVSHDEKVFKNWYVDGVEVHNKATCPREEQYGS
 TYRVVSVLTVLHQDVLNGLKEYCKVSNKALPAIEKTSKAKGQPREPQV
 VYLPSPFSEMIKQVSLTCLVKIGYSPDIAVEFVSGENPNYKTPPVGL
 DSDGFSFLYSLTKVDKSRWQQGVNFCVSMEAHNLHNYTKQSLSPGGL
GGSAPTSSTKTQTQLNELNLQMSLGINNNKPKLTRLMTLTKFYMP
 KKAETELHLQCLEELKPLEVLNLQMSLGINNNKPKLTRLMTLTKFYMP
 GSETFMCEYADATIEFVNLNRWITFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(H16R, C125A)

MDMRVPAQLGLLLLVLRGARCCKTHCTPCCPAPELLGGPSVFLFPKPK
 DTLMSIRTEPVTCVTVVDVSHEDYCKVKNVPAIGEVHNAKTKPREEQYS
 TYRVLSSVTLVHQDWLVKESYCKVSNKALPADEIKTSKAKGQPRQPV
 TVLPSPSEEMTKNQLSSCTLCLVKGPSDIAVEVSEKQPNENYKTPPV
 DSDGFSGLTVLTKDSRVQGVNFVCSVMHEALHNHYTKQLSLSPGSG
GGSAPTSSSTKTKQLQLERLLDLQLMQSINKYNNKPKLRLMTKFKYMP
 KATTEHKLHQLCEEELKPEEVLINQKSNFHLRPLDLSINIVIVLEL
 GSEATFMEYADATEEFLNRIWITFAQSISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(H16S, C125A)

MDMRVAPLGLLLGLLLWLRGACDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPFKPK
 TDLMSIRPEVTICVYVDVSHDEPKVFKNWYDGVIEHNTKCPREEQGS
 TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYCKVCSNKALPAVEKITISKAKGPREPQV
 YLSPFSSEEMTKNQSLCTLCKVLGSPDIAVEVMEALGNQPNENYTKTPGL
 DSDGSGFLKTVKDSVRQWQGVNFCVSMEALHNHYTQKSLSLPPV
GGSAPTSSSTKTKQLQESLLDLQMLQINGLNRYNPKPLRLMTLFKYP
 KKATELKHLLQCEELKPLFEVLNLSKGNFNRPLDLSINNVLEIK
 GSETFMCFEYADETAFIEFLINWITFAQSIISLT

【 図 2 4 F 】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(L19D, C125A)

MDMRVPQVLQLGLLLLVLRGARCDKTHCPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK
 TRLMSIRTPAQVQLVQVDSHDEPKVFNWVDPGEVHNKAKTPREEQGS
 TYRVLSVLTVLHQDWLQNGHVKCVSKNKPADGIECTISKAGQGPAPQV
 YSEETRMENRKNQVSLCTLCKVGFPSDIAVEWMEALNGQPKNNYTPPVL
 DSDGFFSLYTKVDKSRWQQGVNFWGSEAHNNHYTKQSLSPGGGG
 GGSAPTSSSTKTKQLQLEHLDDLQMLNGINNNYKNPKLTRLMTKFVMP
 KKALETKLQCLEELPKLEVLNLAKSNFHLRPLDNLGINVLELKG
 GSETTFMCYEDATIEFVNLIRWTFAGSIISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(L19E, C125A)

MDMVRPAQLQLLLWLRLGARCKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
DRLMSIRTEPVTCVNDVSDHEPVKFNWPDVGEVHNKATKPRREQYQ
TYRVSLVHLQDQWLNGEKYKCVSNKALPAFVETISKAGQPGPQV
VLPSPSEEMFQSLQSLTCLVKGVPSDIAVEHMEANGPKENKSTPPL
DSDFGFFSLYLTKDKSRWQQGVNFSWALHNNHYTKQSLSPGGG
GGSAPTSSSTKTKQLQLEHLLDQLMILGINNYKNPKLTRLMTKFKYMP
KRATELHLKLEFEEELKPLLEVLNLAKYATFHLRPLDISLINVLEL
GSETTFMFCDEADATEFIVNLRTWFAQSISTL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(L19G, C125A)

MDMRVP^{AEQV}LG^{LLLV}WLRG^{ARCD}IT^{CT}CP^{CP}CA^{PE}LL^{GG}PS^{VFLP}PK^{PK}
 TL^{MS}IR^{TP}PA^{VL}QV^{LV}DV^{SD}HS^{DE}PK^{FN}VN^{PD}GE^{VE}HN^{KA}CK^{PR}EE^{QS}
 TY^{RV}LS^{VS}YL^{VL}HW^{DQ}WL^{NG}KEY^{KV}CK^{VS}NK^{AL}PA^{DI}ET^{SI}AK^{AG}GP^{RP}QV^{TV}
 YD^{SG}FF^{SL}EY^{MT}KN^{QV}SL^{TC}LK^{VL}GV^{PS}DA^{VE}HW^{ES}NG^{PN}EN^{YK}TP^{PL}VL
 D^{SD}SG^{FL}Y^{SL}TK^{VS}YD^{KS}RW^{QQ}GN^{VS}CS^{IA}ME^{HN}HY^{TK}OL^{TS}SP^{GG}
GGSA^{PT}SS^{SK}TK^{QT}KL^{QL}EH^{LL}GL^{DL}QML^{NG}IN^{NY}NK^{NP}LR^{ML}TK^{FM}Y^{MP}
 KK^{AT}EL^{HL}QK^{LE}EL^{PK}EE^{LV}LN^{AS}Q^{FN}LR^{PL}HD^{LN}IS^{IN}V^{LEL}
 GS^{ET}FM^{CE}Y^{DA}TE^{IF}IV^{FN}LR^{QK}TS^{SI}LT^{SL}

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hulL-2(L19N, C125A)

MDMVRPAQLGLLLWLRGARCKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
 DTLMSRTPVTCVTVVDVSHDEPVKFNWYVDGVEVHNKATKREEQY
 YRVYISLTQLHDQWLNGKEYKCVSNKALPAFQITKASKAGPQPV
 YLTPSPSEFMTYSLQSLTCLVKGFPYSIDVMEWMSGNPKENYITPPL
 VDSGGFFSLYKLVKDSRWQQGVNCSVIAHEHNHYTKOATLSPGGG
 GGSAPTSSSTKTLQLQLEHLNLDQLMILGINNYPKPLRMLTKFYMP
 KSTATLHLQLEELFLKLEVLNLNADKFTFLPRDLISNINVLK
 GSETFMFCYEADATEFIVNLWITFASQIISTL

【 図 2 4 E 】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(H16T, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRGARCKPTKTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPK
 DTLMSRTPVECTVNVVDVSHDEKVFKNWYVDGVEVHNAKTPREEQYGS
 TYRLMSVLLVHQDWLNGKEYKCVSNKALPAPIGTSKAKGQPREPQV
 YDPSFSEETIMNQSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGNGPNYYTKIITPPVL
 LSLGPFVYSLKLTQLKSRWQQGNFSPVMEAHHNHYTKQSLSLSPGGG
 GGSAPTSSTSKTKQLQSLDQLMILGNINYNKPKLRLMTLFKFPYM
 KATELKHQLQEELEKPIEELNLIAQSNFKLRPRDLISINVINIVYLE
 GSEITTFMGADETAIVFLNVLNLIAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(H16V, C125A)

MDMRPTEVQLGLLLWLRGARCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPK
 TLMISRTPAQVLLVVSDVSHDEPKVFHNVGDEVHNAKTPREEQYGS
 TYRVSVLTVLHQDVLNKGREYCKVSNKALPAIEKTIKASKAGQPREPQ
 TVLPPSEEMKNQNSVLTKLVKGYSPIADVEAVSEKQPNKYTKTPVL
 DSDGGFFSLYSVLTKSRWAGQNVFCSVMHEALHNHYTKQVSPGGG
 GGSAPTSSSTKTKQLQEVLLDLQLMILNGNINYNKPKLTRMLTFKYFMP
 KKAELIKELQGLDEEELKPEEFLNVLIAQSKNFHRLPRDLSINIVVLEK
 GSEITTFMCEYADEETFLPFLNLVLAQSTIQAISITSL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(H16Y, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLIRGARCDTHCTPPCAPELIGGSPVIFPPKPK
 TYLMSRTEPVTCVVQDVSHGEDPKVFKNVQDGVGVHNAKTKPREEQYS
 DTRVLSITLVVVQDVLNKEKYCKVSNKALPAIEKTIKNAAGKGPREEQS
 YLTPPSEIEEIKQVLSQVLKVGKFSPIADVEWHEALNGNNTKPTPVL
 DSDGFFYSYKITYDKSRKQGVNFVCSWMEHNNHYTKSIISPGGG
 GGSAPTSSSQKTEQLQYEVLLDLQLQNLINGNPNPKLRLMTLTKFYMP
 KKATEKHLKQCEKKEPLLEVLNKAQSNKFNRNDRPLDSINIVVLEK
 GSETFMCEYADETATIFVFLNRWITFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(L19A, C125A)

MDMVRPAQVLGLLLVLWRGACDKTHCPPCCAPELGLGSPVLPFPKPK
 TLMISRTPEIIVQVVDSDHDEPEKVFNVNVDGVEVHNAKTKPREEQGS
 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQV
 TVLPSPSESRMNTKQVSLTLVKGFISPDIAVEFVSNHGPNYNNITPPVL
 DSDGDFYSKSLTVKDSRWGQGVNFCVSMHEALHNQYTKSLSPGGL
 GGSAPTSSQLQTEQLQHELLADQLMILNGINNYNPKPLTMLTKFYMP
 KKATEKHLKQCLEELKPEEVLINCKNSKFHRRPDLISNINVIVLEK
 GSEITFMCEYADETATIEVFLNRWITFAQSIISTL

【 図 2 4 G 】

IgG1Fc(N297G 欠失K)::G4S::huIL-2(L19R, C125A)

MDMRVPQAQLGLLLWLRGARDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLPPPKK
DTLMSRTPVTCVVDVSDHEPVEKFNWYVDGVEVHNMAKTPREEQVGS
TYRVSVLTVLHDWLNGKEYCKVSNKALPIEKTISKAGQPREQV
TVLPSREEMTKNQSLTLVKGFPYSDIAVEWESJNGPENNNTYTPVL
DSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFCVSMHEALNNHYTKQSLSLSPGG
GGASPTSSSTKTKQLQLEHLRLDLMLINGMINKPNKPLTRMLTKFYMP
KATELKLHLQLEELKPLEVLNLQAQSNFHLRPRLDSINNVIVLEL
GSETTFMCEAYEVEFLNWRVFLNRWVFLAQSIIST

IgG1Fc(N297G_缺失K)::G4S::huIL-2(L19S, C125A)

MDMRVPQAQLGLLLWLRGARCDKTHCTPPCAPPELLGGPSVFLFPKPK
DTLMSRTPETVCVVVDVSDHEPEVKFNWYVDGVGEVFNMAKTKPREQVGS
TVIRVSVLTVLQDNLWGKEYKCVSKNALPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPSRVLMHKNQSLVTLKVGFSYSDIAVEWESNGKENNYTKTPVL
DSGDSFYLKSLYDKSRWQQGVNFSVCMHEALNHHYTKQSLSLSPGGG
GGGASPTSSSTKTKQLQLEHLSDQLMILGINFKNQPKNKLRLMTLTKFYMP
KATELKHLLQLEELKPLFVLNLQAQSKNFHRLPRDLISNINVLK
GSETTFMCEYADEFLVFLNRWITFAQSIISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(L19T, C125A)

MDMRVPAAQLGLLLWLRGARCKDTHTCPPCAPPELLGGSPVLFPPKPK
DTLMSRTEPTVTCVVDDVSHDEPEVKTNWYVDGVEHNAKTPREEQYGS
TVRIYVSVLTVDQWLNGKEYCKVSNKALPIEKITSAKGQPREPQV
LTPPSREEMKTNQVSLCTLVRQYSPDIAOVEWSENGEPNQKNTTPVL
DSQGSFLYSLKTVDKSRWQQGVNCSMHAEHLNNHYTKSLISLPGGG
GGSAPTSSSTKKTQLQLCHLLTDLQMLINGNINYNPKLTRLMTKFPYMP
KKAATELQLCQLEELKPEELVNLQAQSNHRLRPDLISINIVLELCK
GSETTFMCEYDAETIVEFINWITFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L19V, C125A)

MDMRVPQAQLGLLLWLARGARCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLPPKKP
DTLMSRTPVTCVVVDVSDHDEVKFNWYVDGVGVENNAKTPREEQVGS
TYRVVSVTLVHLDGMDKEYKCVKSNALAPIETKSIAKGQAPREPQV
TVLPSREEMTKNQSLVCLVKGFSVDIAVEWESINGPENNYKTPVPL
DSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALNNHYTKQSLSPGGG
GGSAPTSSSKTKQLTQLQLEHLVDLQMLGNNGNNKPKLTRLTKFYMP
KKAETLHKTKQLEELFKPVEVLNLAQSKNNHRLRPRLDSINNVLELK
GETTFMCEYADEFTFLNWRVYTAQSIIST

【 ㄨ 2 4 H 】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D20A, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRLRGARCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
DTLMSIRTEPVTCVVVDYSDHEDPEVKFNWYDGVGEINNAKTPREEQYGS
TYRVSFLTEHQDWLNGKEKCKYSNKAAPLEIKTSKAGQPREQPV
YLLVPSVRLHMQSLVLTCLVKGLYISQDAIEVEWESMGAPENNYKTPPV
LDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMWEALHNHYTKQSLSLSPGGG
GGSAFTSSSTKTQLQHELLALQMILINGINNNKPKITRMLTFKYFMP
KGAETLTKQLKEELQPLVEELNLAQSKNFHLRPDLISNNIVLELQ
GSETTFMCEYADETATIEFLNRWITFAQSISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D20E, C125A)

MDMRVPQALLGLLLWLRLRGARCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
DTLMISRPTEPVTCVVVDYSDHDEPEVKFNWYDGVGEVHNNAKTPREFQGS
TYRVVSLTVLHQDWLNGKEYKCKSNKAAPLEIKTSKAGQPREPQV
VLPSSPESTGLSLSTCLVKGFISPDIAEVESMGSGENPNKYTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFSVSMVHEALNHHTYQKSLSPGGG
GGSPATSSSTKTKTLOQLLEHLQMLINGLINNYNPKLRLMTLIFYMP
KKAETLKLQCLEELPKLEEVLNLAQSKNFLHRLPDLSINNVVLEL
GETTFEFLVYDQETATVEFLNRIWTFQASISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D20F, C125A)

MDMRVPQALGLLLWLIRGARCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVYDSHDEPEVKFNWYDGVGEINNAKTPREEQYGS
TYRVLVSFLHMQDWNLQGEYKCKYKNALPAIEKTIKSGAQPREPQV
YTVPSLSEETVGLQSLTCLVKGFPYSDIAVEWAPMKGQPNENYKTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCVSMHEALNHNYTKSLSPGGG
GGSAKPSSTTKTQLQLHELLFLQMLINGLIMNKNPKLTRMTFKFYMP
KKAETLKHLSQLEELPKLEEVLLNAQSKNFHLRPNLDISNNIVLEL
GSETTFMCEYADETAFIPEFLNRWITFAQSIISLTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hull-2(D20G, C125A)

MDMRVPQALLGLLLWLRLRGARCDKTHTPCCPAPELLGGPSVFLFPPPK
DTLMISRTPEVTCVVYDSHEDPEPKFNWYVDGVGEVHNAKTPREEQGS
TYRVLVSFLVHLQDWLNGEKYCSNKALPAIEKTIKSAKGQPREPQV
VLPSPSEEMTKNQSLCTCLVKGFISPDIAEVESMGQENPNKYTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCMHEALNHHTYQKSLSPGGG
GGSAPTSSSTKTKQLQLHEHLQLQMLINGIMLNPNKPLRMLTKFYMP
KATELCKHLQLEEFLEPELVNLQAQSNFHLRPDLISNINVLEL
GSETTFMCHYADETAIEFLNLRWITFAQSIISLT

【图 24 J】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(R81S, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLWRGARDKTKTHCPPCAPELLGGPSVFLPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVFNIAKTKPREEQGS
TYRVVSVLTVLDQHWLDQKEYKKCVCKSNALPAIEKTIKSAKGQPREQV
VLPDPSSEETMKTVSLQVLCGLKFGYPSDAIVEWSMGQENNNYTKTPVL
DSGDSFFLYSLTVDSKRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
GGSAFTSSSTKTQLQHEHLLEQLMIQINGINNYKPKLTRLTKFYMP
KSETLKHQLCLQEEELPKLEEDLVNQLKSNKFHSLPDISLNINIVLEL
GKATTEKMEYADATEIVFLNRWITFAQSIIST

