

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-532904  
(P2023-532904A)

(43)公表日 令和5年8月1日(2023.8.1)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/26 (2006.01)	C 1 2 N	15/26	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
		(全140頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-580769(P2022-580769)	(71)出願人	514199744
(86)(22)出願日	令和3年7月1日(2021.7.1)		インヒブルクス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年2月22日(2023.2.22)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル
(86)国際出願番号	PCT/US2021/040061		ニア ラ ホヤ ノース トーリー パイン
(87)国際公開番号	WO2022/006380		ズ ロード 1 1 0 2 5 스위트 2 0 0
(87)国際公開日	令和4年1月6日(2022.1.6)	(74)代理人	110000796
(31)優先権主張番号	63/047,681		弁理士法人三枝国際特許事務所
(32)優先日	令和2年7月2日(2020.7.2)	(72)発明者	ティマー ジョン シー .
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	スルツマイアー フロリアン
			アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル
			ニア ラ ホヤ ノース トーリー パイン
			ズ ロード 1 1 0 2 5 스위트 2 0 0
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 修飾 I L - 2 ポリペプチドを含むポリペプチド及びその使用

(57)【要約】

本明細書では、修飾 I L - 2 を含むポリペプチドであって、修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比べて I L - 2 受容体に対する親和性が低下している、ポリペプチドが提供される。幾つかの実施形態においては、活性化 T 細胞に結合して作動する、修飾 I L - 2 を含むポリペプチドが提供される。修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの使用も提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

修飾 I L - 2 を含むポリペプチドであって、前記修飾 I L - 2 は、D 8 4 Y 置換を含む、ポリペプチド。

**【請求項 2】**

前記修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 2 2 に対する親和性が低下している、請求項 1 に記載のポリペプチド。

**【請求項 3】**

前記修飾 I L - 2 は、H 1 6、L 1 9、M 2 3、N 8 8、及び E 9 5 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド。

10

**【請求項 4】**

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 H 1 6 に置換を含む、請求項 3 に記載のポリペプチド。

**【請求項 5】**

前記置換は、H 1 6 A、H 1 6 N、H 1 6 V、及び H 1 6 T から選択される、請求項 4 に記載のポリペプチド。

**【請求項 6】**

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 L 1 9 に置換を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

**【請求項 7】**

前記置換は、L 1 9 A、L 1 9 P、L 1 9 Q、L 1 9 Y、L 1 9 N、L 1 9 S、L 1 9 T、L 1 9 V から選択される、請求項 6 に記載のポリペプチド。

**【請求項 8】**

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 M 2 3 に置換を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項 9】**

前記置換は、M 2 3 A、M 2 3 G、M 2 3 S、M 2 3 T、M 2 3 V、M 2 3 D、M 2 3 E、M 2 3 I、M 2 3 K、M 2 3 L、M 2 3 N、M 2 3 Q、M 2 3 R、及び M 2 3 Y から選択される、請求項 8 に記載のポリペプチド。

30

**【請求項 10】**

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 N 8 8 に置換を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項 11】**

前記置換は、N 8 8 T、N 8 8 A、及び N 8 8 S から選択される、請求項 10 に記載のポリペプチド。

**【請求項 12】**

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 E 9 5 に置換を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項 13】**

前記置換は、E 9 5 Q、E 9 5 G、E 9 5 T、E 9 5 V、E 9 5 P、E 9 5 H、E 9 5 N、及び E 9 5 Y から選択される、請求項 12 に記載のポリペプチド。

40

**【請求項 14】**

前記修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 3 2 に対する親和性を低下させる少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項 15】**

前記修飾 I L - 2 は、Q 2 2、R 1 2 0、T 1 2 3、Q 1 2 6、S 1 2 7、I 1 2 9、及び S 1 3 0 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項 16】**

50

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 Q 2 2 に置換を含む、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

前記置換は、Q 2 2 A、Q 2 2 D、Q 2 2 G、Q 2 2 H、Q 2 2 K、Q 2 2 N、Q 2 2 R、Q 2 2 S、Q 2 2 T、Q 2 2 V、及び Q 2 2 Y から選択される、請求項 1 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 8】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 R 1 2 0 に置換を含む、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

前記置換は、R 1 2 0 A、R 1 2 0 D、R 1 2 0 E、R 1 2 0 F、R 1 2 0 G、R 1 2 0 H、R 1 2 0 K、R 1 2 0 N、R 1 2 0 Q、R 1 2 0 S、R 1 2 0 V、及び R 1 2 0 Y から選択される、請求項 1 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 T 1 2 3 に置換を含む、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 1】

前記置換は、T 1 2 3 D、T 1 2 3 E、T 1 2 3 H、T 1 2 3 K、T 1 2 3 N、T 1 2 3 Q、及び T 1 2 3 R から選択される、請求項 2 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 Q 1 2 6 に置換を含む、請求項 1 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 3】

前記置換は、Q 1 2 6 N、Q 1 2 6 A、及び Q 1 2 6 Y から選択される、請求項 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 2 7 に置換を含む、請求項 1 5 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 5】

前記置換は、S 1 2 7 D、S 1 2 7 E、S 1 2 7 H、S 1 2 7 K、S 1 2 7 N、S 1 2 7 P、及び S 1 2 7 R から選択される、請求項 2 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 6】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 I 1 2 9 に置換を含む、請求項 1 5 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 7】

前記置換は、I 1 2 9 A、I 1 2 9 H、I 1 2 9 R、及び I 1 2 9 S から選択される、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 8】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 3 0 に置換を含む、請求項 1 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 9】

前記置換は、S 1 3 0 E、S 1 3 0 K、S 1 3 0 N、S 1 3 0 P、S 1 3 0 Q、及び S 1 3 0 R から選択される、請求項 2 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 0】

修飾 I L - 2 を含むポリペプチドであって、前記修飾 I L - 2 は、Q 2 2、R 1 2 0、T 1 2 3、S 1 2 7、及び S 1 3 0 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、ポリペプチド。

【請求項 3 1】

前記修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 3 2 に対する親和性が低下している、請求項 3 0 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 32】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 Q 2 2 に置換を含む、請求項 3 0 又は 3 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 33】

前記置換は、Q 2 2 A、Q 2 2 D、Q 2 2 E、Q 2 2 G、Q 2 2 H、Q 2 2 K、Q 2 2 N、Q 2 2 P、Q 2 2 R、Q 2 2 S、Q 2 2 T、Q 2 2 V、及び Q 2 2 Y から選択される、請求項 3 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 34】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 R 1 2 0 に置換を含む、請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 35】

前記置換は、R 1 2 0 A、R 1 2 0 D、R 1 2 0 E、R 1 2 0 F、R 1 2 0 G、R 1 2 0 H、R 1 2 0 K、R 1 2 0 N、R 1 2 0 P、R 1 2 0 Q、R 1 2 0 S、R 1 2 0 V、及び R 1 2 0 Y から選択される、請求項 3 4 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 36】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 T 1 2 3 に置換を含む、請求項 3 0 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 37】

前記置換は、T 1 2 3 D、T 1 2 3 E、T 1 2 3 H、T 1 2 3 K、T 1 2 3 N、T 1 2 3 Q、及び T 1 2 3 R から選択される、請求項 3 6 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 38】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 2 7 に置換を含む、請求項 3 0 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 39】

前記置換は、S 1 2 7 D、S 1 2 7 E、S 1 2 7 H、S 1 2 7 K、S 1 2 7 N、S 1 2 7 P、S 1 2 7 Q、及び S 1 2 7 R から選択される、請求項 3 8 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 40】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 3 0 に置換を含む、請求項 3 0 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 41】

前記置換は、S 1 3 0 D、S 1 3 0 E、S 1 3 0 H、S 1 3 0 K、S 1 3 0 N、S 1 3 0 P、S 1 3 0 Q、及び S 1 3 0 R から選択される、請求項 4 0 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 42】

前記修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 2 2 に対する親和性を低下させる少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 3 0 ~ 4 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 43】

前記修飾 I L - 2 は、H 1 6、L 1 9、M 2 3、D 8 4、N 8 8、及び E 9 5 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 4 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 44】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 H 1 6 に置換を含む、請求項 4 3 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 45】

前記置換は、H 1 6 A、H 1 6 T、H 1 6 V、及び H 1 6 N から選択される、請求項 4 4 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 46】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 L 1 9 に置換を含む、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 47】

10

20

30

40

50

前記置換は、L 1 9 A、L 1 9 P、L 1 9 Q、L 1 9 Y、L 1 9 N、L 1 9 S、L 1 9 T、L 1 9 Vから選択される、請求項 4 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 8】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 M 2 3 に置換を含む、請求項 4 3 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 9】

前記置換は、M 2 3 A、M 2 3 G、M 2 3 S、M 2 3 T、M 2 3 V、M 2 3 D、M 2 3 E、M 2 3 I、M 2 3 K、M 2 3 L、M 2 3 N、M 2 3 Q、M 2 3 R、及び M 2 3 Y から選択される、請求項 4 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 0】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 D 8 4 に置換を含む、請求項 4 3 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5 1】

前記置換は、D 8 4 S、D 8 4 G、D 8 4 A、D 8 4 T、D 8 4 V、D 8 4 Y、及び D 8 4 N から選択される、請求項 5 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 2】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 N 8 8 に置換を含む、請求項 4 3 ~ 5 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5 3】

前記置換は、N 8 8 T、N 8 8 A、及び N 8 8 S から選択される、請求項 5 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 4】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 E 9 5 に置換を含む、請求項 4 3 ~ 5 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5 5】

前記置換は、E 9 5 Q、E 9 5 G、E 9 5 T、E 9 5 V、E 9 5 P、E 9 5 H、E 9 5 N、及び E 9 5 Y から選択される、請求項 5 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 6】

前記修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 2 5 に対する親和性を低下させる少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

前記修飾 I L - 2 は、K 4 3、Y 4 5、E 6 1、I 1 1 4、P 6 5、F 4 2、R 3 8、及び L 7 2 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含み、及び/又は前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸 F 4 2 の欠失を含む、請求項 1 ~ 5 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸 F 4 2 に置換を含むか、又はアミノ酸 F 4 2 の欠失を含む、請求項 5 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 9】

前記修飾 I L - 2 は、F 4 2 K、F 4 2 A、F 4 2 R、F 4 2 G、F 4 2 S、及び F 4 2 T から選択されるアミノ酸位置 F 4 2 の置換を含む、請求項 5 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸 F 4 2 の欠失を含む、請求項 5 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 1】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 K 4 3 に置換を含む、請求項 5 7 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6 2】

前記置換は、K 4 3 E 及び K 4 3 D から選択される、請求項 6 1 に記載のポリペプチド

10

20

30

40

50

。

【請求項 63】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 Y 4 5 に置換を含む、請求項 5 7 ~ 6 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 64】

前記置換は、Y 4 5 R 及び Y 4 5 K から選択される、請求項 6 3 に記載のポリペプチド

。

【請求項 65】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 E 6 1 に置換を含む、請求項 5 7 ~ 6 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 66】

前記置換は、E 6 1 R、E 6 1 G、E 6 1 H、E 6 1 N、E 6 1 P、E 6 1 S、E 6 1 T、E 6 1 Y、E 6 1 A、E 6 1 Q、及び E 6 1 K から選択される、請求項 6 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 67】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 I 1 1 4 に置換を含む、請求項 5 7 ~ 6 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 68】

前記置換は、I 1 1 4 F、I 1 1 4 Y、又は I 1 1 4 W である、請求項 6 7 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 69】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 P 6 5 に置換を含む、請求項 5 7 ~ 6 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 70】

前記置換は、P 6 5 R、P 6 5 E、P 6 5 K、P 6 5 H、P 6 5 Y、P 6 5 Q、P 6 5 D、及び P 6 5 N から選択される、請求項 6 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 71】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 R 3 8 に置換を含む、請求項 5 7 ~ 7 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 72】

前記 R 3 8 での置換は、R 3 8 A 及び R 3 8 G から選択される、請求項 7 1 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 73】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 L 7 2 に置換を含む、請求項 5 7 ~ 7 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 74】

前記 L 7 2 での置換は、L 7 2 G である、請求項 7 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 75】

前記修飾 I L - 2 は、置換 Q 2 2 A、又は置換 R 1 2 0 A、又は置換 Q 2 2 A 及び R 1 2 0 A を含む、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 76】

前記修飾 I L - 2 は、置換 P 6 5 R 及び R 3 8 A 又は置換 P 6 5 R 及び E 6 1 R を含む、請求項 1 ~ 7 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 77】

前記修飾 I L - 2 は、H 1 6 A、L 1 9 A、L 1 9 N、M 2 3 A、D 8 4 S 又は D 8 4 Y、N 8 8 S、及び E 9 5 Q から選択される少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 ~ 7 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 78】

前記修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 P 6 5、H 1 6、及び D 8 4 に置換を含む、請求項 1 ~ 7 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

50

## 【請求項 79】

前記修飾 I L - 2 は、置換 P 6 5 R、H 1 6 A、及び D 8 4 S、又は置換 P 6 5 R、H 1 6 A、及び D 8 4 Y を含む、請求項 7 8 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 80】

前記修飾 I L - 2 は、T 3 及び C 1 2 5 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含み、及び / 又は I L - 2 の最初の 5 つのアミノ酸の欠失を含む、請求項 1 ~ 7 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 81】

前記修飾 I L - 2 は、T 3 A、C 1 2 5 A、C 1 2 5 V、及び C 1 2 5 S から選択される少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 8 0 に記載のポリペプチド。

10

## 【請求項 82】

前記修飾 I L - 2 は、T 3 A 及び C 1 2 5 S 置換、又は T 3 A 及び C 1 2 5 V 置換を含む、請求項 8 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 83】

前記修飾 I L - 2 は、I L - 2 の最初の 5 つのアミノ酸の欠失と、C 1 2 5 S 置換又は C 1 2 5 V 置換とを含む、請求項 8 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 84】

前記修飾 I L - 2 は、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、及び ( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D ) から選択される一連の置換を含む、請求項 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

## 【請求項 85】

修飾 I L - 2 を含む修飾ポリペプチドであって、前記修飾 I L - 2 は、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、及び ( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D ) から選択される一連の置換を含む、修飾ポリペプチド。

30

## 【請求項 86】

前記修飾 I L - 2 は、前記指定の置換を含み、任意の付加的な置換を含まない、請求項 1 ~ 8 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

## 【請求項 87】

前記修飾 I L - 2 は、修飾ヒト I L - 2 である、請求項 1 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 88】

前記アミノ酸位置は、配列番号 1 中のアミノ酸位置に対応する、請求項 1 ~ 8 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 89】

前記修飾 I L - 2 は、配列番号 8 4 と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一のアミノ酸配列を含み、配列番

50

号 105 ~ 配列番号 290 から選択されるアミノ酸配列の対応する置換を含む、請求項 1 ~ 88 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 90】

前記修飾 I L - 2 は、配列番号 270 ~ 配列番号 277 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一のアミノ酸配列を含み、置換 D 84 Y を含む、請求項 1 ~ 89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 91】

前記修飾 I L - 2 は、配列番号 105 ~ 配列番号 290 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 90 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 92】

前記修飾 I L - 2 は、配列番号 270 ~ 配列番号 277 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 91 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 93】

前記ポリペプチドは、F c 領域を含む、請求項 1 ~ 92 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 94】

前記修飾 I L - 2 は、前記 F c 領域の N 末端又は C 末端に融合している、請求項 93 に記載のポリペプチド。

【請求項 95】

前記 F c 領域は、K a b a t アミノ酸位置 T 366 に置換を含む、請求項 93 又は 94 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 96】

前記 F c 領域は、T 366 W 置換を含む、請求項 95 に記載のポリペプチド。

【請求項 97】

前記 F c 領域は、T 366、L 368、及び Y 407 から選択される少なくとも 1 つの K a b a t アミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 93 又は 94 に記載のポリペプチド。

【請求項 98】

前記 F c 領域は、T 366 S、L 368 A、及び Y 407 V 突然変異を含む、請求項 108 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 99】

前記 F c 領域は、S 354 及び Y 349 から選択される K a b a t 位置に置換を含む、請求項 93 ~ 98 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 100】

前記 F c 領域は、S 354 C 又は Y 349 C 置換を含む、請求項 99 に記載のポリペプチド。

【請求項 101】

前記 F c 領域は、K a b a t アミノ酸位置 H 435 に置換を含む、請求項 93 ~ 100 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 102】

前記 F c 領域は、H 435 R 及び H 435 K から選択される置換を含む、請求項 101 に記載のポリペプチド。

【請求項 103】

前記 F c 領域は、M 252 及び M 428 から選択される少なくとも 1 つの K a b a t アミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 93 ~ 102 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 104】

前記 F c 領域は、M 252 Y 及び M 428 V 置換を含む、請求項 103 に記載のポリペプチド。

50

## 【請求項 105】

前記 F c 領域は、K a b a t アミノ酸 E 2 3 3、L 2 3 4、及び L 2 3 5 の欠失を含む、請求項 9 3 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 106】

前記 F c 領域は、L 2 3 4、L 2 3 5、及び P 3 2 9 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 9 3 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 107】

前記 F c 領域は、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び P 3 2 9 G 置換を含む、請求項 1 0 6 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 108】

前記 F c 領域は、配列番号 4 7 ~ 配列番号 8 3、配列番号 2 9 2 及び配列番号 2 9 3 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 9 3 ~ 1 0 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 109】

前記 F c 領域は、重鎖定常領域の一部である、請求項 9 3 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 110】

前記重鎖定常領域は、I g G 定常領域である、請求項 1 0 9 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 111】

前記重鎖定常領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 定常領域である、請求項 1 1 0 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 112】

前記修飾 I L - 2 は、前記 F c 領域又は重鎖定常領域の C 末端に融合している、請求項 9 3 ~ 1 1 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 113】

前記修飾 I L - 2 は、1 個 ~ 2 0 個のアミノ酸を含むリンカーによって前記 F c 領域又は重鎖定常領域の C 末端に融合している、請求項 1 1 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 114】