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(R81T, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRLGARCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
 TRLMSRTEPVTVCVVVDVSHDEPVKFNWYVDGVEVHNNAKTRREEQYS
 DYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKSNALPAPKEIKTIASKAGPQRFQV
 VLPSPRSEMTKNQSVLTCLVKGPYSDIAVEWESMGNGKNSITTPPVLL
 DSDGSEFYLKSLTVLQKRWQQGNVSCVMIHNNHYTKQENKSLPSGGG
 GGSAPTSSTSKTKQLQELHLLDLMQLINGNNYKNPKLRLMTLKFYMP
 KATELHKLQLEELKEPFLVNLNQAKFTLPRDLISNINNVLELKG
 GSETTFMCEYADETATFVNIWQSFTAAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D84A, C125A)

MDMRVPQAQLGLLLWLRGARCKDPTKCPCPAPELLGGPSVFLPPKPK
 TYLRMSPTPEVTCVNVVDVSHDEKVFKNWYVDGEVHNNAKTPREEQYQ
 DTVSVSLVTLHQDWLNGKEYKCVSNKALPADIETISIKAGKGPQGV
 VTLVSPREEMTKNQVSLTCLVKGPSDIAVEWESMGQENNYKTPPVL
 DSDGFFVYSKLTVDKSRWQQGVNFCVGMHEHNHYTQSLQSLSPG
 GGSAPTSSTSKTKQLQELHLLDLQMLINGNKNPKLTRLMTLKFYMP
 KATEKLHLQLEELFKLPEVLNLASQFHLFRPALISNINIVLEL
 GSETTFMEYADETAIVELFNWQKFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D84E, C125A)

MDMRVPAQQLGLLLLWLRGARCKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPK
 DTLMSRTEPVCVTVWVDSHEDPEVKFNWYDVGVEVNAKTPREEQVS
 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCVSKNALGVETHTISKAGQEPQV
 VLPYPSREEMTKNQVSLTCLVKGPYSDIAVEWESNGQPENNYTKTPTV
 DSDGTSFYFLSKYLSIRLRWQQGVNFCVMEVHHNHYHTQKLSLSPPGL
 GGSAPTSSTSKTKQLQLEHLLDLQMLINGNNYKNPKLTRMLTKFYMP
 KATEKILHLQLEAEFLKLEVLNLAQSKFNHLRPRELSININVLK
 GSGTFMECYADEETAFIVELFVWQAITSSTL

【圖 24 I】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D20W, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRGARCDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPKPK
 TLMSIRPTEVTVVVDVSHDEPEVKFVNVVDGVEVHNAKTHPREEQYGS
 TYRVYSLTVLHQDVLMDLVNGKVEYKSNKALPAKTIKTSKAGKGGPQQ
 YTLPPSREEMTKNQVSLCTLVKGFPYSDIAVEWSNGPNQENYTKTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVNVCVMVHIALHNHYTQKSLSPSGG
GGASSTSSSTKTKQLQLHEHLVLMQILNGINMEANKPKLTRLMTKFKYMP
 KKAATELHLKQLEELPKLEVLINLKAQCSNFHLPRDLDSKNINVLIELK
 GSETTFMCEYADETATIEFLNRWITFAQSISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(M23R, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRGARCDKTHCPCPAPELLGGSPVLPFPKPK
 TLDMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVVEHNAKTKPREEQYQ
 TYRLVSLQRVADQLWLNKGYCKVSNALPKPIETKSKAKGPRELPQV
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
 DSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLPGGG
GGASSTSSSTKTLQLEHLLDLQRLINGNINPKLNRIVTGFKYPK
 KATELKLQCLEELPKLEVLINAKQNGFLHRLPDRLINRVMLTLEK
 GSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFAQSISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(R81A, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRGARCDKXTHCPCPAPEFLGGSPVFLPPKPK
 TLDMISRTPEVTVCVVDVSHEDPEVFNKVNAPDIEVHNAKTKPREQYGS
 TYRVSLVTLHQDWLVLGNKVEYKSKNKPAGVETIKSAKGQPRREQY
 YTLPPSREEMTKNQSVLTCVLQGFYPSDAIEVWESNGPKNENYKTKPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGVNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSPSGG
GGASPTSSSTKTKQLQHLLDLQMLINGNLNPNKPLRMTLTKFYMP
 KATEKLHLQCKLEELKPLEEVLNHLQSCNFIHLAPRLDSINNVLELK
 GSETTFMCEYADEETLVEFLNLRWITFAQSISTLT

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(R81G, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGARDKTHTCPCPAPELLGGPSVLFPPPKP
DTLMSRPEVTVCUVVDWDEPEVKFNWYDGVGEVHNAKTPREEQYGS
TITVYPTVLTLMQDVLNGEYKCKSNKAPAEIKTSKAKGQPREQP
YTLPPSREEMKNQSVLTCLVKGVGSAIVESFSGGPNENNYKTPPL
DSGDSFFLYSKLTVDSRWQGGNVFSCVMHEALNHMYTKSLSLSPGGG
GGGATPSSTKTKTQLQEHLLDLQMLINGILNPNKPLRMLTKFYMP
KATELKLHLEDEELKPLPEEVNLQASKNFIHGPRDLISNINVLELK
GSETTFMCEYAEETVFLNRWITFAQSISLT

【 図 2 4 K 】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(D84G, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRLRGARKDKTKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPFKPK
 DTLMSRTPETVCVVDVSDHEPEKVFNVVGDVEVHNAKTKPREEQGS
 YTVISVLTQLHQDWLQDEYKCKSNKALPAKQKSKAGKQGP
 YTLPSREEMTKNSVLTCLVKRGYPSDIAVEWESNGPENNNYKTPVL
 SDGSFFLYSKLTVDKSRVQGVNFCVSMVHEALHNHYTKRLSKLSLSPGGG
 GGSASTYSSKTKQLQLEHLLDQLMILNGINNYKNPKLTRKMLFKYFMP
 KKATELKLQLCEELPFLVLNLQAQSNKFLRPLRGLISINIVVLEL
 GSETTFMCEYADETAFIEFLINVLQYQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hull-2(D84I, C125A)

MDMRVPAQLGLLLLVLRGARCQKTHTPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKK
 TDLSIRTPETVCTVVVDVSDGHEPEVFNWYDGVFVHNNAKPRPEYQGS
 TYRVSVLTVLHQDLVNLGKCYKSNALPAPIETKSIAKQGPREEQY
 YLTPSPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEHESNGPENNYKQTPPVL
 DSDSFFELYSKLTVDKSRWQQGNFVDSMEAHHNHYTQKSLSLPGGG
GGSAPTSSSTKTLQQLLEHLLDQLMILINGINNYKNPKLRLMTLKFYMP
 KKAETELHLQLLEELFLPEELINLAQSKNHLRPLRIISININVLLEK
 GSETTFMCEYADETATIEFLVFNLTQYSAHSITSL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D84M, C125A)

MDMRVPAQQLGLLLWLRGARGCDKTHTCPDPAPELLGGPSVFLFPKPK
 TDMISRPTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYQGVHVNATHKAPRREEQGS
 TYRVSVLTVLHQDWLQGVKSNKALPAIEKTISKAKGPQKRP
 YLTPSPREMTKNQVLTCLVKGFYPSDVAEHWANGLQPGENNYKTPPVL
 SDGSFYLVSSTLVKRSKRWQGVNFCVMEALHNHYTKSLSLSPGGG
 GGSASFTYKSTKLTQLQLEHLLDQLMILINGINNYKNPKLTKTFKYPM
 KKATELKLQLEELQKPLEEVLNLAQSKNPLFRPRMLISKNINVLLEK
 GSETFMCEYADETATIVFLNRLVQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(D84Q, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGARDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPFK
 TRLMSRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVGEVHNKATPREEQVS
 TYRIVSLVLDHQDWLKEVDKCSNKALPAKGLSTKAKGPPQGV
 YLTPSPREEMTNQVSLTCLVKGPYSDIAVEWESNGKNQSYKTPPVL
 DSGPSFYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALNHYHTQKSLSPSGK
GGASPTSSSTKTKQLQLEHLIDQLMILINGINNYKNPKLTRMLTKFYMP
 KKATELKLQLEELFLPKLEVLNLAQSKNPLRPRQLSINNVIVLEK
 GSETTFMCEYADEETATFVELVLTWQAISSTLS

【 図 2 4 L 】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hull-2(D84R, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGARDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLPPKPK
DTLMSRTEPVTCVVVDVSDHPDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSLTEKQDWLNGKEYKVKSNALAPAEIKTSIAKQGPQRPQY
TVYVPSVLEETMVDQLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGKENNYTKTPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMYHEALHNHYTQKSLSLPGGQ
GGSAFTPSSTKTKQLEQLLELIDILQIMLGINNYNPKMLTMLTKFYKMP
KKAETLKLQQLLEQLPEEVLNLQAQSNKFHLRPRRLSINNVVLELQ
GSETTFMCEYADETAFIVLRNWTFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(D84S, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGARDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
DTLMISRTPEVTVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQGS
TYRVVVSELTMTQDLWLNGEKVYSNAIAPEIKTSKAGKQPREPQV
VLPSPSEEMTKNQSLTCLVKGFISPDIAEVESWNGQENNNYTKTPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMVHEALNHHTQKSLSPGGG
GGAPTSSKTKTQQLQELHLLDLQLMGINNNYKPKLTRMLTKFYMP
KKATELHKLTQDEELKPLEEVFLNQLNSGIRLRPPSLNSINNVIVLEK
GSETTFMCEYADEAFVFLNRIWITFAQSIIST

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(D84T, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLRLRGARKDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLPPPKP
DTLMSIRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQGS
TYRVVVSTVLTQNDVLSNGKEYKVKVSKALWEPKITSKAGQPQRPQV
YLPSPSEEMTKNQDQLTCLVKGFSYDAVIEASPIGQKENNYTKTPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCMVHEALHNHYTQKSLSLPGG
GGAPTSSSTKTQLQLEHLLDLQMLINGMINKPKLTRLMTKFYMP
KDETLKHLQLEELKPLPEELNLQASKNFHLRPRLTSLININVLLEK
GSETTEFCEYADEEAFVFLNRWITFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠矢K)::G4S::huIL-2(S87R, C125A)

MDMRVPAAQLGLLLWLRLRGARKDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPK
DTLMISRTVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQGS
TYRVVSVLTVQLQWLNGKEYKVKSNALPAPIETKSIAKGQAPREPQV
YTPPSREEMTKNQSLDTLCKVGYSKDIAVEWSNGQENNNYTKTPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLPGG
GGAPTSSKTKTQQLQLHLLDLQMLINGMINKPKLTRLMTKFYMP
KKATELKKLQLEAEELKPLEEVINLAQSNKFHRLPRLIRNINVLK
GSETTFMCEYADEETVFLNRWITFAQSIIST

【 図 2 4 N 】

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(N88M, C125A)

MDMRVP~~QA~~LLGLLLWLRG~~AR~~CKD~~TH~~TCPPC~~AP~~ELLGG~~PS~~VFLFPKPK
DTLMSIS~~TE~~PTVC~~TV~~YVD~~YD~~W~~LG~~DEPK~~VF~~KN~~YD~~VGV~~GE~~VH~~NA~~K~~TP~~REEQ~~YS~~
TYRVS~~VL~~TLHQ~~QD~~W~~LN~~GKE~~Y~~CK~~EC~~KN~~VA~~LPA~~IE~~TK~~IS~~AK~~Q~~GP~~RE~~Q~~Y~~
T~~PL~~PS~~RE~~EM~~TK~~Q~~SL~~CT~~LV~~KG~~FP~~YD~~IA~~VE~~IV~~ES~~GN~~OP~~EN~~NY~~KT~~TP~~VL~~
DSDG~~SF~~LY~~SK~~LTVD~~KS~~RW~~Q~~Q~~GN~~V~~FC~~SV~~ME~~AL~~HN~~HY~~TQ~~KS~~LS~~SPG~~G~~
GGS~~AP~~TS~~SS~~KT~~QT~~QL~~EH~~LL~~Q~~ML~~Q~~ML~~IN~~NY~~KN~~PK~~IL~~RM~~IL~~TK~~FY~~MP
GG~~AT~~TE~~KL~~QC~~LE~~EL~~PK~~LE~~VL~~NLA~~Q~~SK~~NF~~HL~~RP~~DL~~IS~~MIN~~IV~~LE~~LK~~
G~~SE~~TF~~MC~~YE~~DA~~TE~~AT~~IV~~EL~~FN~~LR~~W~~IT~~AS~~IS~~TL~~LT~~

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(N88S, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLGRGARKDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPK
DTLMISRTEPTEVCVVDVSHDEPEVFNWVYDGVVEHNAKTPREEQYGS
TYRVPVSLFHTKQDNLNGEKYCKVSNPALEPIKSTKAKGQPREQP
YTVVPSRMEHQMGSLCTCLVKGSPDIAVEFVEGQGNENYKTPPVL
DSGGSFFLYSKLTVDSRWRQGNVFCVSMHEALHNHYTKQSLSPGGG
GGSPASPTSSKTLQLOEHLHLLDMLAQINGNNYKPKLRLMLFKFYMP
KSETTEHKLQCLEELPKLEEVLLNKGKFNHLRPLDISSINVIVLEK
GSSETFMCEYADETAFIVLRNWTFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G 欠失K)::G4S::hull-2(N88V, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGCRDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRSTPEVTCTVVDYSHDEPEVKFNWYGVDSVEHNHAKTPREEQYGS
TYRVSVSLTLHQDWLNGEKYCKVSNKALPIEKTIKAKGQPREPQV
YTPPLSREEMTKKSTCLVKGLYPSQIAVEVDSNGQPPENNYKTPPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTKQSLSPGGG
GGSAPTSSSKTKTQLQLHELLQLMQINGKSNPKILRMLTFKYFMP
GSETEHLQLCLEEELKPLEDLNLQKSNFHLRPDLISVINNVLEELK
GSFTTEMCYGFADFTIVFNIIRWITFAOSTISIT

IgG1Fc(N297G 欠失K)::G4S::huIL-2(N88W, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLWRGARC DKTKTHCPCPAPELLGGPSVFLPPKPK
DTLMSIRPTEVTCVVDYSHDEPEVKFNWYDGVGVHNAKTPFREEQYGS
TYRVSVLTVLQDWNLNGEKYCKVSNKALPIEKTIKAKGQPREPQV
YLLPPLSEEMTKNQISLTCLVKGLYPSIAEVFVEWNGQPNENKTPPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFVSCVMHEALHNHYTQKSLSLPGG
GGSAPTSSKTKTQLQLEHLHLLQMLINGINNYKNPKLIRMLTKFYFMP
KSTTKHLQLCLEELPKLEELNLQAGSNFHLRPDLISWINVILEL
GSETTFMCEYADETATIVENLRWITFAQISLIT

【 ㊦ 2 4 M 】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(N88A, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGCRDKTKTPCPAPELGGSPVFLPPKPK
DTLMSRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGEVHNHAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVQLHQDWLNGVKYKCKVSNALPAPIETSKAKGQPREPQV
YLPDSREEMTKTKVGLTKLVKGYSFDIAVEWESGPPENKNNKTPPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTKQSLSPGGG
GGSAPTSSSTKTKQLQEHLILDLQMLINGINKNKPKILRMLTFEYFMP
KATLKLHLQLEELPVEELNLQAQSNFHLRPDLISAINVVLLEK
GSETTEFCEYADEFTLVNLGRWITFAQSIISTL

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(N88E, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGARDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
DTLSIRSPETVTCVVVDVSDHPEDPKVFVNWYDGVGEVHNAKTPREEQYGS
TYRVVSVTLVHQLQDLWNLGKFKYSNKALPAWPIETISKAKGQPREQV
VLPSSRSEKNTKNQVSLTCLVKGFISPDIAVEFIESGQENPNYKPTTPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVIMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG
GGASPTSSSTKTKQLQLLEHLQLMLQINGLINNYNKPILRMILTFFKYP
KATELKHLLQLEELKPELLEVLNLSKCNFHLRDLISEINVIVLELK
GSETTFMCEYADEATIEVFLNRWITFAQSISLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(N88F, C125A)

MDMRVP~~QA~~LG~~LL~~LL~~WL~~RGARCDKTH~~TC~~PCPA~~FE~~LLGGPSV~~FL~~PPKPK
DTLMSIR~~PT~~CV~~VD~~VD~~SH~~EDPEV~~FN~~WYVDGVEV~~HN~~AKTKPREEQYGS
TYRV~~VS~~VL~~TL~~HQD~~WL~~NGEYK~~GV~~SNKALPAIEK~~TS~~NAKKGQPREPQY
VLP~~PS~~SEEM~~TK~~NSQL~~TS~~LC~~FG~~YPSDIAVE~~MS~~QGNQEN~~NP~~TKTPVL
DS~~GS~~FF~~LY~~SK~~LT~~YD~~KS~~RWQ~~GS~~NV~~FS~~CV~~SW~~HEAL~~HN~~HY~~TK~~QSL~~SL~~SPGGG
GG~~SA~~TS~~ST~~SK~~TK~~QL~~Q~~EL~~HL~~DL~~Q~~MLING~~IL~~NY~~NN~~KPL~~TR~~ML~~TF~~KFYMP
KATE~~LK~~HL~~QC~~LEEL~~PK~~LEEV~~NLA~~Q~~SK~~N~~FL~~R~~PD~~LIS~~FN~~V~~IV~~LELK
GSE~~TF~~MC~~EY~~A~~DE~~ET~~FL~~NR~~W~~IT~~FA~~QS~~I~~SLT