前記リンカーは、グリシンアミノ酸を含む、請求項 1 1 3 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 115】

前記リンカーは、グリシン及びセリンアミノ酸を含む、請求項 1 1 4 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 116】

前記リンカー中の前記アミノ酸の大部分又は全てがグリシン及びセリンである、請求項 1 1 3 ~ 1 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 117】

前記ポリペプチドは、配列番号 1 0 5 ~ 配列番号 2 9 0 から選択されるアミノ酸配列と、配列番号 4 8、配列番号 6 4、配列番号 2 9 2、及び配列番号 2 9 3 から選択されるアミノ酸配列とを含む、請求項 9 3 ~ 1 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 118】

前記ポリペプチドは、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む、請求項 1 ~ 1 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 119】

前記ポリペプチドは、2 つ、3 つ、又は 4 つの抗原結合ドメインを含む、請求項 1 1 8 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 120】

少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、T 細胞抗原又はナチュラルキラー細胞抗原に特異的に結合する、請求項 1 1 8 又は 1 1 9 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2 1】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、CD4<sup>+</sup>T細胞抗原又はCD8<sup>+</sup>T細胞抗原に特異的に結合する、請求項 1 1 8 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 2】

前記少なくとも1つの抗原結合ドメインは、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞又は活性化CD8<sup>+</sup>T細胞上の抗原に特異的に結合する、請求項 1 2 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 3】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、アゴニストである、請求項 1 1 8 ~ 1 2 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 4】

前記抗原結合ドメインは、アンタゴニストである、請求項 1 1 8 ~ 1 2 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 5】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、4-1BB、OX40、GITR、CD8a、CD8b、CD4、Nkp30、NKG2A、TIGIT、TGF R1、TGF R2、Fas、NKG2D、Nkp46、PD-L1、CD107a、ICOS、TNFR2、CD16a、又はTCRに特異的に結合する、請求項 1 1 8 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 6】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、PD-1に特異的に結合する、請求項 1 1 8 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 7】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、ヒト又はヒト化抗原結合ドメインである、請求項 1 1 8 ~ 1 2 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 8】

各抗原結合ドメインは、独立してヒト又はヒト化抗原結合ドメインである、請求項 1 2 7 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2 9】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、VHHドメインを含む、請求項 1 1 8 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 3 0】

各抗原結合ドメインは、VHHドメインを含む、請求項 1 2 9 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 3 1】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、VHドメイン及びVLドメインを含む、請求項 1 1 8 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 3 2】

少なくとも1つの抗原結合ドメインは、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、AMP-514、TSR-042、STI-A1110、イピリムマブ、トレメリムマブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、アテゾリズマブ、及びデュルバルマブから選択される抗体のVHドメイン及びVLドメインを含む、請求項 1 3 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 3 3】

前記少なくとも1つの抗原結合ドメインは、一本鎖Fv(scFv)を含む、請求項 1 3 1 又は 1 3 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 3 4】

前記ポリペプチドは、重鎖定常領域を含み、前記VHドメインは、前記重鎖定常領域に融合し、前記VLドメインは、前記VHドメインと結合している、請求項 1 3 1 又は 1 3 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 3 5】

前記VLドメインは、軽鎖定常領域に融合している、請求項 1 3 4 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 136】

前記軽鎖定常領域は、カップ及びラムダから選択される、請求項 135 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 137】

前記抗原結合ドメインは、それぞれ同じである、請求項 118 ~ 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 138】

前記抗原結合ドメインは、それぞれ同じ抗原に特異的に結合する、請求項 118 ~ 137 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 139】

前記抗原結合ドメインの少なくとも 1 つは、他の抗原結合ドメインの少なくとも 1 つとは異なる抗原に特異的に結合する、請求項 118 ~ 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

## 【請求項 140】

少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、PD-1 に特異的に結合し、少なくとも 1 つの他の抗原結合ドメインは、PD-1 以外の T 細胞抗原又はナチュラルキラー細胞抗原に特異的に結合する、請求項 139 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 141】

少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、4-1BB、OX40、GITR、CD8a、CD8b、CD4、NKG2A、TIGIT、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、Fas、NKG2D、NKG2E、PD-L1、CD107a、ICOS、TNFR2、CD16a、DNAM1、又は TCR (V $\alpha$ 9、V $\alpha$ 2、V $\alpha$ 1) に結合する、請求項 118 ~ 140 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

## 【請求項 142】

前記ポリペプチドは、生理学的条件下でホモ二量体を形成する、請求項 93 ~ 141 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 143】

前記修飾 IL-2 は、IL-2R に対するヒト野生型 IL-2 の親和性より少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 50 倍、又は少なくとも 100 倍低い親和性でヒト IL-2R に結合する、請求項 1 ~ 142 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

## 【請求項 144】

第 1 のポリペプチドと第 2 のポリペプチドとを含む複合体であって、前記第 1 のポリペプチドは、請求項 1 ~ 143 のいずれか一項に記載のポリペプチドである、複合体。

## 【請求項 145】

前記第 1 のポリペプチドは、第 1 の Fc 領域を含み、前記第 2 のポリペプチドは、第 2 の Fc 領域を含む、請求項 144 に記載の複合体。

## 【請求項 146】

各 Fc 領域は、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、及び IgG4 から選択されるアイソタイプである、請求項 144 又は 145 に記載の複合体。

40

## 【請求項 147】

各 Fc 領域は、ヒト IgG1 である、請求項 146 に記載の複合体。

## 【請求項 148】

各 Fc 領域は、アミノ酸 E233、L234、及び L235 の欠失を含む、請求項 144 ~ 147 のいずれか一項に記載の複合体。

## 【請求項 149】

各 Fc 領域は、H435R 又は H435K 突然変異を含む、請求項 144 ~ 148 のいずれか一項に記載の複合体。

## 【請求項 150】

50

前記 F c 領域は、突然変異 M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 L 又は突然変異 M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V を含む、請求項 1 5 5 ~ 1 6 0 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 5 1】

前記第 1 の F c 領域又は前記第 2 の F c 領域は、T 3 6 6 W 突然変異を含み、他方の F c 領域は、突然変異 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V を含む、請求項 1 4 4 ~ 1 5 0 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 5 2】

前記第 1 の F c 領域又は前記第 2 の F c 領域は、S 3 5 4 C 突然変異を含む、請求項 1 5 1 に記載の複合体。

【請求項 1 5 3】

各 F c 領域は、独立して配列番号 4 7 ~ 配列番号 8 3、配列番号 2 9 2 及び配列番号 2 9 3 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 4 ~ 1 5 2 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 5 4】

前記第 2 のポリペプチドは、修飾 I L - 2 を含まない、請求項 1 4 4 ~ 1 5 3 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 5 5】

前記第 1 のポリペプチドは、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む、請求項 1 4 4 ~ 1 5 4 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 5 6】

前記第 2 のポリペプチドは、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む、請求項 1 4 4 ~ 1 5 5 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 5 7】

前記第 1 のポリペプチドは、第 1 の抗原結合ドメイン、F c 領域、及び修飾 I L - 2 を含む、請求項 1 4 4 ~ 1 5 6 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 5 8】

前記第 1 の抗原結合ドメインは、前記 F c 領域の N 末端に融合し、前記修飾 I L - 2 は、前記 F c 領域の C 末端に融合する、請求項 1 5 7 に記載の複合体。

【請求項 1 5 9】

前記第 2 のポリペプチドは、第 2 の抗原結合ドメイン及び F c 領域を含む、請求項 1 5 7 又は 1 5 8 に記載の複合体。

【請求項 1 6 0】

前記第 1 の抗原結合ドメイン及び前記第 2 の抗原結合ドメインは、同じか又は異なる、請求項 1 5 9 に記載の複合体。

【請求項 1 6 1】

a) 前記第 1 の抗原結合ドメイン及び前記第 2 の抗原結合ドメインは、どちらも P D - 1 に結合し、

b) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、P D - 1 に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、L A G 3 に結合し、

c) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、P D - 1 に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、C T L A - 4 に結合し、

d) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、P D - 1 に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、4 - 1 B B に結合し、

e) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、P D - 1 に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、O X 4 0 に結合し、

f) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、P D - 1 に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、G I T R に結合し、

g) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、P D - 1 に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、C D 8 a に結合し、

10

20

30

40

50

- h) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、CD8bに結合し、
- i) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、CD4に結合し、
- j) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、NKp30に結合し、
- k) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、NKG2Aに結合し、
- l) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、TIGITに結合し、
- m) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、NKG2Dに結合し、
- n) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、TGFR2に結合し、
- o) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、Fasに結合し、
- p) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、CD107aに結合し、
- q) 前記第1の抗原結合ドメインは、PD-1に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、NKp46に結合し、
- r) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD8aに結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、TGFR2に結合し、
- s) 前記第1の抗原結合ドメインは、CD8aに結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、Fasに結合し、
- t) 前記第1の抗原結合ドメインは、NKG2Dに結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、TGFR2に結合し、
- u) 前記第1の抗原結合ドメインは、NKG2Dに結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、Fasに結合し、
- v) 前記第1の抗原結合ドメインは、NKG2Aに結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、TGFR2に結合し、
- w) 前記第1の抗原結合ドメインは、NKG2Aに結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、Fasに結合し、
- x) 前記第1の抗原結合ドメインは、NKp46に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、TGFR2に結合し、
- y) 前記第1の抗原結合ドメインは、NKp46に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、Fasに結合し、
- z) 前記第1の抗原結合ドメインは、CTLA-4に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、LAG3に結合し、
- aa) 前記第1の抗原結合ドメインは、CTLA-4に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、Tim3に結合し、
- bb) 前記第1の抗原結合ドメインは、CTLA-4に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、OX40に結合し、
- cc) 前記第1の抗原結合ドメインは、CTLA-4に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、GITRに結合し、
- dd) 前記第1の抗原結合ドメインは、CTLA-4に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、CD107aに結合し、
- ee) 前記第1の抗原結合ドメインは、CTLA-4に結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、NKp46に結合し、
- ff) 前記第1の抗原結合ドメインは、ICOSに結合し、かつ前記第2の抗原結合ドメインは、TNFR2に結合し、

10

20

30

40

50

g g) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、N K G 2 D に結合し、  
 h h) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、D N A M 1 に結合し、  
 i i) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、T I G I T に結合し、  
 j j) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、4 - 1 B B に結合し、  
 k k) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、F a s に結合し、  
 l l) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、N K G 2 A に結合し、又は、  
 m m) 前記第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ前記第 2 の抗原結合ドメインは、C D 1 6 a に結合する、請求項 1 6 0 に記載の複合体。

【請求項 1 6 2】

前記修飾 I L - 2 は、I L - 2 R に対するヒト野生型 I L - 2 の親和性より少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 5 0 倍、又は少なくとも 1 0 0 倍低い親和性でヒト I L - 2 R に結合する、請求項 1 4 4 ~ 1 6 1 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 6 3】

請求項 1 ~ 1 5 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の複合体と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 1 6 4】

請求項 1 ~ 1 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の複合体をコードする単離された核酸。

【請求項 1 6 5】

請求項 1 6 4 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 1 6 6】

請求項 1 6 4 に記載の核酸又は請求項 1 6 5 に記載の発現ベクターを含む単離された宿主細胞。

【請求項 1 6 7】

請求項 1 ~ 1 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の複合体を発現する単離された宿主細胞。

【請求項 1 6 8】

請求項 1 ~ 1 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の複合体を生産する方法であって、前記ポリペプチド又は複合体の発現に適した条件下で請求項 1 6 6 又は 1 6 7 に記載の宿主細胞をインキュベートすることを含む、方法。

【請求項 1 6 9】

前記ポリペプチド又は複合体を単離することを更に含む、請求項 1 6 8 に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

C D 4 + T 細胞及び / 又は C D 8 + T 細胞の増殖を増加させる方法であって、T 細胞を請求項 1 ~ 1 5 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の複合体と接触させることを含む、方法。

【請求項 1 7 1】

前記 C D 4 + T 細胞及び / 又は C D 8 + T 細胞は、i n v i t r o で存在する、請求項 1 7 0 に記載の方法。

【請求項 1 7 2】

前記 C D 4 + T 細胞及び / 又は C D 8 + T 細胞は、i n v i v o で存在する、請求項 1 7 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 173】

前記増加は、少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、又は少なくとも 5 倍である、請求項 170 ~ 172 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 174】

NK細胞増殖を増加させる方法であって、NK細胞を請求項 1 ~ 143 のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項 144 ~ 162 のいずれか一項に記載の複合体と接触させることを含む、方法。

## 【請求項 175】

前記増加は、少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、又は少なくとも 5 倍である、請求項 174 に記載の方法。

## 【請求項 176】

癌を治療する方法であって、癌を伴う被験体に請求項 1 ~ 143 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 144 ~ 162 のいずれか一項に記載の複合体、又は請求項 163 に記載の医薬組成物を薬学的有効量、投与することを含む、方法。

## 【請求項 177】

前記癌は、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、胃腸癌、膠芽腫、肝癌、肝細胞癌、上皮内新生物、腎臓癌又は腎癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃部癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮又は子宮内膜癌、泌尿器系癌、外陰癌、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球(SL)NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非分割細胞NHL、巨大病変NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、慢性リンパ球性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、有毛細胞白血病、並びに慢性骨髄芽球性白血病から選択される、請求項 176 に記載の方法。

## 【請求項 178】

追加の療法剤を投与することを更に含む、請求項 176 又は 177 に記載の方法。

## 【請求項 179】

前記追加の療法剤は、抗癌剤である、請求項 178 に記載の方法。

## 【請求項 180】

前記抗癌剤は、化学療法剤、抗癌生物製剤、放射線療法薬、CAR-T療法薬、及び腫瘍溶解性ウイルスから選択される、請求項 179 に記載の方法。

## 【請求項 181】

前記追加の療法剤は、抗癌生物製剤である、請求項 179 又は 180 に記載の方法。

## 【請求項 182】

前記抗癌生物製剤は、PD-1及び/又はPD-L1を阻害する作用物質である、請求項 181 に記載の方法。

## 【請求項 183】

前記抗癌生物製剤は、VISTA、gpNMB、B7H3、B7H4、HHLA2、CTLA4、又はTIGITを阻害する作用物質である、請求項 181 に記載の方法。

## 【請求項 184】

前記抗癌剤は、抗体である、請求項 179 ~ 183 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 185】

前記抗癌生物製剤は、サイトカインである、請求項 181 に記載の方法。

## 【請求項 186】

前記抗癌剤は、CAR-T療法薬である、請求項 179 に記載の方法。

## 【請求項 187】

10

20

30

40

50

前記抗癌剤は、腫瘍溶解性ウイルスである、請求項 179 に記載の方法。

【請求項 188】

腫瘍切除及び / 又は放射線療法を更に含む、請求項 176 ~ 187 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[ 関連出願の相互参照 ]

本願は、2020年7月2日付で出願された米国仮出願第63/047,681号の優先権の利益を主張し、その全体があらゆる目的で引用することにより本明細書の一部をなす。

10

【0002】

本発明は、CD25及びCD122に対する親和性が低下した修飾IL-2、並びに標的化部分に融合された、かかる修飾IL-2に関する。本発明は、限定されるものではないが、癌を治療する方法を含む、修飾IL-2及び修飾IL-2を含むポリペプチドを使用する方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

IL-2は、CD25、CD122及びCD132から構成されるヘテロ三量体IL-2受容体(IL-2R)、又はCD122及びCD132のみから構成されるヘテロ二量体IL-2受容体のいずれかを介してT細胞及びNK細胞の増殖を刺激する強力なサイトカインである。どちらの形態のIL-2RもT細胞の生存、増殖、及び全体的な活性化状態の強力なメディエーターである。IL-2は概して、T細胞及びNK細胞によって活性化後に産生され、局所微小環境におけるシス及びトランスのシグナル伝達を媒介する。IL-2Rシグナル伝達は、エフェクターT細胞及び記憶T細胞へのナイーブT細胞の分化を誘導することができ、抑制性制御性T細胞を刺激することもできる。三量体形態のIL-2Rは、IL-2に対して二量体形態よりも高い親和性を有するが、どちらも適度に高い親和性であり、急速な受容体媒介性の内在化及び分解を引き起こし、極めて短い半減期をもたらす。組換えヒトIL-2(rhIL-2、プロロイキン)が腎細胞癌及び悪性黒色腫の治療に臨床的に使用されているが、強い毒性を伴う。高親和性IL-2Rを発現する内皮細胞に対するIL-2シグナル伝達の影響により、血管漏出症候群がプロロイキンで治療された癌患者にとって主な毒性の問題となっている。

20

30

【0004】

T細胞は、TCR複合体のクラスター形成及びNFATを介したシグナル伝達を引き起こす、それらのTCRと相補性ペプチドが結合したMHCを提示する隣接細胞とのライゲーションによって活性化される。CD28を介したT細胞の共刺激がCD80及びCD86によって引き起こされ、これによりT細胞活性化が増強される。初期活性化後に、T細胞はサイトカイン受容体、並びにT細胞応答を調節する働きをする多くの共刺激受容体及びチェックポイント受容体を含む様々なタンパク質を上方調節する。

【0005】

持続的な抗腫瘍臨床応答が近年、CTLA-4、PD-1、及びPD-L1等のチェックポイント受容体に対するアンタゴニスト抗体について報告されている。しかしながら、最も応答性が高い適応症であっても、奏効率は患者の約30%に限られる。したがって、改善されたT細胞調節療法薬が必要とされている。

40

【発明の概要】

【0006】

本明細書では、少なくとも1つのアミノ酸位置に少なくとも1つの置換を含む修飾IL-2を含むポリペプチドが提供される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、野生型IL-2と比べてCD25、CD122、及び / 又はIL-2Rに対する結合親和性が低下している。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、野生型IL-2と比