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(N88G, C125A)

MDMRVPAQLGLLLWLGRGARDKTHTPCCPAPELLGGPSVLFPPPK
DTLMSRSTVTCVVVDVSDHPEDPKVFNWYGVDSGEVHNAKTPREEQYGS
TYRVVSVLTVMTLWLNGKIEGKSNKALPAPIEKSTKQGPREQPV
VLPSPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEFESKAGPENNYKTPPVL
DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMEALHNHYTQKSLSLSPGGG
GGSAPTSSSKTKTEELQLEHLDDLQMLINGINIKNPKILRMLTKFYMP
KATLKLHLKQKPEELVNLQASKNFHLRPDLISGINVIVLEK
GSETTFMCEYADETATVFLNRWITFAQSISLT

【 図 2 4 0 】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(V91D, C125A)

MDMIRPTEVLGLLLVLRGARCQDTHTKTPCPAPELLGGPSVFILPKPK
 TYLMSRTPAQVGLVVDSHDEPEVKFNWYVDPIEVHNAKTPKREEQVS
 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCVSNKALDAGEIKAKAGPQEQV
 VYLPSSREMTKNQSVLTLVKGFYSPDSIAHEWSNENGPNYKTPPVL
 DSGSFYSKLTVDKSRWQQGNFSCVMIEHLNHHYTKQKSLSPGGG
 GGSAPTSSSTKTLQLEHLLDQLMILNGSNINYNPKLTRLMTFKFYMP
 KKATELHLQLEELPEVLINAKSNFHLPRDLINSINDVLEK
 GSETFMCEYADEETATFVFNQWTFATQSIIST

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(V91E, C125A)

MDMVRPAQLGLLLWLRGARCQKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
 TLMISRTPEQLVVDDSDHEPEVKFNWVGVGEVHNAGKTPREEQVS
 TYRVSVLTVLHQDVLWLEKGYKCVSNKALPEVTKASQTPREEQPV
 VLTSPSREMTKNQVSLTLVKRGVSPDIAVEWESHGQENNNYKTPPV
 DSGFYSFYSKLTVDKSRWQQGNVFCSEALHNHYHTQKLSLSPGGL
 GGSAPTSSSTKTKQLQLEHLLDLQMLGINNKNPKLRLMLTKFYMP
 KKATELKLQLCEEELPKLEVLINAKSNFHLRPLDLSINEIVLEIK
 GSETTFMCEYADETATFVFLNRQFTHAQSIHSL

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(V91G, C125A)

MDMVRPAQLGLLLWLRGARCQDTHTKPCPAPELLGGPSVFLFPKPK
 TRLMSRTPVLTQVNDVDHSEPEVKTWNWYDGVPEVHNAKTPREEQY
 TYRVVSLTVLHQDWLHNGEYKCYVSNKALPADEIKTAKAGQEPQV
 YLPSRSEEMTKNQVSLTLVKGVGSPDIAVEWSENGQENNYKTLSP
 DSGFYSKYSLYDKSRWQGVNVCFSNMHLENHNYTKQSLSPGGG
 GGGAPTSSSTKTKQLQLEHLHLLQMLINGNNYNKPKLRMLTKFYMP
 KATALEKQLQLEELKPELVNLALQSEKFLHRLPDLISNINGVLEK
 GSETFMCEYADETATFVLNWRITFAQSIISL

IgG1Fc(N297G_缺失K)::G4S::huIL-2(V91S, C125A)

MDMVRPTEVLGLLLWLRGARCQKTHTKPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 TYLMSRTPAQVGLLVVDVSHDEPEVKFNWYVDGVENHNAKTPREEQGV
 DTRVSVLTLLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAIEKTIKAKGAGPEQGV
 YLVPSREEMTKNQVSLTCLVKGFISPDIAVEWESNGHPENNYKTLSP
 DSGFSFLYSLYSDKSRWQQGNFVCFSAMEHLNHHTYQKTSLSPPGG
GGSAPTSSSTKTKQLQLEHLHLLQMLINGINNYKNPKLRLMTLKFYMP
 KKATELKLQLQLEELPKLEVLINLKATNFKRLPDLSINLSIVLEK
 GSETTFMCEYADETATFVLNRFWTFQAQSIHSLT

【図 2 4 P】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(I92K, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRLGARC DKHTHCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPK
DTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GG**SGSAPTSSSTKTKQLQLEHLDDLQMLINGINNYKNPKLRLMTLTKFYMP**
KKATELKHLCLEELKPLEEVNLNAQSKNFLRPRDLISNINVKLELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(I92R, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRLGARC DKHTHCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPK
DTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GG**SGSAPTSSSTKTKQLQLEHLDDLQMLINGINNYKNPKLRLMTLTKFYMP**
KKATELKHLCLEELKPLEEVNLNAQSKNFLRPRDLISNINVRLLEK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(E95G, C125A)

MDMRVPAQLLGLLLWLRLGARC DKHTHCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPK
DTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GG**SGSAPTSSSTKTKQLQLEHLDDLQMLINGINNYKNPKLRLMTLTKFYMP**
KKATELKHLCLEELKPLEEVNLNAQSKNFLRPRDLISNINVVLGLK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

【図 2 5 A】

Fc(N297G_欠失K)::G4S::IL-2(L12G, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggctgctgctgctgtggt
gagaggcgccagatgcgacaaaactcacacatgccacccgtgccagcac
ctgaactcctggggggacgtcagctcttctcttccccccaaaacccaag
gacacccctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgctggtggtgga
cgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataaatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtagcggaagc
acgtacccgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa
tggcaaggagtagcaagtgcaaggtctccaaacaaagccctcccagcccca
tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccccagaaaccacaggtg
tacacccctgcccccatcccgaggagtagtagcacaagaaccaggtcagcct
gacctgctggtcaaaagctcttatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcagccggagaaacactacaagaccacgctcccgctgctg
gactccgacggctcctcttctctatagcaagctcacogtggacaagag
caggtggcgacaggggaaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc
tgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
ggttgaagcgctccaacttctcctccactaagaagactcaagGGcaatt
ggagcacttgttgttgacttgcaaatgatcttgaatggtatcaataatt
acaagaatccaagttgactcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaaggctactgagttgaagcacttgcaatgtttggaggaggagttgaa
gccattggaggaggttttgaatttggtcaatccaagaattttcacttgc
ggccacgggacttgatctccaatatcaatgtgatcgttttggagttgaag
ggttccgagactacttttatgtgtgagtagcgtgacgagactgctactat
cgttgagtttttgaatcggtaggtagcacttttgcataatccatcatctcca
ctttgact

10

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L12K, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggctgctgctgctgtggt
gagaggcgccagatgcgacaaaactcacacatgccacccgtgccagcac
ctgaactcctggggggacgtcagctcttctcttccccccaaaacccaag
gacacccctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgctggtggtgga
cgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataaatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtagcggaagc
acgtacccgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa
tggcaaggagtagcaagtgcaaggtctccaaacaaagccctcccagcccca
tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccccagaaaccacaggtg
tacacccctgcccccatcccgaggagtagtagcacaagaaccaggtcagcct
gacctgctggtcaaaagctcttatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcagccggagaaacactacaagaccacgctcccgctgctg
gactccgacggctccttctctctatagcaagctcacogtggacaagag
caggtggcgacaggggaaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc
tgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
ggttgaagcgctccaacttctcctccactaagaagactcaaaAGcaatt
ggtagaagcgtccaacttctcctccactaagaagactcaaaAGcaatt

20

【図 2 5 B】

【図 2 5 B】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L12Q, C125A)

ggagcaacttgttgtgacttgcaaatgatcttgaatggtatcaataatt
acaagaatccaagttgactcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaaggctactgagttgaagcacttgcaatgtttggaggaggagttgaa
gccattggaggaggttttgaatttggtcgaatccaagaattttcacttgc
ggccacgggaacttgatctccaatatcaatgtgatcgttttggagttgaag
ggttccgagactacttttatgtgtgagtagcgtgacgagactgctactat
cgttgagtttttgaatcggtaggtagcacttttgcataatccatcatctcca
ctttgact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L12Q, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggctgctgctgctgtggt
gagaggcgccagatgcgacaaaactcacacatgccacccgtgccagcac
ctgaactcctggggggacgtcagctcttctcttccccccaaaacccaag
gacacccctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgctggtggtgga
cgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataaatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtagcggaagc
acgtacccgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa
tggcaaggagtagcaagtgcaaggtctccaaacaaagccctcccagcccca
tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccccagagaaccacaggtg
tacacccctgcccccatcccgaggaggatgaccaagaaccaggtcagcct
gacctgctggtcaaaagctcttatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcagccggagaaacactacaagaccacgctcccgctgctg
gactccgacggctcctcttctctatagcaagctcacogtggacaagag
caggtggcgacaggggaaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc
tgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
ggttgaagcgctccaacttctcctccactaagaagactcaaaAGcaatt
ggagcacttgttgttgacttgcaaatgatcttgaatggtatcaataatt
acaagaatccaagttgactcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaaggctactgagttgaagcacttgcaatgtttggaggaggagttgaa
gccattggaggaggttttgaatttggtcgaatccaagaattttcacttgc
ggccacgggaacttgatctccaatatcaatgtgatcgttttggagttgaag
ggttccgagactacttttatgtgtgagtagcgtgacgagactgctactat
cgttgagtttttgaatcggtaggtagcacttttgcataatccatcatctcca
ctttgact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L12S, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggctgctgctgctgtggt
gagaggcgccagatgcgacaaaactcacacatgccacccgtgccagcac
ctgaactcctggggggacgtcagctcttctcttccccccaaaacccaag
gacacccctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgctggtggtgga
cgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataaatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtagcggaagc

【図 2 5 C】

【図 2 5 C】

acgtacccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa
tggcaaggagtagcaagtgcaaggtctccaaacaaagccctcccagcccca
tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccccagagaaccacaggtg
tacacccctgcccccatcccgaggagtagtagcacaagaaccaggtcagcct
gacctgctggtcaaaagctcttatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcagccggagaaacactacaagaccacgctcccgctgctg
gactccgacggctccttctctctatagcaagctcacogtggacaagag
caggtggcgacaggggaaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc
tgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
ggttgaagcgctccaacttctcctccactaagaagactcaaaAGcaatt
ggagcacttgttgttgacttgcaaatgatcttgaatggtatcaataatt
acaagaatccaagttgactcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaaggctactgagttgaagcacttgcaatgtttggaggaggagttgaa
gccattggaggaggttttgaatttggtcgaatccaagaattttcacttgc
ggccacgggaacttgatctccaatatcaatgtgatcgttttggagttgaag
ggttccgagactacttttatgtgtgagtagcgtgacgagactgctactat
cgttgagtttttgaatcggtaggtagcacttttgcataatccatcatctcca
ctttgact

30

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(Q13G, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggctgctgctgctgtggt
gagaggcgccagatgcgacaaaactcacacatgccacccgtgccagcac
ctgaactcctggggggacgtcagctcttctcttccccccaaaacccaag
gacacccctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgctggtggtgga
cgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataaatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtagcggaagc
acgtacccgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa
tggcaaggagtagcaagtgcaaggtctccaaacaaagccctcccagcccca
tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccccagagaaccacaggtg
tacacccctgcccccatcccgaggagtagtagcacaagaaccaggtcagcct
gacctgctggtcaaaagctcttatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcagccggagaaacactacaagaccacgctcccgctgctg
gactccgacggctccttctctctatagcaagctcacogtggacaagag
caggtggcgacaggggaaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc
tgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
ggttgaagcgctccaacttctcctccactaagaagactcaaaAGcaatt
ggagcacttgttgttgacttgcaaatgatcttgaatggtatcaataatt
acaagaatccaagttgactcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaaggctactgagttgaagcacttgcaatgtttggaggaggagttgaa
gccattggaggaggttttgaatttggtcgaatccaagaattttcacttgc
ggccacgggaacttgatctccaatatcaatgtgatcgttttggagttgaag
ggttccgagactacttttatgtgtgagtagcgtgacgagactgctactat
cgttgagtttttgaatcggtaggtagcacttttgcataatccatcatctcca
ctttgact

40

50

【図 25H】

acaagaatccaaagtgtgactcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaagagctactgagtggaagcatttgcgaattgtggaggaggagttaa
ggcatcggaggagtttttgaatttggctgaatccaaagaatttctcttgc
ggccacgggacttgatcccaatatcaatgtgacgttttggagtgaag
ggttcgagactactttatgttgtagtgcgtgacgagactgctactat
cgttgagttttgaatcggtgatcacttttgcaccaatcatcatcca
ctttagt

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hull-2(H16M, C125A)

[illegible]

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(H16N, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggctgctgctgtggct
gagaggcccgagatggcgacaanaactcacacatgccaccgtgccacgac
ctgaactctctggggggacccgtcagctctctctctcccccgaacccga
cgacacctcatgctccgcgacccctgaggtcacatccttggtgtgga
cgtgagccacgaagcaactgaggtcaagtcaactctactgtgacggcg
tgagggtgataatgccaaagacaagccgcggggaggcagctacggcgc
cgtacctgtgtgtgacgctctcactcgtcctgcacaaagactgctgaa

【 図 2 5 J 】

IgG1Fc(N297G 欠缺K)::G4S::huIL-2(H16S, C125A)

[illegible]

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(H16T, C125A)

atgagcatgagatgcctgcaaacgtctggggctctgtgcgtctggtc
gagaggccgagatgcagcaaacatacaacatgccacgtgcgcacagc
ctgaacctctggggggagcgtgaactctctctcccccaaaccaag
gacacacctcatgatctccggagagcgtgaatcaatcagctgtgtgga
cgtgagcgcaggaacgtcagctcaagtcaactggttcagtgagcgtg
tggagtgatgataatgcagaacaaagctccgggagagcagtcacgcga
acgcacccgtgtgcgtcagcctctcacctcgtgccacaggaatcgtgaa
tgcgaagaggtacaagtggaaggtctctcaacaagaacctccagccccc
tcgagaagaacctctccaacggaggaagcgcgcaggaaccaacagtc
tacacctccccctccccgcggagagatgacccaacacaggtcagctc
gcgtcctgctgtccaaggtctctatccacgcagatcgcgtgtgggtgg
agagacatggagcagcgaggaacatacaagaacacagctccctgtgc
gactccagcggtccttctctctctacgaagctcacctgggacaagag
caggtgcgcagggggagcgtctctcatgctctggtgacatgagctc
tgacaacacctacagcagaagagcctctccgtgtctccgggtggaggt
ggtagagcagctcccaactctctccctccataaagactcaattgcaatt
ggagACTtttgttggacttcgaacgatcttgaagcttactcaataa

【圖 25 I】

tggcaaggagatcaagctcaaggtctcccaacaagccctccagcccaca
 tcgagaacaacatctccaaagcccaaggcgcccgagaaacacaggtg
 tcaacctctccccctcccggaaggatgacaaacacagctcagctcgc
 gacctctggctcaaaaggtctcttccagcagactcgcgctggagtggt
 agagacaatggcgagcgcgagaaacatacaagacacagctctccgctggt
 gactccggcgctctctctctctctatagacaagctcacctggtcaagaag
 cagggtggcagcaggggaaagctctctatgctccgtagcatgaggctc
 tgcacaacaactacacaggaaggacgctctccctgtctccgtggaggt
 ggtgagctggcgctcaactctctctccactcaagaagactcaattgcaatt
 gggaAAttgtgtgtgacttgcgaatgacttgaatgtgttcaataatt
 tacaagaattccaaagtctgcgctgagttgtgacttttaagttttacatgcc
 aagaagctcaactgagttgaagcacttgcgaattgttggagaggaggtg
 gccattggaggagggttttgaatttggctcaatccaagaatttcaactgc
 ggccacgggaacttgatctccaatatcaagtgatcgttttggagttgaag
 ggtctcgagactcaattttagtggtagcgtcgacgagactgctactat
 cgttgagtttttgatcggtagactcatttctgctcaatccatcatctcca
 ctctgact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(H16R, C125A)

atgtgacatgagatgacgttgcacagctctgtgggctcgtctgctctgtgct
gaggaggccgacagtgcgacaaaactcacatgcccaacgtgcccgacag
ctgaaactctgtggggagagcgtcagttctctcttcccccaaaacccaag
gacacccctatgatcttccggagacagcttgagctcacatgctgtgtgga
cgtgagcagcagagacccctaggtcgaagtgcacgttgagctcgtggtggc
cggagggtgtcatatgcgcaagacaaagccggggagagagcatcggcagc
actcagctgtgtgtcagcgtctcactcgtctgcaccaagtaactggtgaa
tggcgaaggagtcacaaagtgcgaaggtctccaaacaagccctcccagcccc
tcggagaaacactctccaaagcaaacgaagggcagcccgacagcagcgtg
taaaccttgcgccctctccgggaggagatgacaaacagcagcgtcagcct
gaccttgcgttcaaaaggtctctctcccaagcagactccgcgttggaagtgg
agagcaatggcgagccggagaaacacaaacagacacgctccgcgtgtgt
gactccggtctctctctctctctctctctatagcaagactcaccgtggcagaag
caggtggcagcagggggaagctctctctctcgtccgtgcatgcatgaggtc
tgcaacaaacactcacacgcagaaagcgtctctctctctcctcgggtgaggt
gttgagagcgtctcgaactctctctctctcactcaagaagaaactgcaatt
gagcGGTcttctgttggactctcaaaagtacttgaatggtcatacaatt
acaagaatccaagaattgactcgtgagttgacttttaagttttacatgca
aaagaagctactcagttgaagcaacttgcgaatttgcgaaggagagttgaa
gccattggaggaggttttgaaatttggctcaatccaagaattttcaactgc
ggccacgggaactgtgattccaatatacattgattgatttttggagttgaag
gtcttcagagactacttttaagtgtgaagctcgcagacagctactact
cgttgagtttttgatcgttgatcacttttgcataactcaatcatctcca
ctttgact

【 図 2 5 K 】

acaagaatcctacagttgactgcatgttgatccttttaagttttatcatgcc
aagaagaagctactgagttgaagcacttgcaattgttggaggaggagttgaa
gccatgtagaggaaggttttgaatttgctcacaacccaagaattttcaactgc
ggccacgggagcttgatctccaaattacaatgtgatgcttttggaatgaa
ggtttcogagactcattttatgtgtgacgcgtgacgcagagctgactact
cgttgagtttttgaatcgggtggatcacttttgcctcaatccatcatctcca
ctttagct

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hullL-2(H16V, C125A)

tggacatgagctgtgctctgcacacagctgtggcgctgtgctgtgtgct
gagagcgccgagatgcagcaaaactcacactgccaccgtccgcagac
ctgaacctctggggggagcctcagctcttcctcttccccccaaaacccaag
gacacctctatgatctctccgagacccctgaagtcacatgcgtgtgtgtgt
cgtgagccagccaggaaccttcagctgaacgttcacgttcacgtgagcgcg
tggaggtgcataatgcacgaagcaaaagccgggagagcagtcacgcgagc
acgtacccgtgtgtgtgcgctgtctacgcctctgccaccagctcgtctgaa
tggcaaggatgcacaaagtgcgaagttctccaaacaaagccctccgcgcccca
tcgagaaaacactctccaaagcaaaagcgccgcgacacacacagctg
tacacctgtccccctaccgggaggaagtacacaaagacacaggtcagctc
cactgcctggtgcacaaagctctctatccaccgacactcgcctgagtgtg
agacagatgggacccggagaaacactacaaagacacacgtccccgtctg
gactccgcgcgtctctctctctatagcagctccacgtgcagacgaag
caggtgcacacacgggggaagctctctctctcgtgcgtgatgcaggctc
tgcaacacactacacagcagaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
tgggaagcgtctcaactctctctcccaataaagaagctcaattgcaatg
gaagtTctTgtgtggaacttgcaaatgatactggaatgatacaataat
acagaaacacaaagtgtacctgacgtgtgactttaaagtctacatgcga
aagaagaactcactgagtgacgaacttgaaattgtggagagggagtgaag
gccattggagagggttttgaatttggctcatcaacaaagtcttcaactgc
ggccacggggaactctctcccaatataactgtgatcgttttggaggtgaag
ggttcggagacactctttaaagtgtgagtcagctgcagacagctgactact
cgttgatgttttgaatcggttgatacacttttgcataactcatcatctcca
ctttgact.

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(H16Y, C125A)

atggacatgagatgctctgcacagctctgggctcgtcgtctgtgct
gagagagcccgagatgcgcasaaactcacactgccaccctgcccgacac
ctgaactctccctccctcagctctctctctctcccccaaaacccaag
gacacctctgatctctccggaccctcgaggtcacatcgctggtggtgga
cgtgacccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtcagtggaacggcg
tggaggtgcataatgccaaagaaacccgcgggaggagcagtcaggcagc
acgtacccgtgtggctcagctctctaccctctgcaccaggagctgcgtgaa

【 図 2 5 L 】

tgcgaaggaatcatagtgtaacaggtctccaaacaaagccctccacgccccca
 tcgagaaacacatctccaaagcnaaaggcgccgcgaacacacaggtg
 tacacccctgccccatcccggaagagctgaccacaaacaggtcagcgc
 gacctgcttggtcagaaggtctctatcccaagcagctcgcgcgtgagctggc
 agacagctcgtcccgaggtgatactacaagacacagcctcccgctggctc
 ctactccagcagctctctctctctctatgcaaacctccacgtgcgaagaac
 caggtggcagcagggaaagcgtctctctactcgcgtgatgcagaggtc
 tgcacacacaaotacacgcgaagagcctctccctgctcccggtggaggt
 ggtggaagcgcgtcccaactctctctctccactaaagagactcaatgtcaatt
 ggaagtACTcttctgtggacttgaaagtacttgaaagtgtacaataaatt
 acagaagatccaaagtgcagtcggatgttgacttttaagttttacatgcata
 aagaaggtcacttgactgaaagcacttgcaatttggagaggaggttgaa
 gccattggagagagttttgaaatttggtccataccaagaattttcaactgc
 ggccacgggaagcttgatctccaataatcaatgtgactgttttggagtgaag
 ggttcagagactactttatgtgtgaatcgcgtcacgagactgcactcat
 cgttgtagtttgaactcgggtgataccttttgtccactccatcatctcca
 ctgtgact.

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L19A, C125A)

atggaacatgagagcgcctgcacaagctctcctggcctcgtgctgcttggct
gagagcggccagatgcgacaaacctacacatgccacccgtgccacgac
ctgaaactctctgggggacccgtcagctctctctctcccccaaaacccagc
gacacccctatgatctccgggacccctgaggtcacaatcgtcggctggc
cgtgagccacgaagaccctcaggtagcaagtctcaactggtacgtggagcgc
ctggaggtgcataatgccgaagacacccgcgggagggagcagtcaggcaga
acacacgtcctgtgtgcagctcctcagcgtcctgccacgaactgctgaa
tggcaaggagtcacaagtcaaaagctccacacaaagccctccacgcccc
ctgagaaaaacctctccaaagccaaagggcagaaccccgagaaacaggtc
tacacccctccccctccctggaggagatgaccaaagaacaaacctcagct
gcacctgcgtgttcaaaagctctctctccacgacacatctgcgctggagtggc
agagacaaatggggcagcgcggagaaacaaacaaagacacacgtccctgcgt
cactccgcagcgtcctctctctctctacaaagctcaccgtgcgaagaagc
caggtgcgacgaaggaggacgctctctctcgtgcgtgacatgtaggctc
tgcaacaacctacacgcagagaagcctctccctgctccgggtggaggt
ggtgggaagctcctcaactctctctccactaagaagatcaattgcaatt
ggagaccttgcgtGGCgagtcgaaatgcttgaaatgatacaataat
acagaagatccaaagtgcgtcggatgtgacttttaagttttacatgcac
aagaagctcactgagtgaagcacttgcaatttggtagaggaggttgaa
ggcactgggaggaatttgtaatttgcctcaatccaagaattttcaactgc
ggccacgggaagtttgctccaatatcaatgtgatcgttttggagttgaag
gggtccgagactcatttttctgtgtagctcagcagagactcactat
cgttgagttttgaatcgttggaatcacttttgcataccatcactccac
ctttgact

【 図 2 5 N 】

acaagaatccaagtgtagctcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaaggctactgagttagaacacttgcaatgttcgaggaggagttgaa
gccattggaggaggtttgaatttggctcaatccagaattttcactgtg
ggccagcagctactgtagtccaatcaatgtgactgtttggagtgaag
ggttcggagactacttttatgttgtagtgcgtgcagagactgctactat
cttgtagttttgaatcgggtgatcacttttgcgtaatccatcatctcca
cgttgact

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(L19G, C125A)

tgcgaactgagagtgctctgcacgaactctggggcctctgctgcttgcgt
 gagagagcgccgaatcgagcaaaaactgcacactgcccaactcgccacgaag
 ctgaacctctctggggagagctcagctctctctctcccccacaaaccaaag
 gacacctcagatgactctccggccgacactgaggtcacaactctggttggtggtggtggtggtgagccacagctcaggtcaggtcgaatgctcaactgtgacgtgagcgtg
 cgtgtgtgtcgaataatgccgaagcaaacgctgggggagagcagtgacgtgcgaagc
 accgtacccgtgttggtctgactctctcagcgtctctgcacagcaggtctgtgaa
 tgcgtcaaggtgacaaagtccaaggtctctccaaacaaacgtctccacgcccaca
 tcgaaaacaaactctccaaagcaaaaaggcgccgcgcgcgaacacagctgtg
 tacacctctgcccccactccgggagagatgacaaacgaacacaggtctgacctg
 cagctctgtctgtcaaaagctctctatccacggagcaactctgcgtctggagtggtg
 agagaaactggcgagcgcggagacaacatacgaacacacacgtctccgtctgtg
 taactccagctcgtctctctctctctatagcagaactctccgtgtgacaaag
 caggtgtgcacagcaagagctctctctatgctctcgtgtgatgcagaagctc
 tgcacaacatacagcgagaaagacctctccgtgtctccgggtgaggtggtg
 ggtggagcgctccaaactctctctccactaagaagctcaattgcgaattg
 gagagactctgtgggagcttgcaaaatgactcttgaaagtctcaataaattg
 acagaagctccaaagtgtactcggatggtgactcttgaaattctaacatgcca
 aagaagctcagactgagttgaaagcgtgcgaattcttgaggagagagttgaa
 cggatttgaggagagatttgaaatttggtcactccaaagattctcaactgctg
 ggtccacggagacttgatctccaaatacaagtgtgatcgtcttgaggatgaag
 ggttcggagactcaacttatctgagctgacgtgcagcagactgctactact
 cgttgagttcttgaaatcggttgatcatttggctcaatccatcaatccaca
 ctttctact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L19N, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggcctgctgctgtggct
gagaggccgcagatgcgcaaaactcacacatgccaccgtgccaccac
ctgaacatctgggggacgctgactcttctcttcccccaaaacccaa
gcacacctcatgattctccggacagctgaggtcacatgctggtgtga
cgtgagccacgaagccctgaggtcaagtctcaactgtagctgacggcg
tgagggtgataaattgccaaacgaacaaacgcgggaggagcagtcacgc
acgtacgctgtgtgacgctctctcacgctctgcacacgagctgctgaa

【 図 2 5 M 】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(L19D, C125A)

ttggacatggagatgctgcctcaacagctgtgcctgcctgtcgtctgtgctggtgcgtgcgaagtcgaagtcacaaactacacatggccacccgtccgcacgac
ctgaactgtgcctgggggacccgtgaactctctctcttcccacaaacccgaag
gacacccctcatgatctccgggacccctgaggtccacatgcctgggtggatgga
cgtgagcccaagaacccctgaggtcaagttcaactgggtcagtgagcgcgc
ggaggtgcataaattgccaaagcaaaagccgcggggagagcagtcacgcgcgc
gcctaacgtgtgttgatcgtctctcaacgtctgcacacagatcgtgtgaa
tgcgaaggtacacagtcgaagttctccaacaagccctccacgcgccca
tcgaaaaaacatctccaaagccaaaaggcgcgcgcgcgcacacagtggt
tacaacctgcgccactccgggagaggtacgacaaacacaggttcaggt
gacctgcctgcttcaaaagctcttcccccagcagatctcgcctggagtcgt
agagacatggggcgcgcgaagcaaacatcaagacgacacgcctccgtgctg
gactccgcctgcctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
caggtggcagacggggagcgtctctctctctctctctctctctctctctct
tcgcaac
ggtggagacgtgtgcacacacacacacacacacacacacacacacacacac
tggagacactgtgtgacacacacacacacacacacacacacacacacacac
acaagaatccaaagttgactcggatgttgacttttaagttttacatgcca
aagaagatcactgagttgaagacatgcaagttttggaggagggtgaa
gcgcttgaggagagtttgatttgcttcacacaaagatttcaactgc
ggccacgggacttgatctccaatatcaagttgacgtctttggagtgaag
ggttcgcagagacttttatgttgatgcacgtgcagcagctcactact
cgttgagttttgaatcgttggtcactttgctcaactccatcaactcca
ttctgctt

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(L19E, C125A)

atgagcatgagagtgctgcacagctctgggctcgtgctgtgtggct
gtggcgcgcagatgtgcacaaactacacactgccaccgtgccacgac
ctgaactctgggtggggagacgtcagttctctctcccccaaaccaag
gacacccctaatgcttccccggacccctgaggtcaatcgtgtgttggtgga
cgtgcacgcacagacacccctgagtgtaagtgtaacgtgactgcgcgcgc
tggaggtgcataattgccaaacaaaggacgcgggagagcgtacgcgcgc
acgtacccgtgtgtgcgctctccacgctcgaccagagcagctgtgaa
tggaagagtgacaaagtgcaaggtctccaaacaaagccctccagccccc
tcgagaaacaaactctccaaagaaaggagcgcgcgcgagacacagctg
taacccctgccacctccccggagagagatgacaaagacacagcagct
gcacctcgttggaacagctctctccccgacagctcgcgtggagtggg
agacacatgggtcaacggtagacaaactacaagacacgcctccgtgct
gactccgcgcggtctctctctctctacgaagctcacccgtggacaagag
caggtggacgcagcgggaagctctctcctgctcgtgcagtcagagctc
tgcaacaacactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtggaggt
gggtgaagcgtgcacactctctcccaatgagatgacacgtcaattgcatt
ggagcacttgttgagagcttgcacactctctgaggtctcaattat

【图 250】

tgccaggaggtacaagtgcaaggttccaaacaaagccctcccagcccac
tgcaggaataacattccaaagcctaaagcgcccgaggaaccaagggtg
tcacagctgcccccattccgggagagagatgaccaaagcaacgctcagctc
gaactcctggtcaaaagctctctctccagcagcaactcgycgtgagatggg
agagcaatggggcaggcgagaaacactcaagacacccgctcccgctgct
gactccagctgctctctctctctctctatagcaagctcaccgtggacaagaag
cagggtgcagcaggggaaagctctctctatgctcgatgataaggctc
tgcaacacactacagcagaagaagcgtctccctgctctccgggtggaggt
ggtagaagcgtcccaactctctctccactcaagaagactcaatttgcaatt
ggagcaacttgttgatggactcagaatgatttgaaatgtatcaataaatt
acaagatccaaagttgactcgatgatttgacttttaagtttatcatgaca
aagaagcctactgagttgaagcacttgaacttttggagaggaggtgaa
gccattggaggagggttttgaatttgctcaatccaagaattttcaactgc
ggccacggagactgattctccaattcaatgtgatcgttttggagtgaaag
gcttcagagactcttatgtgtgagagcgtgcagagactgactactat
cgttgagtttgaatcgggtggatcactttgtcctcaatccatcatctcca
ctttgact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(L19R, C125A)

atggacatgagagtgctctgcaacagctctgggctctgctgctggtc
gagaggcgccagatgcgcacaaactcacacatgccacccctgcccgacac
ctgaacctctgggggagccctcagttctctctctcccccaaaacccga
gcacacctctatgattctcccgagaccttgagttcacatgctggtgtgtga
cgtgagccacgaagacctcaggtcaagttcagctggtacgtagcgagcgtg
cgaggtgtgcatatgccaaagacacgcgcgggaggagcaagtacggcagc
actcacgctgtgtcagcgtctccacgctctgcacacgaactggtctaa
tggcaaggagtacaggtcgaaggctctccaaacaaagcctccagccccca
tcgagaaacacatctccaaagcgaaggagccgcgcaggaacacaggtg
tcacacctcccccactccgggagagatgcacccgaacacagctcagctc
gaacctgctggtcgaagacctctatctccagcagacatcgcgctggagtggg
agagacacgtggcagcgcgagaaacacactacaagacacacgctcccgctg
gactccgagctccctctctctctctatgcacagctccacgctggacaagc
caggtggcgcagggggaaacctctctatctcgtgctcggtgatcagtgagct
tgcacacacactacagcgaagaagcctctccctctctcggtgtggaggt
gggtgaagcgtctcaactctctctctcactaagaagactcaattgcaatt
ggagacacttgcTGGGactgcgaagtatctgaaagtattcaataatt
tacaagattccaagaactcgcgtcgagttgaactttaaagttttatcatgca
aagaagctcactgagttgaagcacttgaagttttggagaggagactgaa
gccattggaggaggttttgaatttggctcaatccaagaattttcacttgc
ggccacgggaactgattctcaatcatcatagtgatcgttttggagtgaag
ggttcaggaactactttatgttgtagtagctgacgagagactctactat
cgttgagtttttgatcggctggatcacttttgcctcaatcatcatctcca
ctttgaact