50

べて休止 T 細胞又は活性化 T 細胞に対する活性が低下している。

【 0 0 0 7 】

本明細書では、以下の実施形態が提供される。

【 0 0 0 8 】

実施形態 1 . 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドであって、修飾 I L - 2 は、D 8 4 Y 置換を含む、ポリペプチド。

【 0 0 0 9 】

実施形態 2 . 修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 2 2 に対する親和性が低下している、実施形態 1 のポリペプチド。

【 0 0 1 0 】

実施形態 3 . 修飾 I L - 2 は、H 1 6、L 1 9、M 2 3、N 8 8、及び E 9 5 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 1 又は 2 のポリペプチド。

【 0 0 1 1 】

実施形態 4 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 H 1 6 に置換を含む、実施形態 3 のポリペプチド。

【 0 0 1 2 】

実施形態 5 . 置換は、H 1 6 A、H 1 6 N、H 1 6 V、及び H 1 6 T から選択される、実施形態 4 のポリペプチド。

【 0 0 1 3 】

実施形態 6 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 L 1 9 に置換を含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 1 4 】

実施形態 7 . 置換は、L 1 9 A、L 1 9 P、L 1 9 Q、L 1 9 Y、L 1 9 N、L 1 9 S、L 1 9 T、L 1 9 V から選択される、実施形態 6 のポリペプチド。

【 0 0 1 5 】

実施形態 8 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 M 2 3 に置換を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 1 6 】

実施形態 9 . 置換は、M 2 3 A、M 2 3 G、M 2 3 S、M 2 3 T、M 2 3 V、M 2 3 D、M 2 3 E、M 2 3 I、M 2 3 K、M 2 3 L、M 2 3 N、M 2 3 Q、M 2 3 R、及び M 2 3 Y から選択される、実施形態 8 のポリペプチド。

【 0 0 1 7 】

実施形態 1 0 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 N 8 8 に置換を含む、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 1 8 】

実施形態 1 1 . 置換は、N 8 8 T、N 8 8 A、及び N 8 8 S から選択される、実施形態 1 0 のポリペプチド。

【 0 0 1 9 】

実施形態 1 2 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 E 9 5 に置換を含む、実施形態 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 2 0 】

実施形態 1 3 . 置換は、E 9 5 Q、E 9 5 G、E 9 5 T、E 9 5 V、E 9 5 P、E 9 5 H、E 9 5 N、及び E 9 5 Y から選択される、実施形態 1 2 のポリペプチド。

【 0 0 2 1 】

実施形態 1 4 . 修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 3 2 に対する親和性を低下させる少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 1 ~ 1 3 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 2 2 】

実施形態 1 5 . 修飾 I L - 2 は、Q 2 2、R 1 2 0、T 1 2 3、Q 1 2 6、S 1 2 7、

10

20

30

40

50

I 1 2 9、及び S 1 3 0 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 2 3 】

実施形態 1 6 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 Q 2 2 に置換を含む、実施形態 1 5 のポリペプチド。

【 0 0 2 4 】

実施形態 1 7 . 置換は、Q 2 2 A、Q 2 2 D、Q 2 2 G、Q 2 2 H、Q 2 2 K、Q 2 2 N、Q 2 2 R、Q 2 2 S、Q 2 2 T、Q 2 2 V、及び Q 2 2 Y から選択される、実施形態 1 6 のポリペプチド。

【 0 0 2 5 】

実施形態 1 8 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 R 1 2 0 に置換を含む、実施形態 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 2 6 】

実施形態 1 9 . 置換は、R 1 2 0 A、R 1 2 0 D、R 1 2 0 E、R 1 2 0 F、R 1 2 0 G、R 1 2 0 H、R 1 2 0 K、R 1 2 0 N、R 1 2 0 Q、R 1 2 0 S、R 1 2 0 V、及び R 1 2 0 Y から選択される、実施形態 1 8 のポリペプチド。

【 0 0 2 7 】

実施形態 2 0 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 T 1 2 3 に置換を含む、実施形態 1 5 ~ 1 9 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 2 8 】

実施形態 2 1 . 置換は、T 1 2 3 D、T 1 2 3 E、T 1 2 3 H、T 1 2 3 K、T 1 2 3 N、T 1 2 3 Q、及び T 1 2 3 R から選択される、実施形態 2 0 のポリペプチド。

【 0 0 2 9 】

実施形態 2 2 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 Q 1 2 6 に置換を含む、実施形態 1 5 ~ 2 1 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 3 0 】

実施形態 2 3 . 置換は、Q 1 2 6 N、Q 1 2 6 A、及び Q 1 2 6 Y から選択される、実施形態 2 2 のポリペプチド。

【 0 0 3 1 】

実施形態 2 4 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 2 7 に置換を含む、実施形態 1 5 ~ 2 3 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 3 2 】

実施形態 2 5 . 置換は、S 1 2 7 D、S 1 2 7 E、S 1 2 7 H、S 1 2 7 K、S 1 2 7 N、S 1 2 7 P、及び S 1 2 7 R から選択される、実施形態 2 4 のポリペプチド。

【 0 0 3 3 】

実施形態 2 6 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 I 1 2 9 に置換を含む、実施形態 1 5 ~ 2 5 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 3 4 】

実施形態 2 7 . 置換は、I 1 2 9 A、I 1 2 9 H、I 1 2 9 R、及び I 1 2 9 S から選択される、実施形態 2 6 のポリペプチド。

【 0 0 3 5 】

実施形態 2 8 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 3 0 に置換を含む、実施形態 1 5 ~ 2 7 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 3 6 】

実施形態 2 9 . 置換は、S 1 3 0 E、S 1 3 0 K、S 1 3 0 N、S 1 3 0 P、S 1 3 0 Q、及び S 1 3 0 R から選択される、実施形態 2 8 のポリペプチド。

【 0 0 3 7 】

実施形態 3 0 . 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドであって、修飾 I L - 2 は、Q 2 2、R 1 2 0、T 1 2 3、S 1 2 7、及び S 1 3 0 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、ポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 8 】

実施形態 3 1 . 修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 3 2 に対する親和性が低下している、実施形態 3 0 のポリペプチド。

## 【 0 0 3 9 】

実施形態 3 2 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 Q 2 2 に置換を含む、実施形態 3 0 又は 3 1 のポリペプチド。

## 【 0 0 4 0 】

実施形態 3 3 . 置換は、Q 2 2 A、Q 2 2 D、Q 2 2 E、Q 2 2 G、Q 2 2 H、Q 2 2 K、Q 2 2 N、Q 2 2 P、Q 2 2 R、Q 2 2 S、Q 2 2 T、Q 2 2 V、及び Q 2 2 Y から選択される、実施形態 3 2 のポリペプチド。

10

## 【 0 0 4 1 】

実施形態 3 4 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 R 1 2 0 に置換を含む、実施形態 3 0 ~ 3 3 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 0 4 2 】

実施形態 3 5 . 置換は、R 1 2 0 A、R 1 2 0 D、R 1 2 0 E、R 1 2 0 F、R 1 2 0 G、R 1 2 0 H、R 1 2 0 K、R 1 2 0 N、R 1 2 0 P、R 1 2 0 Q、R 1 2 0 S、R 1 2 0 V、及び R 1 2 0 Y から選択される、実施形態 3 4 のポリペプチド。

## 【 0 0 4 3 】

実施形態 3 6 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 T 1 2 3 に置換を含む、実施形態 3 0 ~ 3 5 のポリペプチド。

20

## 【 0 0 4 4 】

実施形態 3 7 . 置換は、T 1 2 3 D、T 1 2 3 E、T 1 2 3 H、T 1 2 3 K、T 1 2 3 N、T 1 2 3 Q、及び T 1 2 3 R から選択される、実施形態 3 6 のポリペプチド。

## 【 0 0 4 5 】

実施形態 3 8 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 2 7 に置換を含む、実施形態 3 0 ~ 3 7 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 0 4 6 】

実施形態 3 9 . 置換は、S 1 2 7 D、S 1 2 7 E、S 1 2 7 H、S 1 2 7 K、S 1 2 7 N、S 1 2 7 P、S 1 2 7 Q、及び S 1 2 7 R から選択される、実施形態 3 8 のポリペプチド。

30

## 【 0 0 4 7 】

実施形態 4 0 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 S 1 3 0 に置換を含む、実施形態 3 0 ~ 3 9 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 0 4 8 】

実施形態 4 1 . 置換は、S 1 3 0 D、S 1 3 0 E、S 1 3 0 H、S 1 3 0 K、S 1 3 0 N、S 1 3 0 P、S 1 3 0 Q、及び S 1 3 0 R から選択される、実施形態 4 0 のポリペプチド。

## 【 0 0 4 9 】

実施形態 4 2 . 修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 1 2 2 に対する親和性を低下させる少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 3 0 ~ 4 1 のいずれか 1 つのポリペプチド。

40

## 【 0 0 5 0 】

実施形態 4 3 . 修飾 I L - 2 は、H 1 6、L 1 9、M 2 3、D 8 4、N 8 8、及び E 9 5 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 4 2 のポリペプチド。

## 【 0 0 5 1 】

実施形態 4 4 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 H 1 6 に置換を含む、実施形態 4 3 のポリペプチド。