【 図 2 5 T 】

acaagaatccaagtgtagctcgagtgtagctttaagttttacatgcc
aagaagactgactaggttgaagcaacttgcacattgttggaggaggagtga
gcgattgggagagagtggaatttggctccatccaagaagatttcaactgc
ggccacaggctttagatctccaatacaatgtgatcggtttggagtgaa
ggttccgagactacttttatgtgtgagtagctgtacggagactgtactat
cgttgagttttaaagtcggtgatcaatttgcacatccatcatctcca
cttgact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(D20W, C125A)

tggagcctgaagctctgcacacagctctggggctctgctgctctgctg
 gagagcggccagctgacgcacaaactcacactgccacagctgccgacga
 ctgcagactctgggggacctgcagctcttctctctcccccaaaaacccag
 gacacccctcatgactctccggagccctgagtgacatcgtgtgtgtgga
 ctgagagccagcaagacactgagtgcaagtccaactcgtacgtggagcgg
 cggaggtgtcacaattgccaaagacaaacccggggagggagcagctacggcga
 agctacctgtgtgtagcctctcaacctctgcacacgagctgtgctgaa
 tgcgaaggtgacaagtgcgaagctctccaaacagccctccacacccccca
 tcgagaaaacacactctccaaagccaaagagccggccggacacacagaggt
 tacacctctgccctacctccgggaggagatgcacaaagacacaggtcagct
 ctgactgctcgtgtcaaaagctctctctccagcagactcgcctggaggtg
 agagcagatggggcagccgagcaaaaacactcaagacacagcctccctgctg
 actccagcgcctctctctctctctctatgacagctcaccgtggacaaag
 caggtgcagcagaggggacgtctctctatgcctcgtgatgcagtgagctc
 tgcacaaacactaacagcagaagagctctccctgctctccgggtggaggt
 ggtggagcgtctccaaactctctctccactcaagaagactcaattgcatt
 ttggagcacttgttgtttgtGGTgtgcgaattgacttgaaagtatacaaat
 ttacagactcaaaagttgactcgggtgtgactcttaagttttaactgcca
 aaagaagctcactgagtgcagaacttcgaattcttgaggagagaggtgaa
 gccattggagagaggtttgaaattgtctgcacatccaaagaaattctactgc
 ggctccagggacttgattccaattacatgctgactgctttggagtgaaag
 ggtctcgagagactcttatctgtgtgagtagctgacgagcagctactact
 cgttgagttttgaaatcggtagatcattctgtccaatccatcatctcca
 ctcttgact

IgG1Fc(N297G_缺失K)::G4S::hulL-2(M23R, C125A)

atggacatgagagtgctctgcacagctctgggctgctgctgctggct
gagagagccagatgcgacaaaactcaacatgccaccgtgcccgacag
ctgaacctctgggggagcctgagcttctctctcccccaaaaccaa
gcacacctctgatctctccggagccctgaggtcacatgctggtgtgga
cgtgacccaggaagacctgaggtcaagtctcaactggtacgtgacggcg
ctggaggtgcataatgccaaagacaaagcctgggaggagcagctacggcgc
acgtacccgtgtgtgagcctctcaagctctgcacgaagactggtgaa

【 図 2 5 V 】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hulL-2(R81G, C125A)

[illegible]

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hull-2(R81S, C125A)

atggacatctgagagctgctctgcacacgtctctgggctctgctctctgtgctctgagagccgcacatgcacacaaatcacacatctcccccctctgctgctccgcacctgaacctctctggggggaggaagctcattctctctcccccaaacacacagacacacctctatgattctccggacacctcaggtcaccatcattcggtctgtgtggaagtgcacgaacaaagacctgaggtgcacgtcaactgcagctgcagtcgagctgtggatgagtcataatgcccaaacacgcgcgggagagcagctacgcgcgaacctgcctggtgcagctcctcaccgctctgcacacagagctggtcgaatgcaggagtcacagctgcagggtctcccaaacaggctccacgccccacgcagaaaacatctccaaagacaaagggcgcaccccgagaaacacaggggtacacctctgccccctccgggaggaagatgcacaaacagagctgcagctcgtctgtgcgaagctctctccacagagacatgcgcgtgaggtggagagacattgggcagctgcagatacaatcaaacagagctccctgcgtctctccgcgcgcctctctctctctctctacagacagctccacgcggagcagctggagcaggggaagctctctctatgcctgcgtgatgcagtaggctctgcacaaacctacacagagaagagctctctctctctctccgggtgagaggtggagcagcctcccaactctcctccatcaagaagacaaatgattcaattggagcatttgtttgagcttccaaatgactctgaattgattcacaataatt

【 図 2 5 U 】

ttgcaaggaaggtacaaggtcaaggtctccaaacaaagccctccagaccceca
tgcgaagaacacctctccaaagccaaagggcagcccggaacacaaaggtgt
tacaaccttgcgcccaatccggggaggagatgaccaagaacagggtcagcg
gaacctgcgtgcgaagacctctatccagagacatcgcgctggagtgagg
agacaaatctggcgacgcggagaaacatccacagccgctccctcgctgac
gactccgagcgctgcctctctctctatgaaagagctcaccgtgcaagaag
cagtcgacagcaggggaacgtctctcatctgcctgagtcgatgagtgct
tgcgaacacacctcaacgacgaagaagacctctccctgtctccgggtggaggt
gggtggaagcgcctcaacctctctctccatcaagaagacaaatgcgaatt
ggagcaactctgtgtggacttgaaAGGacttgtaatggtacaataatatt
acaagaaacaaagttgactcgcggtgttgactctttaaagttttacatgcga
aagaagaaactcaggtgaaagcaactgtaactgtttggaggagaggtgaa
gccctctgaggtgagtttgaatttggtcctcaacaaagaattttcaactgt
ggccacgggagtgatgtctacaataccaatgtgactgtttggagttgaag
gtcttcagagactacctttatgtgtgagtaacgtgcagagagctgacctat
cgttgagtttttgtaacgtgtgatacttttgcctcaatccatcatctccca
ctttgctat

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(R81A, C125A)

[illegible]

【図 2 5 W】

acaagaatccaaagtgtactcggatgttgacttttaagtttcatgcc
aagaaggtcactgagtgtgaagcacttgcagtgtttggaggaggagtga
ggcattggaggaggttttgaatttgcgtcaatccaaagaatttcactat
tgcacaggagacttgatcccaatattccatgtagtcgtttggagttg
ggttcagagactacttttatgtgtgtagtcgctgacgagactgtcact
cttgagtttttgatcgggtggatcacttttgcctaatccatcatccca
cgttgact

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hull-2(R81T, C125A)

atggacatggaagctgcctcaacacagctctggggctctctgctctatgacct
gtgctgagcaacagctatgcagatcaacatacacaactgccacacgtgccagacag
ctgaacctctggggggacgctcagctcttctctcttcccccacaaacccaag
gacacacctcatgatactccgggaacctcagggtcaactatcgctgggtgtgga
cgtgagcaacagagacctcagctcaggtcaagtcacactggtcagctggagcggc
tgaggtgtgcataatgccaagaacaaacgcgcgggagagagcagtcacgycgac
cagctacctgctgggtcagctctctcaacgctctgcacacagagctgggtgag
ctgcgaaggtatcaaaagtccaaagttctccaaacaaagacctccagcccccac
tcgagaaacacatctccaaaggcaaaagggtgcgcggcgcgaacacacaggtg
tacacctgcctcccataccccgggaggaatgacccaagaacacaggtcagctc
gacctgctgctggatcaaggctctctatcccgccagctccgctcaggtggg
agagacatctggggcagccggagacaacatacaagcaacagctccctccgctgag
ctacccagcagctcctctctctctctatagaacactcacccgtgcagtcgac
caggtggcagcaggggacagctctctctcatgctcgtgatgacagagctc
tcgcaacaaacagcaggaagagagctctccgtgcttcgggtggaggt
gggtggagcgtcccaactctctctccactaagaagactcaattgcaatt
ggagcaactgtgttggaacttgcaaatctcagatggtctacataatt
acaagaatccaaagtgcactcggatgtgactcttaagtcttacatgcc
aagaagaactctcaggttgaagcactcgaatgtctgtggaggagaggttga
gcgacttgaggagaggtttgaatttggtcattccaagaattctcaacttga
GCGcaccgggacctgatactccaattcagatgatgcctcttgaggttgaag
ggtctccgagagactcttaattgttgatcagctgcagcagactgcatact
cgttgaggttttggaatcgggtggaacactttctcgactcaatcactctcca
ctgtgacct

IgG1Fc(N297G_缺失K)::G4S::hull-2(D84A, C125A)

atggacatgagagtgctgcacagctgctgggctgctgctgtgtggt
gagagggcgccagatgcgcaaaaactcacacatgccaccgtgccacac
ctgaactctctgggggacgtcagttctctctcccccacaaacccga
gcacacctcatgatctccggaccctgagtcacatcgctggtggtga
cgtgagccacgaagacctgacatcaagttcaactggtacgtggaaggc
tggagggtgcataatgccaaacgaagccggaggagcagtagtcggcagc
acgtacagctgtgtgtagcagctcctcaacgctctgaacaggatgctgaa

【 図 2 5 X 】

tcgcaagaggtacaaagtccaaggtctccaaacaagccctccagcccccac
tggcaaaacacactctccaaagccaagaggccgcgccaacaaagaggt
tacaccttgcccacatccggggaggagatgaccaagaacaggctcagctc
gagctctgctcccaagaggtctctatccagagcgctccgctggaggtggt
agagcaactgggcagcggcaagaacactcaacagcagccagctgctgctg
ctgctccagcgagctctctctctctctatagaagagctcacgtggacaagag
caggttgccgacagggggagctctctctctctctgctgcatgcatgagctc
gtcaaacacactacacgcaagatgctctctctctctccgggtgagctc
ggcgaaagcgctcccaactctcgtccctcaataaagaagactcaattgcaatt
ggagcatctctctcttgagcttgcaaatgattcttgagttgatacaaatl
acaagaagtcacaaagtgtactcggagttgtactttaaagttttacatgca
aagaagctcactgagttgaagcatctgcaatttctggaggagagtgaa
gccattggaggagaggttttgaaatttggtccatcaagtaagttttcactg
ggccacggactcttgatctccaatatcaattgtagcttttgaggtgaag
ggttcagagactctttatgtgtgagtcagctgacgagcagctactact
cgttgatttttgatagctggatacctttgctcaatccatcatctcca
ctttgact

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hull-2(D84E, C125A)

agtgagatcgagaggtgcgcacacagctgctggggctctgctgctcttgcttgcgtc
 gaggagccgacatgctgcgcacaaactcacacatgccacagctgccgacgctgccgacga
 ctgaacctctctgggggacagctgcaatttctctctctcccccaaaaacccagac
 cggacacctcatgatctctccggcgacctctgagctgcacatgctgggttggtgga
 cgtgacccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtgactgctggacggcg
 ggaggtgtgcataatgccgaagacacagctccggggagagacagctacggcagc
 agctacctggttggtgacgtctcaactcgcctgcacaggacgagctgctgga
 tgcgaaggtacaaagtcaaggtcaaggtctccaaacgaagcgcctccagaccccc
 tcggaaaacacatctccaaagacaaaggagccggccgacgacacagagctggt
 tacacctctgccccctacccgggaggatgaccacgaagacacagctcagctc
 gactgctgctgtctcaaggctctctatccacgagcagctcgcgctggagtggg
 agagcaatggggacgcggagaaacaaacacgaagacacgctcccgctgctg
 ctactccagcagctctctctctctctatagcagacgtcacggctggacacagc
 caggtgacacgcaggggaagctctctctcagctcgtgatgacatgaggtc
 ctgcaaacacactacacgaagacgctctctcctgctctccgggtggaggtg
 ggtggaacctccactcaactctctctccactcaagaagactcaactgcaatt
 ggagcacttggttgtagctgcgaatgactgtgaagtggatcaataact
 acagaagtccaagttgactcggatgttgactcttaagtttcaatgcc
 aagaaggtcactgaagtgaagcattgcaagtttgctggaggagaggtgaa
 gccattggaggagaggtttgaatttggtctcaacccaagaattctcaactgc
 ggccacggcaggttgatctccaattcaatgtgatgctcttgaggtgaa
 ggtcttcgacagactcttatgtgtgagctgctgacgacgactgactact
 cgttgagttttggaatcggctggatcaactcttgcataacccatcactccac
 ctttgact

【 図 2 5 Z 】

acaagaatccaagtgtagctcgtagtgtagctttaaagttttacatgcc
aagaagcgctactgagtgaagcactgcaactgttggaggaggagtgga
ggcattggaggagtagttgaaattggctcaatccaagaattttcaactgc
ggccacgagATCtgatctccaatatacattgtagtcgtttggagttgaag
gggtccgagactacttcttatgttgtagtcgctgacgagactgctacta
cgttgagttttgaaatcggtgtagctatttggctaatccatcatctcca
ctttagct

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(D84M, C125A)

tgggacatgaagtcgtctccacagctctgggctcgtctgctcttgctc
 gtagggccgagatgcgcacaaactcaacatgccacgctggccacgac
 ctgaactcctggggggagccgtcagctctctctctcccccacaaacccaa
 gacacccctcatgatctccggagacctgcagctgcacatgctggtggtgga
 cgtgacccagacagacccctgaggtcaggctcaactggtacgtgcggcgcc
 gggaggtgcataatgcgcagaacacacccgcgggagggagcagctacggccgc
 acgtacagctggtggtcagctgtctcaacgctctgcacagcagctgctgaa
 ttggacagagatgcacaaagtgcaggtctcccaacacggccctccacgcccc
 ctgcaggaacacatctccaaaggcacaaggagccgcgcgcgaacacaggtg
 tacacctgctccccatccggggaggagatgcacaaacacaggtcagctgc
 gacctgctgtggatccggctctctatccacgagcatcgctgtggagtggc
 agacacatgtgggcagcggagacaactacaagacacgcctccgctgctgc
 ctactccgacgctcctctctctctatgacagctcgcacgctgcgcagaag
 caggtggcagcaggggaagctctctcatgctgctgatcatgaagctctc
 tgcacaacacacacgcagcaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
 ggtgggaagcgtcccaactctctctccactagaagacatcgaattcaatt
 ggagcacttgtttggactgcgaagtcatctgaagtatcaataatt
 acagaagaccaagttgactggatgtgactcttaagtctaacatgcc
 aagaagagactcatggtgaagcactgcgaattctggggaggaggtgaa
 gcaattggaggaggtttgaatttgctcactcaagaattctcaactgc
 gccacagatATGtctgctccaattcaagtgtgatcgtttggagttgaag
 ggtctcgagagactctttatgtgtagctgacgacgagactgactact
 cgttgaggttttgactcggttgatcaactttgtccaatccatcatctcc
 ctcttgcact

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::hull-2(D84Q, C125A)

atggacatgagagtgcctgcacagctgctgggcctgctgctgctgtgctt
gagagcgcgcagatgcgcacaaactcacatgccaccgctgccacgac
ctgaacctggggggacacacacttctctctctcccccaaaagccag
gacaaacctcatgatctccggacccctgaagtcaatcgttggtggtgga
cgtgagcccaagaagcaggaagtcaagtcaactggtacgtggaagcgc
tgagggtgcataatgccacagacacccgggaggagcagtcacgcgc
acgtacatgctgttcagctgctccactcgcctgccacgaagacggtgaa

【 ㄨ 2 5 Y 】

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D84G, C125A)

[illegible]

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(D84I, C125A)

atggaacatgagagtgctgcgcacacgtctggggcctctgctgcttgctc
gagagcgccgacatgctgcacaaacacacatgcccaacctgccacgctc
ctgaacctctgggggggaacctcagctcttcctctccccccaaacccaa
gacacctctatgattctcccggaacctgaggtcagctctggtgtgtgga
cgtgacgaagaagacctgagtgcaagtctcaactggtacgtgacgcgc
ctggaggtctcataattgcgaagacacacgcctgggaggaagctacatgcgacgac
tcaactcagctgtgtgtcagctctcaactcagctctgcacgaagctgctgaa
tggcaaggagtaacaagtgcgaaggtctccacaagaagcctccacgcccc
ctcgagaaacacattccaaagacacgaaggcgcccgagacacagcagtg
tacaacctgcgcccatcccgaggagagatgacaaagacagcctcagctc
gacctcctggtgcgaagctcttataccagacacatctcgcgtggagatgg
agacacatgggagcgcctcctcattacaaagacacacgtctccgtgtgtg
ctactcgcgcggtctctctctctctcactgaactcaccgtgtgcaagag
caggtggcagcaggggaacctctctcagctctcgtgacatgagctc
tgcaaaccaactacacgagagaagacctctcctgtctccgggtggaggt
gtgtggaagcctcctcagctctcctccatagaagactcaatgtcaatt
ggagcactctgttgttgacctgcgaatgattgcagtgattctcataatt

【 図 2 5 A A 】

ttgcgaagagatcaaggttgcgaagttctcaacaagaacctccacgcccac
 tcgacaaacacatctccaaagcaaacaggcagcccgagaaacagaggt
 tacaacctgcccccctcccggaggagatgaccaagaacaggcagctcagc
 gacctgctgtctcaaggtctctctccacgagcactctgcgtcgagggtggg
 agagcaatctggcagcgcgagaaacatacaagaacgacacctccgcgtgct
 cagctccgacgagctctctctctctctatgacaaagctcaccgtggacaaga
 gctgtgcagcaggggaagcgtctctctatgcgtctgtgcatgtaggctc
 tgcacaaccactacaacgagaagagcctctccctgtctccgggtggaggt
 ggttggaagcgtctgaactctctctccactcaagaagacactcaattgcaatt
 ggagcaactcttctgttgacttgcgaattgacttgaaggtatacaataatt
 acagaatacccaagctgactcggagttgtgaacttttaagctttacatgaa
 aagaaggtcactagttgaagcacttgcgaattctgttggaaggaggttgaa
 gccacttggaaggaggttttgcaatttggtcgaatccaagaattttcaactgc
 ggccacaggCAGTgtgactccaattcaatgtgactgttttggaagtgaag
 ggtctccagagactcttattgtgtagtgcgtgacgagactgactact
 cgttgagtttttgactcgggtggaactccttttgtcgaatccatcattcca
 ctctgact

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(D84R, C125A)

atgtacatgagatgacctgcaacagctgctggcctcgtctgctgctgcttgcct
gaggagggccgacatgcgcaaaaaactcacatgcccaacctgctgccagcac
ctgaaacctctggggggagcctgcacttctctctctcccccaaaaacccagac
gcacacctctatgctctccgggacccctgaggtcacatgctcgtggtggtgga
cgtgagccagcaagacctcagggtcaagttcaactggtacgtgacggcggcgg
cgaggagtgcatatgtgccaaagcaaaagccggggagagcagtcacggcagc
acactcgtgtgtgacgcgtctcacgtctctgacccagcaagctgctgtaa
tggcgaaggagtacaagtgcaaggtctccaaacaaagccctcccagcccaca
tcgaggaataacctctcaaaagccaaaggagcgcccgagacacacagcaggt
taaacctctccccctctccgggagagctgacccaagcaaacgtcagcgtc
gcacctcgtctgtaaaagcctctctctccagcagcactccgcctgcgtgggg
agagcaacgtggcagcgcggagaaacaaactacaagacacacgtctccgctgct
cagctcgtctgctctctctctctctctatgcaagactccacgtggacaaga
caggtggcagcgaggggaaagcctctctatgctccgtgtagctagaggctc
tgcaaaccaactacacgcagaagagcctctccctgctctccgggtggaggt
ggtagagcgtgctcctaactctctctctccactaaagaagctcaattgcaatt
ggagacacttggttgtagctctcgaatgacttgtagagttcataataatt
acaaagatccaaagctgtagctcggtgttgacttttaagttttatcatgaa
aagaagcctactagttgaaagcacttgcaattgttggagaggaggtgtaa
ggcatctgaggagaggtttgaatttggtctcaatccaaagattttcaactgc
ggccacggcgccctgactctccaattcaatagctgacgtctttggagttagag
ggttcggagactcttctatgtgtgaagtagctgacgagactgctactact
cgttgagtttttgtaactcgttggaatcacttttgcctcaatccatcactccca
ctgtgact

【 ㊦ 2 5 B B 】

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hull-2(D84S, C125A)

[illegible]

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(D84T, C125A)

atggacatgagagtgctctgcacagctgctggggctctgctgctgtggt
 gagagggccgacatgagcaaaactcacatgccacgcgtgccgacac
 ctgactctctggggggacgctcagttctctctcccccaaacccgac
 gacacctctatgctctccggacccctgaagtcatgacgtgtgtgtgga
 ctgtgagcagaagaacacctgagtgatactcaatggctgagcgagcg
 ttgagttgtcatatgccaagaacacgcgcgggagagcagcatgcggcag
 acctacgtgtgtgacgctctcactgctctgcacgaagctggtgca
 ttgtaagagtgatacagtgcaaggtctccaaacaaagcctccagcccc
 tcgagaacaaacctctccaaaggcaaggggaccccggaacacaggtg
 tacacctgccccctccggaggaagtgaacaaacagctcagctcgt
 gactcgtctgtgataaagctctctccagagcatcccgctggatggg
 gaggcaatggggcagcgcgagacaactcaagaacacgcgtcccgctgt
 gactctgcagctgctctctctctatgataagctcacgctgacgaag
 gacgtggcagcgggggaactctctctatgctcgtgatgacgaggct
 tgcacaacactacacgacgaagagctctctctgtctccgggtggaggt
 ttgggaagcgtcccaactctctcctcactaagaagactcaatgcaatt
 ggagcatctgtgttgacttgcgaatgactctgaatgtatcaataatt

【 図 2 5 D D 】

tggcaagcaggtatcaggtcaagggtctccacaagaagccctcccagcccca
 tcgacaacaacatctccaaagcgaagaggcgaccgcgagacacagcaggtg
 tacaacctgcgcccatcccggaagagagtgacaaacagcagctcagcct
 gacctgcgtgctcaaaagctgctatcccaagcagatccgcgtggagtggg
 agagcaatctggcgacgcggcagcaacaatcaacagcagcctccgcgtgt
 gactccggcagctctctctctctatcaagcaatcacctggtccaaagag
 caggtgcgacgaggggaagctctctcatgctccgtgcatgaggtct
 tgcacaacaactacaacgagaagagcctctccctgtctccggtggaggt
 ggttggaagctgcgaactctctctccactaagaagacatcaattgcaatt
 ggagcaactgttgttggaactgcgaagactcttgaaatggttacaataat
 accaagaatccaaagtgctgcgaggttgacttttaagttttacatgcc
 aagaagctcatgagtgaagcactgcaattgttggaagagaggttgatg
 gccattggaggagggtttgaaatttggtcacaatccaagaatttcaactgc
 ggccacggagactgatctcctgcTatcaactgtgatcgtttggagtgaag
 ggtctcgagactactttatgtgtgagtagctgcagagactgactat
 cgttgagttttgaatcggctggatcattttgctcaatcatcatctcca
 ctatgaact

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(N88E, C125A)

atgacatcagagagtcgctgcacagctgctgggctgctgctgctgtgct
gagagggccgcagatcgacacaaactcacacatgccacccgctccgcagac
ctgaacctctgggggagctgcagctctctctctcccccaaacacacga
gacacctcatgatctccggacagctgaggtcagctggtgtgtgtgtgga
ctgtgacacgaagaacctgaggtcgaagtcaactgctgactgcagcgcc
ggaggtgcatatgccaaagacaaacccggcgaggagcagtcagcgga
acgtacccgttggtcagcgtctctcacgctcctgcacccagctgggtcga
ttcgaaaggatcaagtgcaaggtctccaaacaaaggctccagccccca
tcagagaacaaactctccaaagcaaaagggcagcccgacacacaggtg
tcacaggtccccctccccggagagagatgacaaacagcagctcagctc
gaacctcgtgtgcaaaagcttctatccccagacatccgcttgagtggg
agacaaagctggcagccgcagacaaacatcaagaaagcctctccgtgtg
gactccgaacggtccttctctctctatagaacgtcacccgtggacaagag
cagtcagtcagcagagggaagctctctctatgctccggtgacaaaggctc
tgacaaacagcagcaggaagagctcctctcctgtctccggtgagaggt
gtgtggaagcgtccaaactctcctccactaaagacatcaattgcaatt
ggagcaactgtgttggaattgcaaatgacttgaagtatcaataatt
acaagatccaaagttgactcgagttgtgacttttaagttttacatgca
aaagaaactcactgagttgacacactgcaactgtttggaagagaggtgaa
gccattggaggaggttttgaatttggctcaatccaaagaatttcaactgc
ggcaccggaggaactgatctccGAGatcagctgatcgttttggaattgaag
gtctccgagactcaatttatgtgtgagtagctgcagacagctgactact
cgttgagttttgaatcggctggaactccttttgcacatccatcatctcca
ctttgact

【 図 2 5 C C 】

acaagaatccaaagtTgaactcggatgttgacttttaagttttacatgccaa
aagaagcctactgagttTgaagcactTccaatgtttggaggaggagTtga
ggcactggaggaggttttgaatttggctcaatccaaagaatttccacttgc
ggccacggAACCttgatctccaatatcaatgtgatcgttttggagttgaag
ggtTccgagactacttttatgtgtgagTaccgtgacgagactgctactat
cgttgagtttttgaatcggTggatcacttttctcaatccatcatctcca
tttgact

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::hulL-2(S87R, C125A)

[illegible]

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hulL-2(N88A, C125A)

atggacatagagatgcctgcacagctgctgggcctgctgctgtgtggtc
gagagagcccgagatgcgcacaaactcacacatgccaccctgccacgac
ctgaactctctggggggagctgactctctcttccccccaaacccaa
gcacacctgatgatctccgcgacccctgaggtcacatccctggtggtga
cgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactgggtacgtgagcgcg
tgagagtgcatattgcacagaacacacccgggagagcgagcatcgcgcga
actaccgtctgtgcacgctctcaactcctgcacaaagacttgtctga

【 図 2 5 E E 】

IgG1Fc(N297G 欠失K)::G4S::huIL-2(N88F, C125A)

a t g g a c t t g a g a g t g c t t g c a a c a g t c t g g g c c t g t c t g t g t g c t
g a g a g c g g c a a g t g c g c a a a a a c t c a c a c t g c c a c c g t g c c a c g c t
c t a a c t c c t g g g g g a a g c a g c t c t c t c t c t c c c c a a a c c c a a g
g a c a c c t c t a c t t c c c g g a c c c c t g a g t t a c a g c t g c t g g t g g t g g a
c g t g a c c a g a a g a c c t g a g t t a a g t t c a a c t g t a t c g t a g c g a g c g
t g g a g t g c a t a a t g c a a g a a c c c g c g g a g a g a c a g t a c g c g a c g
a c t a c c g t t g g t c a g c g t c t c a a c g t c t c a c c a g g a c t g c t g a a
t g c a a g a g t a c a a g t g a a g t t c t c a a c a a g c c c t c c a a c c c c c a
t g c a a a a a c c t t c c a a g c c a a g g a g c c c g c c a a c a a c a a g g t g
t a c c c t g c c c c c t c c c g g a g g a g t a g c a a a a c a a g g t a c g c t
g a c c t g c g t g t c a a a g t c t t t a t c a a g a a c t a c g c c t g g a g t g g
g a g a c a t t g g c a c c g g a a a c a a c a a g a c a a c a g c a c c t c c c g t g c t
c t c c c a g c g c t c t c t t c t c t t a t a g c a a g c a c c g t g a c a a a g
c a g t g g c a g a g g g a a c g t c t t c a t g c t g a t g a t g a g c t
t g c a a a c c a t a c a a c a g a a g a a c c t c c t c t g t c c g g t g g g g g t
t g g t a a g a c c t c a a a c t t c t c c t c a a t a a g a a g a c t a a t g c a a
g g a c a c t t t g t t g g a c t g a a a g t a c t t g a a g t t a t c a a a t t a t
a c a a g a t c a a a g t t a c t g c t g a c t t g a c t t t a a g t t t a a c a g c a
a a a g a a g a c t a g t t g a a g a c t t g a a t t t t g g a g g a g a g t g a a
g c a t t g a a g a g g t t t g a a t t g c t c a a t c a a a g a t t t c a a c t g c t
g g c c a c g g g a c t t a t c t c t t t t a c a a g t g a t c t t t t g a a g t g a a g
g t t c c a g a c t a c t g a t t g t g a g c g t a c g t a g a c a g a c t a c t a t
c g t t g a t t t t g a a t c g g t g a a c a c t t t g c t c a a t c c a t c a t c c a
c t t t a c t

IgG1Fc(N297G_缺失K)::G4S::huIL-2(N88G, C125A)

atgacatctgagagtgccctgcacacagctctggtggccctctgtctctgtgtgctc
gagagcgccgacatgctgcacaaactcaacatgccacccgtgccgacgac
ctgaactctctgggggagccctcagttctctctctctcccccaaacccacg
gacacccctcatgactctccggacccctcaggctacatctcgtgtgtgtgga
ctgtgacacgcgaagacccctcaggctacatctcaactggtcactgcgacgag
ctggaggtgcataatgccaaacacaaagcccgccggccgacagctacgagcag
acctaccgtctggtcagcgtctccacccctctgcacacgagctgctgca
tcgcaagagatcaagctgcagaggtctccaaacaaagccctccagccgcca
tcacacgaataaactctccaaagacaaagggcagcccgcggaacacagcgtg
tcacccctgcgccctctccggggagagatgacaaacaaagcctcagcctc
gacctcgtgcctcaaacgctctctccagcgacatccgcctggctgagg
gacaaatggggcagcgggaacaaactcaagaaagcctccctccgctgct
gactccgacggctcctcttctctctatagcaagctccacccgtggacaag
caggtggacacaggggaaacgtctctctatcgtcgtgatactgagtcgtc
tcgcaacacacacacgacgaagagagcctctcctgtctccgggtggaggt
gggtggaagcgtccaaactctctcctcaactaagaagacatgaaatgcaat
ggacactctgttgtggaactgcgaatgactctgaactgatacaataat

【 図 2 5 F F 】

acaagaatccaayaagtgtactcggatgttgacttttaagttttacatgcc
aagaagagctactagtttgaagcatttgcattgttggaggaggagttaa
ggcatgtgaggagtttgaatttggctgaatccaagaattttcacttgc
ggccacggggatgtctcggTatcaatgtatcggtttggagttgaag
ggttcggagactcctttatgtgtgagtagctgacgagactgctactat
cgttgagtttttgaatcgggtgatcactttgtctcaatccatcatctcca
cttgact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(N88M, C125A)

ttggacatggagagctgctgcacaactgctggcctcgtgctgctgctggct.
 gaggatggagctatgcgcacaaactcacactgccacgctgccacgagctcga
 ctgaacctctgggggagccgtgactcttctcttcccccaaaagctggcgga
 ggaacccctaatgctatccggccacctgaggtcacatgctggtggtgga
 cgtgaccacgaagaccctgaggtcaagtccaactggtgactggtggagcgc
 cggatggtcataatgccaaagacaaagccgggagggagcagctacggcgc
 agctaccgtgctgtgagcgtctcaccgtctgctgcacaggagctgctgaa
 tggcgaagggtgacaagtcaaggctctccaaacaaagcctccagaccccaca
 tcgaaacaaacccatctccaaagccaaaggagcggccggacacaaacagggt
 tacacctgcgcccatccgggagagagtgaccacaaacaggatcagctcga
 cagctcgtctgtcaaaagctctctatccacgacatgcgcgtggagtggt
 agagacattggggcgcggagacaaactacaagacacagctccctcgtgctg
 ctctccagcgtgctctctctctctctcctgacgctcagctgggacaaag
 caggtgtgcagcaggggaacgtctctctatgctgctgtagctgaggtcga
 tcgtcaaaccaactggagacgaagaagctctcctcgtgctccgggtgaggt
 ggtggaagcgtcacaactctctctccctcaatgaagaagctcaattgcaatt
 ggagacattgtgtggactgcaaatgactgtaagtgaattcantaatt
 tcaagaatccaagtgctgaggtgattgacttttaagtttcaactgca
 aagaagctcactgagtgtagagctgcaatgtttggaggaggagtgaa
 gccattggaggaggtttgaatttgctcacaacaaagatttcaactgc
 ggccacgggagctgctctcctATgatacagctgatgcttttggagtgaa
 ggtctcgacagactcttattgtgtgtagctcagcagcagctcactact
 cttgtagtttttgaactcgttgatacattttgctcaatccatcatctcga
 ctttgact

IgG1Fc(N297G_欠缺K)::G4S::huIL-2(N88S, C125A)

atggacatgagatgcctgcacagctgctgggctgctgctctgtggct
gagagagccagatgcgacaaaactcaacatgcgccacctgctccagcag
ctgaactctctggggagcctgagttctctctcccccaaaacccgaac
gacacctcatgattccgggaccccgagtgatcactgctggtgtgtgga
cgtgacagcagaagacctgaggtcaagtcaactggtactgtgacggcgc
tggaggtgcataatgccaaagacaaagccgggaggagcagatcgggcgc
acgtacgtgtgtgtgacgctctcaacgctctgcacacagctggtgaa

【 図 2 5 H H 】

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(N88W, C125A)

[illegible]

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(V91D, C125A)

[illegible]

【 図 2 5 G G 】

tgcgaaggaattcacaaggtcgaaggtctccaaacaaaggctccagccccc
 tcgagaaacacattctccaaacgcaaaaggcgcgcgaagcaaccaggct
 tacacccctgccccctccggggagagatgaccaagaacacagctcagc
 caactcctggtggtcgaagctctccacggagcatcgcgctggagtgctg
 agacgaatcttgcgaacccgtgagatacaactccagacacagcctgcctc
 ctgcacgcgcgctctctctctctctatgaaagctcacgctggaacaag
 caggtggcagcgggtggcagcctctctcactgcctgtatgatcagctc
 tgcacaaccactacaacgcagaagacctctcctctgtctccgggtggaggt
 ggtgggaagcctccaaattctctctcactcaagaagacataattcaatt
 ggagcaactctgttggtgacctgaaagtcttgatggtatcaataaatt
 acaagaatataagattgcatcgcgagttgtgacttttaagttttcatgcga
 aagaagactcactgagttgaagcacttgcgaatttcttgaggagagagtg
 gccattcggagaggttttaatttggctcactccgaagattttcaattcgt
 gccccacggagacttgatctcagTatacaatgtatcgatttggagtgaag
 ggttcagagactaatttatgtgtgagtagctgacgagactgatactat
 cgttgagttttgtaactcggctggatcaatttgcctcaatccatcactcc
 attctgact