## 【 0 0 5 2 】

実施形態 4 5 . 置換は、H 1 6 A、H 1 6 T、H 1 6 V、及び H 1 6 N から選択される

50

、実施形態 44 のポリペプチド。

【0053】

実施形態 46 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 L 19 に置換を含む、実施形態 43 ~ 45 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【0054】

実施形態 47 . 置換は、L 19 A、L 19 P、L 19 Q、L 19 Y、L 19 N、L 19 S、L 19 T、L 19 V から選択される、実施形態 46 のポリペプチド。

【0055】

実施形態 48 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 M 23 に置換を含む、実施形態 43 ~ 47 のいずれか 1 つのポリペプチド。

10

【0056】

実施形態 49 . 置換は、M 23 A、M 23 G、M 23 S、M 23 T、M 23 V、M 23 D、M 23 E、M 23 I、M 23 K、M 23 L、M 23 N、M 23 Q、M 23 R、及び M 23 Y から選択される、実施形態 48 のポリペプチド。

【0057】

実施形態 50 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 D 84 に置換を含む、実施形態 43 ~ 49 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【0058】

実施形態 51 . 置換は、D 84 S、D 84 G、D 84 A、D 84 T、D 84 V、D 84 Y、及び D 84 N から選択される、実施形態 50 のポリペプチド。

20

【0059】

実施形態 52 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 N 88 に置換を含む、実施形態 43 ~ 51 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【0060】

実施形態 53 . 置換は、N 88 T、N 88 A、及び N 88 S から選択される、実施形態 52 のポリペプチド。

【0061】

実施形態 54 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 E 95 に置換を含む、実施形態 43 ~ 53 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【0062】

実施形態 55 . 置換は、E 95 Q、E 95 G、E 95 T、E 95 V、E 95 P、E 95 H、E 95 N、及び E 95 Y から選択される、実施形態 54 のポリペプチド。

30

【0063】

実施形態 56 . 修飾 I L - 2 は、野生型 I L - 2 と比較して C D 25 に対する親和性を低下させる少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 1 ~ 55 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【0064】

実施形態 57 . 修飾 I L - 2 は、K 43、Y 45、E 61、I 114、P 65、F 42、R 38、及び L 72 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含み、及び / 又は修飾 I L - 2 は、アミノ酸 F 42 の欠失を含む、実施形態 1 ~ 56 のいずれか 1 つのポリペプチド。

40

【0065】

実施形態 58 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸 F 42 に置換を含むか、又はアミノ酸 F 42 の欠失を含む、実施形態 57 のポリペプチド。

【0066】

実施形態 59 . 修飾 I L - 2 は、F 42 K、F 42 A、F 42 R、F 42 G、F 42 S、及び F 42 T から選択されるアミノ酸位置 F 42 の置換を含む、実施形態 58 のポリペプチド。

【0067】

実施形態 60 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸 F 42 の欠失を含む、実施形態 58 のポリペ

50

プチド。

【0068】

実施形態61．修飾IL-2は、アミノ酸位置K43に置換を含む、実施形態57～60のいずれか1つのポリペプチド。

【0069】

実施形態62．置換は、K43E及びK43Dから選択される、実施形態61のポリペプチド。

【0070】

実施形態63．修飾IL-2は、アミノ酸位置Y45に置換を含む、実施形態57～62のいずれか1つのポリペプチド。

10

【0071】

実施形態64．置換は、Y45R及びY45Kから選択される、実施形態63のポリペプチド。

【0072】

実施形態65．修飾IL-2は、アミノ酸位置E61に置換を含む、実施形態57～64のいずれか1つのポリペプチド。

【0073】

実施形態66．置換は、E61R、E61G、E61H、E61N、E61P、E61S、E61T、E61Y、E61A、E61Q、及びE61Kから選択される、実施形態65のポリペプチド。

20

【0074】

実施形態67．修飾IL-2は、アミノ酸位置I114に置換を含む、実施形態57～66のいずれか1つのポリペプチド。

【0075】

実施形態68．置換は、I114F、I114Y、又はI114Wである、実施形態67のポリペプチド。

【0076】

実施形態69．修飾IL-2は、アミノ酸位置P65に置換を含む、実施形態57～68のいずれか1つのポリペプチド。

【0077】

実施形態70．置換は、P65R、P65E、P65K、P65H、P65Y、P65Q、P65D、及びP65Nから選択される、実施形態69のポリペプチド。

30

【0078】

実施形態71．修飾IL-2は、アミノ酸位置R38に置換を含む、実施形態57～70のいずれか1つのポリペプチド。

【0079】

実施形態72．R38での置換は、R38A及びR38Gから選択される、実施形態71のポリペプチド。

【0080】

実施形態73．修飾IL-2は、アミノ酸位置L72に置換を含む、実施形態57～72のいずれか1つのポリペプチド。

40

【0081】

実施形態74．L72での置換は、L72Gである、実施形態73のポリペプチド。

【0082】

実施形態75．修飾IL-2は、置換Q22A、又は置換R120A、又は置換Q22A及びR120Aを含む、実施形態1～74のいずれか1つのポリペプチド。

【0083】

実施形態76．修飾IL-2は、置換P65R及びR38A又は置換P65R及びE61Rを含む、実施形態1～75のいずれか1つのポリペプチド。

【0084】

50

実施形態 77 . 修飾 I L - 2 は、H 1 6 A、L 1 9 A、L 1 9 N、M 2 3 A、D 8 4 S 又は D 8 4 Y、N 8 8 S、及び E 9 5 Q から選択される少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 1 ~ 7 6 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 8 5 】

実施形態 78 . 修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 P 6 5、H 1 6、及び D 8 4 に置換を含む、実施形態 1 ~ 7 7 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 8 6 】

実施形態 79 . 修飾 I L - 2 は、置換 P 6 5 R、H 1 6 A、及び D 8 4 S、又は置換 P 6 5 R、H 1 6 A、及び D 8 4 Y を含む、実施形態 7 8 のポリペプチド。

【 0 0 8 7 】

実施形態 80 . 修飾 I L - 2 は、T 3 及び C 1 2 5 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含み、及び / 又は I L - 2 の最初の 5 つのアミノ酸の欠失を含む、実施形態 1 ~ 7 9 のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 8 8 】

実施形態 81 . 修飾 I L - 2 は、T 3 A、C 1 2 5 A、C 1 2 5 V、及び C 1 2 5 S から選択される少なくとも 1 つの置換を含む、実施形態 8 0 のポリペプチド。

【 0 0 8 9 】

実施形態 82 . 修飾 I L - 2 は、T 3 A 及び C 1 2 5 S 置換、又は T 3 A 及び C 1 2 5 V 置換を含む、実施形態 8 1 のポリペプチド。

【 0 0 9 0 】

実施形態 83 . 修飾 I L - 2 は、I L - 2 の最初の 5 つのアミノ酸の欠失と、C 1 2 5 S 置換又は C 1 2 5 V 置換とを含む、実施形態 8 1 のポリペプチド。

【 0 0 9 1 】

実施形態 84 . 修飾 I L - 2 は、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、及び ( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D ) から選択される一連の置換を含む、上記の実施形態のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 9 2 】

実施形態 85 . 修飾 I L - 2 を含む修飾ポリペプチドであって、修飾 I L - 2 は、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S )、( T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、( T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D )、及び ( T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、S 1 2 7 D ) から選択される一連の置換を含む、修飾ポリペプチド。

【 0 0 9 3 】

実施形態 86 . 修飾 I L - 2 は、指定の置換を含み、任意の付加的な置換を含まない、上記の実施形態のいずれか 1 つのポリペプチド。

【 0 0 9 4 】

実施形態 87 . 修飾 I L - 2 は、修飾ヒト I L - 2 である、上記の実施形態のいずれか

10

20

30

40

50

1つのポリペプチド。

【0095】

実施形態88．アミノ酸位置は、配列番号1中のアミノ酸位置に対応する、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチド。

【0096】

実施形態89．修飾IL-2は、配列番号84と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列を含み、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列の対応する置換を含む、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチド。

【0097】

実施形態90．修飾IL-2は、配列番号270～配列番号277から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含み、置換D84Yを含む、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチド。

【0098】

実施形態91．修飾IL-2は、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列を含む、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチド。

【0099】

実施形態92．修飾IL-2は、配列番号270～配列番号277から選択されるアミノ酸配列を含む、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチド。

【0100】

実施形態93．ポリペプチドは、Fc領域を含む、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチド。

【0101】

実施形態94．修飾IL-2は、Fc領域のN末端又はC末端に融合している、実施形態93のポリペプチド。

【0102】

実施形態95．Fc領域は、Kabataアミノ酸位置T366に置換を含む、実施形態93又は94のポリペプチド。

【0103】

実施形態96．Fc領域は、T366W置換を含む、実施形態95のポリペプチド。

【0104】

実施形態97．Fc領域は、T366、L368、及びY407から選択される少なくとも1つのKabataアミノ酸位置に少なくとも1つの置換を含む、実施形態93又は94のポリペプチド。

【0105】

実施形態98．Fc領域は、T366S、L368A、及びY407V突然変異を含む、実施形態108のポリペプチド。

【0106】

実施形態99．Fc領域は、S354及びY349から選択されるKabata位置に置換を含む、請求93～98のいずれか1つのポリペプチド。

【0107】

実施形態100．Fc領域は、S354C又はY349C置換を含む、実施形態99のポリペプチド。

【0108】

実施形態101．Fc領域は、Kabataアミノ酸位置H435に置換を含む、実施形態93～100のいずれか1つのポリペプチド。

【0109】

実施形態102．Fc領域は、H435R及びH435Kから選択される置換を含む、実施形態101のポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【0110】

実施形態103．Fc領域は、M252及びM428から選択される少なくとも1つのKabatアミノ酸位置に少なくとも1つの置換を含む、実施形態93～102のいずれか1つのポリペプチド。

## 【0111】

実施形態104．Fc領域は、M252Y及びM428V置換を含む、実施形態103のポリペプチド。

## 【0112】

実施形態105．Fc領域は、Kabatアミノ酸E233、L234、及びL235の欠失を含む、実施形態93～104のいずれか1つのポリペプチド。

10

## 【0113】

実施形態106．Fc領域は、L234、L235、及びP329から選択される少なくとも1つのアミノ酸位置に少なくとも1つの置換を含む、実施形態93～104のいずれか1つのポリペプチド。

## 【0114】

実施形態107．Fc領域は、L234A、L235A、及びP329G置換を含む、実施形態106のポリペプチド。

## 【0115】

実施形態108．Fc領域は、配列番号47～配列番号83、配列番号292及び配列番号293から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含む、実施形態93～107のいずれか1つのポリペプチド。

20

## 【0116】

実施形態109．Fc領域は、重鎖定常領域の一部である、実施形態93～108のいずれか1つのポリペプチド。

## 【0117】

実施形態110．重鎖定常領域は、IgG定常領域である、実施形態109のポリペプチド。

## 【0118】

実施形態111．重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4定常領域である、実施形態110のポリペプチド。

30

## 【0119】

実施形態112．修飾IL-2は、Fc領域又は重鎖定常領域のC末端に融合している、実施形態93～111のいずれか1つのポリペプチド。

## 【0120】

実施形態113．修飾IL-2は、1個～20個のアミノ酸を含むリンカーによってFc領域又は重鎖定常領域のC末端に融合している、実施形態112のポリペプチド。

## 【0121】

実施形態114．リンカーは、グリシンアミノ酸を含む、実施形態113のポリペプチド。

40

## 【0122】

実施形態115．リンカーは、グリシン及びセリンアミノ酸を含む、実施形態114のポリペプチド。

## 【0123】

実施形態116．リンカー中のアミノ酸の大部分又は全てがグリシン及びセリンである、実施形態113～115のいずれか1つのポリペプチド。

## 【0124】

実施形態117．ポリペプチドは、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と、配列番号48、配列番号64、配列番号292、及び配列番号293から選択されるアミノ酸配列とを含む、実施形態93～116のいずれか1つのポリペプチド

50

。

## 【 0 1 2 5 】

実施形態 1 1 8 . ポリペプチドは、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む、上記の実施形態のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 1 2 6 】

実施形態 1 1 9 . ポリペプチドは、2 つ、3 つ、又は 4 つの抗原結合ドメインを含む、実施形態 1 1 8 のポリペプチド。

## 【 0 1 2 7 】

実施形態 1 2 0 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、T 細胞抗原又はナチュラルキラー細胞抗原に特異的に結合する、実施形態 1 1 8 又は 1 1 9 のポリペプチド。

10

## 【 0 1 2 8 】

実施形態 1 2 1 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、CD 4 + T 細胞抗原又は CD 8 + T 細胞抗原に特異的に結合する、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 1 2 9 】

実施形態 1 2 2 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、活性化 CD 4 + T 細胞又は活性化 CD 8 + T 細胞上の抗原に特異的に結合する、実施形態 1 2 1 のポリペプチド。

## 【 0 1 3 0 】

実施形態 1 2 3 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、アゴニストである、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 2 のいずれか 1 つのポリペプチド。

20

## 【 0 1 3 1 】

実施形態 1 2 4 . 抗原結合ドメインは、アンタゴニストである、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 2 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 1 3 2 】

実施形態 1 2 5 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、PD - 1、CTLA - 4、LAG 3、TIM 3、4 - 1 BB、OX 4 0、GITR、CD 8 a、CD 8 b、CD 4、NK p 3 0、NKG 2 A、TIGIT、TGFR 1、TGFR 2、Fas、NKG 2 D、NK p 4 6、PD - L 1、CD 1 0 7 a、ICOS、TNFR 2、CD 1 6 a、又は TCR に特異的に結合する、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 4 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 1 3 3 】

実施形態 1 2 6 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、PD - 1 に特異的に結合する、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 4 のいずれか 1 つのポリペプチド。

30

## 【 0 1 3 4 】

実施形態 1 2 7 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、ヒト又はヒト化抗原結合ドメインである、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 6 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 1 3 5 】

実施形態 1 2 8 . 各抗原結合ドメインは、独立してヒト又はヒト化抗原結合ドメインである、実施形態 1 2 7 のポリペプチド。

## 【 0 1 3 6 】

実施形態 1 2 9 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、VHHドメインを含む、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 8 のいずれか 1 つのポリペプチド。

40

## 【 0 1 3 7 】

実施形態 1 3 0 . 各抗原結合ドメインは、VHHドメインを含む、実施形態 1 2 9 のポリペプチド。

## 【 0 1 3 8 】

実施形態 1 3 1 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、VHドメイン及びVLドメインを含む、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 8 のいずれか 1 つのポリペプチド。

## 【 0 1 3 9 】

実施形態 1 3 2 . 少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、AMP - 5 1 4、TSR - 0 4 2、STI - A 1 1 1 0、イピリムマブ、トレメリム

50

マブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、アテゾリズマブ、及びデュルバルマブから選択される抗体のVHドメイン及びVLドメインを含む、実施形態131のポリペプチド。

【0140】

実施形態133．少なくとも1つの抗原結合ドメインは、一本鎖Fv(s c F v)を含む、実施形態131又は132のポリペプチド。

【0141】

実施形態134．ポリペプチドは、重鎖定常領域を含み、VHドメインは、重鎖定常領域に融合し、VLドメインは、VHドメインと結合している、実施形態131又は132のポリペプチド。

【0142】

実施形態135．VLドメインは、軽鎖定常領域に融合している、実施形態134のポリペプチド。

【0143】

実施形態136．軽鎖定常領域は、カッパ及びラムダから選択される、実施形態135のポリペプチド。

【0144】

実施形態137．抗原結合ドメインは、それぞれ同じである、実施形態118～136のいずれか1つのポリペプチド。

【0145】

実施形態138．抗原結合ドメインは、それぞれ同じ抗原に特異的に結合する、実施形態118～137のポリペプチド。

【0146】

実施形態139．抗原結合ドメインの少なくとも1つは、他の抗原結合ドメインの少なくとも1つとは異なる抗原に特異的に結合する、実施形態118～136のポリペプチド。

【0147】

実施形態140．少なくとも1つの抗原結合ドメインは、PD-1に特異的に結合し、少なくとも1つの他の抗原結合ドメインは、PD-1以外のT細胞抗原又はナチュラルキラー細胞抗原に特異的に結合する、実施形態139のポリペプチド。

【0148】

実施形態141．少なくとも1つの抗原結合ドメインは、PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、4-1BB、OX40、GITR、CD8a、CD8b、CD4、NKp30、NKG2A、TIGIT、TGF R1、TGF R2、Fas、NKG2D、NKp46、PD-L1、CD107a、ICOS、TNFR2、CD16a、DNAM1、又はTCR(V9、V2、V1)に結合する、実施形態118～140のいずれか1つのポリペプチド。

【0149】

実施形態142．ポリペプチドは、生理学的条件下でホモ二量体を形成する、実施形態93～141のいずれか1つのポリペプチド。

【0150】

実施形態143．修飾IL-2は、IL-2Rに対するヒト野生型IL-2の親和性より少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも50倍、又は少なくとも100倍低い親和性でヒトIL-2Rに結合する、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチド。

【0151】

実施形態144．第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを含む複合体であって、第1のポリペプチドは、上記の実施形態のいずれか1つのポリペプチドである、複合体。

【0152】

実施形態145．第1のポリペプチドは、第1のFc領域を含み、第2のポリペプチドは、第2のFc領域を含む、実施形態144の複合体。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 3 】

実施形態 1 4 6 . 各 F c 領域は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 から選択されるアイソタイプである、実施形態 1 4 4 又は 1 4 5 の複合体。

## 【 0 1 5 4 】

実施形態 1 4 7 . 各 F c 領域は、ヒト I g G 1 である、実施形態 1 4 6 の複合体。

## 【 0 1 5 5 】

実施形態 1 4 8 . 各 F c 領域は、アミノ酸 E 2 3 3、L 2 3 4、及び L 2 3 5 の欠失を含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 4 7 のいずれか 1 つの複合体。