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::hulL-2(N88V, C125A)

[illegible]

【図 25 II】

ggtggaacgctcccaattctctctccactaagaagcatcgaatcgaatt
ggagcaactgtgttgaggtctccaagtgaatgagtgatccaattat
acaaagatccaaagtgtactgactgttgacttttaagttttacatgcc
aagaagctcactgagttggaagcattgcgaattgttgaggaggaggtgaa
ggcatctgaggaggttttgaattggctgcataccaaagatttcaactgc
ggccacaggagacttgatcccaatcattcaatGATatgctttggagtgaag
ggtctccagacactttgtgtgtgtagtcgcgcagacagctgactat
cgttgagttttggaatcggtggatcacttttgcgaatccatcatcca
ctttgact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::hullL-2(V91E, C125A)

ttggacatgcagatgcgcacacagctctggggctctgtctctgtcgtgcg
 gtagcgcgcagatgcgcacaaactcacacatgccacgcgcgcgcgcac
 ctgaaactcctggggggacgcgtcactctctctcccccaaaaacccga
 gcaactccatgatctctccgggacccctgagtgcaatgctgtgtgtgtg
 gctgagccacgaagacctgagctcaagtccaactgtactgtgcgtgcg
 tggatgtgcataatgcacgaagaaacccgcgggagggcagctacgcgcg
 acctaccgtgtggtcagctgctcaccgtctgcaccagcagctgctgaa
 tcgaaagatgcacagtcgaagctgacgtctccacaaagccctccagcccc
 tcgaaaaaacactctccaaagccaaagggcgcccgcgaacacaggagt
 tacacctgcgcccaatccggggaggagatgacaaagacagctcagct
 gacctgcgtggttccagctctctctaccgcagcatccgctggagtggt
 agacacatgggcgcgggaagaaacatcaaaagacacgctcccgctggt
 ctactccgcgctctctctctctatgcagacgtcacgtggcgacaaag
 caggtggcgacaggggaaacgtctctctatgccttcgtgatgcaggct
 tgcacaacacacacgcgagaaagcgtctctcctgtctccgggtggagt
 ggtggaaacgctccaaactctctcccataaagaagaccaaattgcaat
 ggaacgacttggtgtgacatgcgaagtgcctgaaagtctacaatatat
 acacaagatccaaagtgcactggatgtgactcttaagtcttaccctcca
 aagaagatcactgagtgaaagcattgcaatgtttggaggaggagtggaa
 cgcttgaggagggttttgaatttgctcataccaagaaattctcaactgc
 gggccacggagactgactccaatatcaatGAGcatgtttggagtgaaag
 gcttcgcagagacttttatgtgtgagcagctgacgagcagctactact
 cgttgaggttttgtaactcgttggaactcatttgcctcaatccatcgtcca
 ctttact

IgG1Fc(N297G₂ 欠失K)::G4S::huIL-2(V91G, C125A)

atggacatgagagtgctgcacagctgctggggcctgctgctgctgtggct
gagaggcgccagatgcgcacaaactcacacatgccaccgtgccagcac
ctgaactctctgggggacgcgtcagcttctctctctcccccaaacccaaag
gcacacctcatgatctccggacacccctgaggtcacatcgctgggtggga
cgtacgcccaacaaacacctcaagctcaaaactcaacttgatcactggaacac

【 図 2 5 J J 】

[illegible]

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(V91S, C125A)

tgagacatggagatgcgcacacagctgtgtggccgtgtgtgtgtgtgtgt
gagcgcgcgcagatgcgcacaaactcacacatgccacacgcgcacacac
ctgaactctgtgggggacgctcagcttctcagcttccccccaaaacccaag
gacacacctcatgatctccccgacccctcaggtccatcagctgtgtggtgga
ctgtgagccaggaagacacctgaggtcaagttcaactgtgactggagcgcg
tggaggtgcataatgcacgaagacacgcgcggcgaggacagctacggcaga
acqctacagctgtgtgtcagcgtctctaccctctctgcacagcagctgtctgaa
tcgcaaggatgatacaggtgcgaagttctccaacaaagccctccacagcccc
tcgaacaaacacatctccaagacaaagggtgcgcgcgcgcgcgcacaggtg
tacacctgcgcccatccccgggagagatgcacgaagacacagctcagctg
gacctcctgtgtccaaggtgttatctccagcgcatacgcctggagttggg
agacacatgtggcagccggagacaacatacgaaccacgcctccccctgtg
ctacgcgcgcgtctctcttctctctatcgaacagctcacgtggcgaagaag
caggtggcagcagggaagcgtctctatcgtctcgtgatcgttgaagtc
tgcaacacacatcacaacgagacagctctcctgtctccgggtggaggt
gtgggaagcgtctcaactctcctcctcactaagaagactcaatttgcaatt
ggacagctgttgttgagctgcaaatgacttctaattggtatacaaatatt
acacaaatccaaagtgcagctgaagttgactttaaagtttcaactgcac
aagaagctctactagttgaaagacttgcgaatttcttggaggagaggttgaa
gccattggagagaggttttgataatttggtcactcaacgaagtttcaactgc
ggccacgggacttgatctccaatatcaatTCGatcgttcttggagtgaag
ggtctccgagagactttaaattgtgtgactacgtcagcagcagctcactact

【 図 2 5 K K 】

cgttgagtttttgaatcggtggatcacttttgctcaatccatcatctcca
ctttgact

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::huIL-2(I92K, C125A)

atggacatgagatggtctctccacagctgctggcgctctgctgctgtgctggtggtgacgcgcgcagatgcgcacaaatcacacatgccacgcgtgccacgcgcac
ctgcacgtccctggtgagctgcgcgtcagttctctctctctcccccaaaacccacg
gacacccctcatgatctcccggaacccctgaggtcacatgggtggtggtggtgac
cgtgagccacgaagacccttgaggtcaagttcaacttgttactgagcgcgcgcg
cgaggtgtgataatgcacaagaacacgcgcgggagggagcagtcaggcgacgc
acgtaccgctgtggtgcagctgctcaacgcctgcctacacggagctgctggtgaa
tgcggaggtgatacgaatgcgaagctgctccaaacagagccctccacgcgccca
tcgagaaaacacatctccaaaggccaaaggagccgcgcgcgcacacagctggt
tacacctgcgcccaatccgggagagagtgacaaaacacaaagctgacctgcgt
gacctgctggtgtaaaagctctctatccagagcagctgcgcgtggagtgctgg
agagacatactgggcgcgcggagaaacactacaagacacgcctccctgctgct
ctactccagcagctctctctctctctatagcagctacacgtggagagagacg
caggtggcagcaggggagacgtctctcatcgtctgctgtagctgagcgtc
tgcaacacactacacgagaaagagcctctccctgctctccgggtggaggtg
ggtggagacgctcccaactctctccctacataaagagactcaatttgactt
ggagacgttgtttggacttgcaaatgacttgaaatgatacaataat
acaaagatccaaagtgtactgcaggtgtgactcttaagtttcaatgcga
aagaagagactactggttgaagcactgcaatgcttgaggagagaggtgaa
gcacatggagagagtttgaatttggctccataccaaagaaattcaactgc
ggccacgggagctgactctcaatatcaatgtgaaagtctttggagtgaaag
ggttcggagagactcttatgtgtgagtagctgcagagcagctactact
cgttgagtttttgatcgcgtggatcactcttgcctcaatccatcatccaca
atttggact

IgG1Fc(N297G_欠失K)::G4S::huIL-2(I92R, C125A)

ttggacatgagagtcgcacacagctctggggcctgctgcctgtgtgctt
 gagagcgccagatgcgcacaaactcacatgccacgctgccacagc
 tgaacctgtggggggacgtcagttcttctcttcccccaaaacccaag
 gacacctctatgattccccgaacccctgaggtacatgtggctgggtgga
 cctgagcacaagaacacctgagtgcaagtccaactgctacgtggagctg
 cgtgagctgcaataatccgaagaacacgcggggaggaagcaatgaggcga
 actcaactgctgggtgcagctgctcaactgcttcagcaggaactgctgaa
 tggcaagagctcaactgctgcaagctctccaaacaaagcctcagaccccca
 tcgagaaacacatcctcaaaaccaaaggcgccccgagacacagggtg
 tacaacctgcctccctccggggaggagtcagcaaaacaaagctgcagct
 gacctgctggtcgaagcctctatccagcagacatccgctgtgagtggtg
 agacacacacacgcgcagagacaacatccagacacacgctccctgctg

【 図 2 5 L L 】

gactccgaagcgtctctctctctctatagcaagctcacggcggaacaagac
caggtgcgcagcagggagacagctctctatcgctcgatgcatgagcgctc
tgcacaacctaactacgcagcaagagcctctccctgtctccgggtgaggt
ggtggaagcgctccaactctctctcctaagaagactcaattgcaatt
ggagcaactgtgtgtggaactgcgaagtctgaaatggtatacaataat
acaagatccaagagtgaactcgagttgcaatttaagttttatacgca
aagaaggctactgagttgaagcacttgcaattgttgaggaggaggtgaa
gcaactggaggaggtgttcaatttggctgcataccaagaattttcaactgc
ggccacagactgtagtccaataatcaatgtgAAGattttggagttgaag
ggttcgagactacttttatgtgtgagtacgctgacgagactgctactat
cgttgagttttgaatcggtggaactctttgctcaaatccatcactcca
ctttgact

IgG1Fc(N297G_ 欠失K)::G4S::hull-2(E95G, C125A)

atgagcatgagagtgcctgcacagctgctggcgctgctgcgtctgtgct
gagaggccgagcatgcgcacaaactcacacatgccccagctgcgcgcagc
ctgaacctctggggggagctcagcttctctctcccccaaacccaaag
gcacacctcatgattctccgggcccctgaggtctacatgcgtgtgtggc
ctgtagcccaagagacactgaggctgaagttcaactgtctgctggacggg
tgagggtgataaatgcacgaacaaagccgcgggagagcagtcagccagc
acgtacagctgtgtgtgctgcgtctctcagctctgcacacaggtctggctgaa
tgccagagaggtacaagtgcgaagttctctcaaacagctctccagccgcac
tcgagaaaaacattctcaaaagccaaaggcgccccgagaaccacaggtg
tacaacctccccctccccgggagagatgcacaaagaacccaggtcagct
gaacctgcgtgttcaaaagcttctctccagcgacatcgccgtgaggtgg
agagaacatggggcagccgggagacaactacaagaccacgctccccgtgtg
gactccgaaggctctcttctctctatgaagactcaccgtgcgaacaag
caggtgcgacgaggggaacgtcttctcatgtctcgctgatgcaagagct
tgcacaacacctacacgcgaagagacctctccccgtctccgggtggaggt
ggtggaagcgtctcaactctctctccataaagaagactcaattgcaatt
ggagcacttgttgttgaccttccaatgatcttgaatggtatcataaatt
acagaagatccaaagtgaactcggtgttgacttttaagttttaactgcc
aagaagctcactgagttgtagaacttgcaatgttgtgaggagaggtgaa
gccacttgaggaggttttgaatttggctcactcaagaattttcaactgc
ggccacgggacttgatctccaattcaaatgtcactgttgtgggtggaag
ggttcagagactatttttgtgtgagtacgtgcagcagactgctcatt
cgttgagttttgaatcggttgatcattcttgctcaatccatcatccac
tttgaact

【圖 26】

[illegible]

輕鎖可變ドメインアミノ酸配列

【図 2 7 A】

経路核酸配列

9D6

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTGCCCTGACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGAGGGAAACACCTATTGGACTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGGCAGTCTCCACA
GCTCTGATCTATACGCTTTCTATCGGGCTCTGGAGTCCAGACAGGTTCACTGGCACTGGGTGAGACTGAT
TTCACACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGAGATTTATTACTGCATGCAACGTATAGAGTTTCTCT
TCACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

2C3

GAAATTGTATTGACGAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCA
GTCAGAGTTTATGACGACGCTACTTAGTCTGGTACCAGACAGAACTGGCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATG
TGACTCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCAT
CAGCAGACTGGAGCTGAAGATTTTCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACTCTCACTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

14C9

GATATTGTGCTGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCATCACTCATACAGTGTGGAAACACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGACAGGGACAGATTTCA
CACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGGGAGTCTGGGGTTTATTACTGCATGCAAACTACACAATTTCCGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGA

8B12

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCCAG
TCAAAACCTCGTTCAAAGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCA
CACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTCTGCATGCAAACTACACAATTTCCGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGA

【図 2 7 C】

12C4

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCTGACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAGAGCCTCTACATAGTAATGGATTCAACTATTGGATTGGTTCTGCAGAAGCCAGGACAGTCTCCAGAGCCC
CTGATCTATTTGGGTTCTGATCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA
CACTGAAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCAACAACCTCGCTCA
CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

9B12

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCTGCCCTGACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATTCAACTATTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAGAGCTC
CTGATCTATTTGGGTTCTGATCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA
CACTGAAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCAACAACCTCGCTCA
CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

3H5

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATATCTGCAGGTCCAG
TCAAAGCCTCTGAACATTGATGGAAGTACCACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTT
ACACTGAAAGTACGACAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAACTACACAATTTCCCACT
TTGGCGCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGA

18A6

GAAATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATTTCTGCAGGTCTAG
TCAAAGCCTCGTTCAGAGTGATGGAATCACTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCA
CACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAACTACACAATTTCCGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGA

【図 2 7 B】

16A4

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATTTCTGCAGGTCTAG
TCAAATCTCTGTAACAGTGATGGAACACCTACTTGAGTTGGCTTCACCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCA
CACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAACTACACAATTTCCGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA

16E1

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAAAGCCTCTGACGAGTGATGGAACACCTACTTGAGTTGGCTTCACCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTT
ACACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAACTACACAATTTCCGACG
TTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA

13A1

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
GTCAAGCCTCTGACAGTGATGGACACACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CTACTTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCA
CACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAACTACACAATTTCCCACTTT
CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

8F10

GATATTGCGAGTGAGTCACTCCACTCTCCTGCCCTGACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATGTCATGCAGGTCTAG
GTCAGAGCCTCTGCATAGTAATGGATTCAACTATTGGATTGTACTGCAGAAGCCAGGGCAGCTCCAAGACT
CCTGATCCATTTGGGTTCTGATCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT
ACATTGAAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGAATTTATTACTGCATGCAAGCTACACAATTTCCCACT
CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

20

【図 2 7 D】

10A6

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAAAGCCTCTGAACAGTGATGGAACACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACT
CCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTT
CACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACAATTTCCGACG
TTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA

10H7

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCCAG
TCACAACCTCTGACGAGTGATGGAACACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACT
CCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTT
ACACTGAAAAATCAGCAGGGTGGGAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACAATTTCCCACT
TTGGGCCAAGGGACCGACTGGAGATTAACGA

15A10

AATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAAAGCCTCTGACAACTGATGGAACACATATTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTT
ACACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGTACACAATTTCCCACT
TTGGGCCAAGGGACGACTGGAGATTAACGA

12D2

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCAACCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCCTGAGGTCTAG
TCATAACCTCATACACAGTGATGGAACACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCTCCAAGACTC
CTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGTCCCGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTTCA
CACTGAAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAACTACAGATTTCCCACTTT
CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

【 2 7 E 】

9B10

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTACCCCTTGGACAGCCGGCTCCATCTCTGCAGGTCTAG
TCATAACCTCTACACAGTGATGGAAACACCTACTTGGTTGGCTTCAGCAGAGGCGAGGCCAGCTCCAAAGACTC
CTAATTATGAGATTCTAACCGGTTCTCTGGGGTCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCAC
CACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGTTACACAATTTCCACTTT
CGGGCGCGGACCAAGGTGGAGATCAACGA

17D3

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCTGCAGGGCCA
GTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTAGCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGGCTCTCATCTATGG
TGATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCAT
CAGCAGACTGSAAGCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAACGA

15G11

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCTGTAGGGCCA
GTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTAGCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGGCTCTCATCTATGG
GTCCATTTCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTCACCTCAACCAT
CAGCAGACTGSAAGCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTAATTCATCGATCACTTCGGGCCAA
GGGACAGACTGGAGATTAACGA

14D7

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGACATTAGAGATGATTTAAATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCTGATCTATGCTGC
ATCCAGTTTCCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCAACCATCAGC
AGTCTGCAACTGGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTCACTATATCCTCGGAGCTTGGCCCAAGGGA
CCAAGGTGGAATCAACGA

【 2 7 G 】

21D10

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGGACATTAGAGATGATTTAAGTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCTGATCTATGTTG
TATCCAGTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCACTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTACAATCA
GCAGCTCGACGCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGTTACCCGTGGACGTTGCGCCAAAGG
GACCAAGGTGGAATCAACGA

14A6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGGGCATTAGAGATGATTTAAGTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCTGATCTATGCTGC
CATCCAGTTTGCCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCACTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTACAATCA
GCAGCTCGACGCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGTTACCCCTCGAGCTTTTGCCACGGG
GACCAAGCTGGAGATCAGACGA

11D6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGGACATTGAACATGATTAGGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCTGATCTATGCTGC
CATCCACTTTGCCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCACTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTACAATCAG
CAGCTCGACGCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTTCCCTCGAGATTTTGCCACGGGGA
CCCAGCTGGAGATCAACGA

10A9

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCTACCCCTGSAAGAGCCGCTCCATCTCTGCAGGTCTAC
TCAGAGCCTCTGGATGGTGATGATGGAACACCCCTTTGGACTGGTACCTGCAGAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACA
GCTCCTGATCTATACGCTTTTCTATGGGCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGCACTGAT
TTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTTTAGAGTTTCTCT
TCACTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAACGA

【 2 7 F 】

18F3

TCCTATGAGCTGACACAGCCACCTCGGTGTCACTGTCCCCAGGACAACGGCCAGGATCGCTGCTGGAGAT
GCATTGCCAAGAAAATTGCTTATTTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCACTCTGAGGACA
GCAGACGACCTCCGGGATCCCTGAGAGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAATGGCCACCTTGACTATCAGTG
GGGCCAGGTGGAGGATGAAGCTGACTACTCTGTTTCTCAACAGACAGCAGTGCTAATCATAGGGATTTCGGCG
GAGGGACCAAGCTGACGCTCTAGGT

17D9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGGACATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCTGATCTATGCTG
CATCCAGTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCACTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTACAATCA
GCAGCTCGACGCTGAAGATTTTCAAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGG
GACCAAGGTGGAGATCAACGA

21F8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGGGCATTAGAGATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCTGATCTATGCTG
CAACCATGTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCACTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTACAATCA
GCAGCTCGACGCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGCTGAGCTTCGGCCAAAG
GACCAAGGTGGAATCAACGA

22B9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGGACATCAGAGATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCGCTGATCTATGTTG
CATCCAGTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCACTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTACAATCA
GCAGCTCGACGCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTSAGCTTCGGCCAAAG
GACCAAGGTGGAAATCAACGA

【 2 7 H 】

16E3

GACATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTTCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATCTCTGCAGGTCTAG
TCAGAGCCTCTGGATAGTGATGAAGGAAACACCTTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGCTCCACA
GCTCCTGATCTATACGCTTCTCATCGGCTCTGGAGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGCACTGAT
TTCACTGCAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAAGTATAGAGTTTCTC
TCACTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAACGA

14G7

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGA
GTCAGGACATTAGCAACTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGC
ATCCAAATTTGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAGTGGATCTGAGACAGATTTTACTTTCACCATCAGC
AGCTCGACGCTGAAGATTTTGCAACTATATTACTGTCAACAGATGAAAATCTCCACTTTCGGCCCTGGGAC
CAAAGTGGATATCAACGA

5H3

TCCTATGAGCTGACACAGCCACCTCGGTGTCACTGTCCCCAGGACAGAGCGCCAGGATCACCTGCTCGGAGAT
GCATTGCCAAGGCAATATGCTTATTTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCCAGGCCCTATGCTGGTGAATATATAAGAC
AGTGAGAGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAACAGTCAAGTTTGACCATCAGT
GGAGTCCAGCAGAAAGACAGGCTGACTATTACTGTCAATCAGCAGACAGAGTGGTACTTATGTGGTATTTCGCG
GGAGGGACCAAGCTGACCTCTAGGT

2B12

TCCTATGAGCTGACACAGCCACCTCGGTGTCACTGTCCCCAGGACAACGGCCAGGATCACCTGCTCGGAGAT
GCATTGCCAAGAAAATATGCTTATTTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCACTATGAGGAC
AGCAAACGACCTCCGGATCCCTGAGAGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAATGGCCACCTTGACTATCAGTG
GGGCCAGGTGGAGGACGAAGCTGACTACTGTTACTCAACAGACAGCAGTGTAATCATTATGTCTTCGGAA
CTGGGACCAAGGTGACCTCTAGGT

【図 2 9 B】

16A4

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCAGGGAGGTCCTTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAG
TTATATGGTATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
CAAGAACACGCTGTTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGA
TTGGTTCGGGGAGGGCACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCTCTCA

16E1

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGSTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAACATGSCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGACAGT
TATATGGAATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAT
TGGCTCGGGAGGCGGCACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCTCTCA

13A1

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAG
TTATATGGTATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAAG
AGTGGGAGCTAGAGGACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCTCTCA

8F10

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGSTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGTATGGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATGGTATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGC
AGTGGCTGGTACGGGACGGGACTACTACTACGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCT
CTCA

【図 2 9 D】

10A6

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGSTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGACATCACTGGGTCCGTCAAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATGGTATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACGG
GGAGCAGTGGCGGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCAACGCTCTCTCA

10H7

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGSTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGACATCACTGGGTCCGTCAAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATGGTATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAG
GAGCAGTGGCTGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCAACGCTCTCTCA

15A10

CAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGSCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGCATGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATGGTATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACAA
CTGGGATCCGATGCTTTGATATCTGGGGCCAAGGACAATGGTCAACGCTCTCTCA

12D2

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGSTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGSCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATGGTATGATGGAAGTAATGAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAG
TTACTATGATAGTAGTGGTTATTACTACGGGGAGGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCAACGCTCTCC
TCA

【図 2 9 C】

12C4

CAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACGTTTCAGTAGTTATGGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAG
TTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACCATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
CAAGAATACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGAGC
AGTGGCTGGTACGGGACGGGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCT
CTCA

9B12

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTTAGTAGTTATGGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACCATGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAATACGTTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGAACA
GTGGCTGGTACGGGACGGGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCTCT
TCA

3H5

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTTTGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAATACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGAGACAT
TTTTGGAGTGATTATCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCAACGCTCTCTCA

18A6

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCT
GGATTACCTTCAGGAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATATCAGATGATGGAAGTAATAAATACTATGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGACTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTC
TATAGCAGTGCTGGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCAACGCTCTCTCA

【図 2 9 E】

9B10

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGT
TATCTGGTATGATGGAATTATAAATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGC
GATGATAGTAGTAGTGGTTATTACTCGGGGAGGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTTGGTCAACGCTCTCC
TCA

17D3

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCT
GGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCATAC
ATTAGTAGTAGTGGTAGTATCATTTTTACGAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGAACACGCCA
AGAACTCACTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGAGAGAGTTA
GTATAACCCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTTGGTCAACGCTCTCTCA

15G11

CAGGTCACTTGAAGGAGTCTGGTCTGTGCTGGTGAACCCACAGAGACCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTG
GGTTCTCACTCAGATGCTAGAAATGGGTGTGAGCTGGATCCGTACGCCCCAGGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTG
CACACATTTTTTGAATGACGAAAAATCTACAGCACATCTGAAAGAGAGGCTCACCATCTCCAGGACACCTCC
AAAAGCAGGTGGTCTTACCATGACCAACATGGACCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGTACGGATACCGA
GATGGCTACAAACCCCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCTCTCA

14D7

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCTTCACAGACCTGTCCCTCACTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGSAATGGATCCGCCAGCACCCAGGGGAAGGGCTGGAGTGGAT
TGGGTACACTATTACAGTGGGAACACCCACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGATTACCATATCAGTAGACAGC
TCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTGTGTATTGCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACT
GGGGAGCTGATGCTTTTATCTGGGGCCAAGGACAATGGTCAACGCTCTCTCA

10

20

30

40

50

【 図 2 9 F 】

18F3

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCAGAGACCCTGTCCCTACCTGCACCTGTCTCG
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGCTGGAGTGGAT
TGGGTACATCTATTATAGTGGGAGCACCAGCTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGGTATCATACAGGAGACAC
GTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAATCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGA
GGGGAGGTTCTGGGAGTATAGCTCTCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTCA

17D9

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGAGACCCTGTCCCTACCTGCACCTGTCTCT
GGTGGCTCCGTAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGCTGGAGTGGAT
TGGGAATACCTATTACAGTGGGAGCACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAACCATATCAGTAGACAGC
TCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTCTGTGACCCGTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGGAGAGAC
CGGGGTAGAGCAGTGGGTCCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTCA

21F8

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC
TGGATACACCTTCACCAATTATGATATCACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGATG
GATGAACCTTAACAGTGGTAAACAGGCTATGCACAGAAGTTCAGGGGACAGGTACCATGACCAAGGAACCTTC
CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTA
GGCAGTGGCTGGTACTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTCA

22B9

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC
TGGATACACCTTCACCAATTATGATATCACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGATG
GATGAACCTTAACAGTGGTAAACAGGCTATGACAGAAGTTCAGGGGACAGGTACCATGACCAAGGAACCTTC
CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTA
GGCAGTGGCTGGTACTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTCA

【 図 2 9 H 】

16E3

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACGGCTTTACCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGAAAGGCTGGAGTGGATGGGGA
CCATCTATCTGGTGACTCTGATACAGATACAGTCCGCTCTTCCAAGGCCAGGTCACTTCTCAGCCGACAAGTCC
ATCAGCACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACCGCATGTATTACTGTGCGAGACAGGGT
AGAAGTACTACTACTTCGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACACCGTCACCGTCTCTCTCA

14G7

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACAGCTTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAAGGCTGGAATGGATGGGGA
TCATCTATCTTATGACTCTGATACAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACCTCTCAGCCGACAAGTCC
ATCAGCACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACCGCATGTATTACTGTGCGAGACATCGG
GGGGGGAGGCTCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGACACCGGTACCGTCTCTCTCA

5H3

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACAGCTTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAAGGCTGGAATGGATGGGGA
TCATCTATCTGGTGACTCTGATACCAATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAAGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCC
ATCAACACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACCGCATGTATTACTGTGCGAGAGAGGGT
TTCGGGGAGTCTATTCACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAAGGACACCGGTACCGTCTCTCTCA

2B12

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACAAATTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAAGGCTGGAGTGGATGGGGA
TCATCTATCTGGTGACTCTGAACCAAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTC
CATCAGCACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACCGCATGTATTACTGTGCGAGACATGG
AGGGGGATGGAGTGGTGGGGATGAGCGTCTGGGGCCAAAGGACACCGGTACCGTCTCTCTCA

【 図 2 9 G 】

21D10

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC
TGGATACAGGTTTACCAGTTATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGGAT
GGATGAACCCAAACAGTGGTAAACACAGGCTATGCAAGAAGTTCAGGGGACAGGTCAACATGACCAAGAACACC
TCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGT
AGGCAGTGGCTGGTACTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTCA

14A6

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC
TGGATACACCTTCACCACTTATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGGATG
GATGAACCTTAACAGTGGTAAACACAGGCTATGCAAGAAGTTCAGGGGACAGGTCAACATGACCAAGGAACCTTC
CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTTAAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCC
GGCAGTGGCTGGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTCA

11D6

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC
TGGATACACCTTCACCAATTATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGGATG
GATGAACCTTAAGTGGTAAACACAGGCTATGCAAGAAGTTCAGGGGACAGGTCAACATGACCAAGGAACCTTC
CATAAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCC
GGCAGTGGCTGGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTCA

10A9

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACAGCTTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAAGGCTGGAGTGGATGGGGA
TCATCTATCTGGTGACTCTGATACAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCC
ATCAGCACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACCGCATGTATTACTGTGCGGACAGGGT
AGAAGTACCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGACACCGTCAACCGTCTCTCTCA

【 図 2 9 I 】

26H7

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACAGGTTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAAGGCTGGAGTGGATGGGGA
TCATCTATCTGGTGACTCTGATACCAATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCC
ATCAGTACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACCGCATGTATTACTGTGCGAGACATGGT
GGATATAGTGGCGTCTCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGGACCGGGTCAACCGTCTCTCTCA

26C12

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACAGGTTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAAGGCTGGAGTGGATGGGGA
TCATCTTTCTGGTGACTCTGATACAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCC
ATCACCACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACCGCATGTATTACTGTGCGGACATGGG
CATGCGAGCTGTCTCGGGCGACTACTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAAGGACACCGGTCAACGTCTCC
TCA

2H11

GAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTC
TGGATACAACTTTACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCGGGAAAGGCTGGAGTGGATGGGGA
TCATCTATCTGGTGACTCTGATACCAATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACATTTACGCCGACAAGTCC
ATCAACACCGCTACTCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTGGGACACAGCCATTATTACTGTGCGAGAGACACA
GGATACCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCGTCTCTCTCA

18H9

CAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTC
TGGATTACCTTCAGTAGCTATGGATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGGACAT
TATCTGGTATGATGGAAGTAATAATTCTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAAATCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAAAGAACGCTGAGAGGCCAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGACCCGG
GTCCGATTACTACTTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGACACGGTCAACCGTCTCTCTCA

10

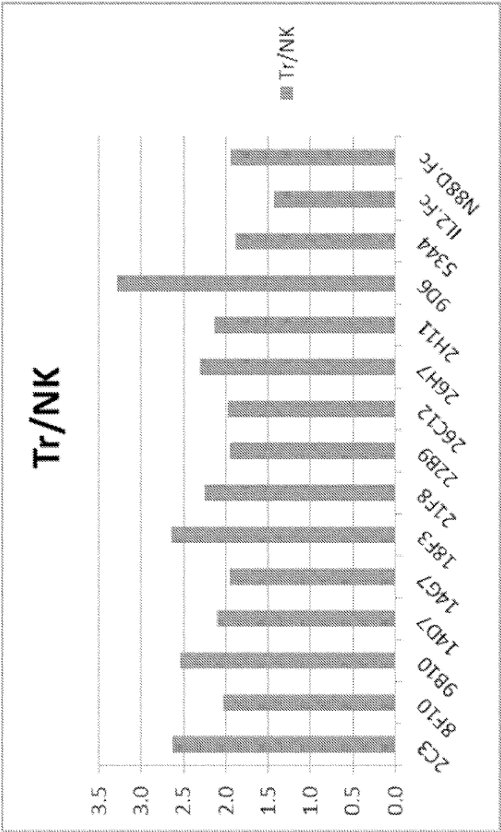
20

30

40

50

【図 30】



【配列表】

0007422480000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	15/06 (2006.01)	A 6 1 P	15/06	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/14	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	15/26 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/26	
		C 1 2 P	21/02	C

ポート・ムーディ、ヘンリー・ストリート・2 7 0 9

(72)発明者

ギャビン、マルク・アラン

アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 1 0 1、シアトル、ナインス・アベニュー・1 2 0 1、ルーム・2 8 7、ベナロヤ・リサーチ・インスティテュート・アット・バージニア・メイソン

(72)発明者

フォルツ、イアン・ネビン

カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・5・エイ・4・ピー・9、バーナビー、ナイツウッド・プレイス・2 1 0 8

(72)発明者

シア、ドン

アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 0 5 2、レドモンド、ノースイースト・ナインティセブンス・ウェイ・1 7 4 0 1

(72)発明者

アルコーン、ディナ・エヌ

アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 0 2 3、フェデラル・ウェイ、サウスウェスト・キャンパス・ドライブ・1 3 0 0・ユニット・5 - 1

(72)発明者

リム、アイ・チン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 0 7 0、サン・カルロス、ポート・マリーノ・ドライブ・1 0 0 9

(72)発明者

ケッチェム、ランドル・ロバート

アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 2 9 6、スノホミッシュ、ワンハンドレッドフィフティセカンド・ストリート・サウスイースト・6 3 3 2

(72)発明者

マンチュレンコ、キャシー

カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・3・シー・6・ピー・9、ポート・コキットラム、アーグ・ストリート・2 9 - 2 3 8 1

(72)発明者

セキロフ、ローラ

カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・6・エイチ・4・ジー・8、バンクーバー、ウェスト・イレブンス・アベニュー・8 0 4 - 1 3 1 6

(72)発明者

ベリー、ケリー・アン

カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・3・シー・5・ワイ・5、ポート・コキットラム、セトラーズ・コート・1 1 5 9

(72)発明者

デ・イムス、シール・クロビス・チュア

アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 0 2 8、ケンモア、ノースイースト・ツーハンドレッドス・ストリート・7 8 1 7

(72)発明者

アグラワル、ニーラジ・ジャグディシュ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、サウザンド・オークス、カミノ・オルモ・1 6 1 0、アパートメント・ケイ

-
- (72)発明者 カナン, グナセーカラン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94015、デーリー・シティー、クレストビュー・サークル・151
- (72)発明者 リー, リー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94066、サン・ブルーノ、シェルター・クリーク・レイン・4248
- 合議体
- 審判長 長井 啓子
- 審判官 松本 淳
- 審判官 福井 悟
- (56)参考文献 国際公開第2014/153111号(WO, A2)
国際公開第2014/153063号(WO, A1)
特表2011-519882号公報(JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
C07K1/00-19/00
CAP1us/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)