## 【 0 1 5 6 】

実施形態 1 4 9 . 各 F c 領域は、H 4 3 5 R 又は H 4 3 5 K 突然変異を含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 4 8 のいずれか 1 つの複合体。 10

## 【 0 1 5 7 】

実施形態 1 5 0 . F c 領域は、突然変異 M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 L 又は突然変異 M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V を含む、実施形態 1 5 5 ~ 1 6 0 のいずれか 1 つの複合体。

## 【 0 1 5 8 】

実施形態 1 5 1 . 第 1 の F c 領域又は第 2 の F c 領域は、T 3 6 6 W 突然変異を含み、他方の F c 領域は、突然変異 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V を含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 5 0 のいずれか 1 つの複合体。

## 【 0 1 5 9 】

実施形態 1 5 2 . 第 1 の F c 領域又は第 2 の F c 領域は、S 3 5 4 C 突然変異を含む、実施形態 1 5 1 の複合体。 20

## 【 0 1 6 0 】

実施形態 1 5 3 . 各 F c 領域は、独立して配列番号 4 7 ~ 配列番号 8 3、配列番号 2 9 2 及び配列番号 2 9 3 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 5 2 のいずれか 1 つの複合体。

## 【 0 1 6 1 】

実施形態 1 5 4 . 第 2 のポリペプチドは、修飾 I L - 2 を含まない、実施形態 1 4 4 ~ 1 5 3 のいずれか 1 つの複合体。

## 【 0 1 6 2 】

実施形態 1 5 5 . 第 1 のポリペプチドは、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 5 4 のいずれか 1 つの複合体。 30

## 【 0 1 6 3 】

実施形態 1 5 6 . 第 2 のポリペプチドは、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 5 5 のいずれか 1 つの複合体。

## 【 0 1 6 4 】

実施形態 1 5 7 . 第 1 のポリペプチドは、第 1 の抗原結合ドメイン、F c 領域、及び修飾 I L - 2 を含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 5 6 のいずれか 1 つの複合体。

## 【 0 1 6 5 】

実施形態 1 5 8 . 第 1 の抗原結合ドメインは、F c 領域の N 末端に融合し、修飾 I L - 2 は、F c 領域の C 末端に融合する、実施形態 1 5 7 の複合体。 40

## 【 0 1 6 6 】

実施形態 1 5 9 . 第 2 のポリペプチドは、第 2 の抗原結合ドメイン及び F c 領域を含む、実施形態 1 5 7 又は 1 5 8 の複合体。

## 【 0 1 6 7 】

実施形態 1 6 0 . 第 1 の抗原結合ドメイン及び第 2 の抗原結合ドメインは、同じか又は異なる、実施形態 1 5 9 の複合体。

## 【 0 1 6 8 】

実施形態 1 6 1 .

a . 第 1 の抗原結合ドメイン及び第 2 の抗原結合ドメインは、どちらも P D - 1 に結合 50



- は、L A G 3 に結合し、
- a a . 第 1 の抗原結合ドメインは、C T L A - 4 に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、T i m 3 に結合し、
- b b . 第 1 の抗原結合ドメインは、C T L A - 4 に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、O X 4 0 に結合し、
- c c . 第 1 の抗原結合ドメインは、C T L A - 4 に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、G I T R に結合し、
- d d . 第 1 の抗原結合ドメインは、C T L A - 4 に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、C D 1 0 7 a に結合し、
- e e . 第 1 の抗原結合ドメインは、C T L A - 4 に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、N K p 4 6 に結合し、 10
- f f . 第 1 の抗原結合ドメインは、I C O S に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、T N F R 2 に結合し、
- g g . 第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、N K G 2 D に結合し、
- h h . 第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、D N A M 1 に結合し、
- i i . 第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、T I G I T に結合し、
- j j . 第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、4 - 1 B B に結合し、 20
- k k . 第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、F a s に結合し、
- l l . 第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、N K G 2 A に結合し、又は、
- m m . 第 1 の抗原結合ドメインは、T C R に結合し、かつ第 2 の抗原結合ドメインは、C D 1 6 a に結合する、実施形態 1 6 0 の複合体。
- 【 0 1 6 9 】
- 実施形態 1 6 2 . 修飾 I L - 2 は、I L - 2 R に対するヒト野生型 I L - 2 の親和性より少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 5 0 倍、又は少なくとも 1 0 0 倍低い親和性でヒト I L - 2 R に結合する、実施形態 1 4 4 ~ 1 6 1 のいずれか 1 つの複合体。 30
- 【 0 1 7 0 】
- 実施形態 1 6 3 . 実施形態 1 ~ 1 5 4 のいずれか 1 つのポリペプチド又は実施形態 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか 1 つの複合体と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。
- 【 0 1 7 1 】
- 実施形態 1 6 4 . 実施形態 1 ~ 1 4 3 のいずれか 1 つのポリペプチド又は実施形態 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか 1 つの複合体をコードする単離された核酸。
- 【 0 1 7 2 】
- 実施形態 1 6 5 . 実施形態 1 6 4 の核酸を含む発現ベクター。 40
- 【 0 1 7 3 】
- 実施形態 1 6 6 . 実施形態 1 6 4 の核酸又は実施形態 1 6 5 の発現ベクターを含む単離された宿主細胞。
- 【 0 1 7 4 】
- 実施形態 1 6 7 . 実施形態 1 ~ 1 4 3 のいずれか 1 つのポリペプチド又は実施形態 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか 1 つの複合体を発現する単離された宿主細胞。
- 【 0 1 7 5 】
- 実施形態 1 6 8 . 実施形態 1 ~ 1 4 3 のいずれか 1 つのポリペプチド又は実施形態 1 4 4 ~ 1 6 2 のいずれか 1 つの複合体を生産する方法であって、ポリペプチド又は複合体の発現に適した条件下で実施形態 1 6 6 又は 1 6 7 の宿主細胞をインキュベートすることを 50

含む、方法。

【0176】

実施形態169．ポリペプチド又は複合体を単離することを更に含む、実施形態168の方法。

【0177】

実施形態170．CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を増加させる方法であって、T細胞を実施形態1～154のいずれか1つのポリペプチド又は実施形態144～162のいずれか1つの複合体と接触させることを含む、方法。

【0178】

実施形態171．CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞は、*in vitro*で存在する、実施形態170の方法。 10

【0179】

実施形態172．CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞は、*in vivo*で存在する、実施形態170の方法。

【0180】

実施形態173．増加は、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍である、実施形態170～172のいずれか1つの方法。

【0181】

実施形態174．NK細胞増殖を増加させる方法であって、NK細胞を実施形態1～143のいずれか1つのポリペプチド又は実施形態144～162のいずれか1つの複合体と接触させることを含む、方法。 20

【0182】

実施形態175．増加は、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍である、実施形態174の方法。

【0183】

実施形態176．癌を治療する方法であって、癌を伴う被験体に実施形態1～143のいずれか1つのポリペプチド、又は実施形態144～162のいずれか1つの複合体、又は実施形態163の医薬組成物を薬学的有効量、投与することを含む、方法。

【0184】

実施形態177．癌は、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、胃腸癌、膠芽腫、肝癌、肝細胞癌、上皮内新生物、腎臓癌又は腎癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃部癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮又は子宮内膜癌、泌尿器系癌、外陰癌、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球(SL)NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非分割細胞NHL、巨大病変NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、慢性リンパ球性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、有毛細胞白血病、並びに慢性骨髄芽球性白血病から選択される、実施形態176の方法。 30

【0185】

実施形態178．追加の療法剤を投与することを更に含む、実施形態176又は177の方法。

【0186】

実施形態179．追加の療法剤は、抗癌剤である、実施形態178の方法。

【0187】

実施形態180．抗癌剤は、化学療法剤、抗癌生物製剤、放射線療法薬、CAR-T療 50

法薬、及び腫瘍溶解性ウイルスから選択される、実施形態 179 の方法。

【0188】

実施形態 181 . 追加の療法剤は、抗癌生物製剤である、実施形態 179 又は 180 の方法。

【0189】

実施形態 182 . 抗癌生物製剤は、PD - 1 及び / 又は PD - L 1 を阻害する作用物質である、実施形態 181 の方法。

【0190】

実施形態 183 . 抗癌生物製剤は、VISTA、gpNMB、B7H3、B7H4、HHLA2、CTLA4、又はTIGITを阻害する作用物質である、実施形態 181 の方法。 10

【0191】

実施形態 184 . 抗癌剤は、抗体である、実施形態 179 ~ 183 のいずれか 1 つの方法。

【0192】

実施形態 185 . 抗癌生物製剤は、サイトカインである、実施形態 181 の方法。

【0193】

実施形態 186 . 抗癌剤は、CAR - T療法薬である、実施形態 179 の方法。

【0194】

実施形態 187 . 抗癌剤は、腫瘍溶解性ウイルスである、実施形態 179 の方法。 20

【0195】

実施形態 188 . 腫瘍切除及び / 又は放射線療法を更に含む、実施形態 176 ~ 187 のいずれか 1 つの方法。

【図面の簡単な説明】

【0196】

【図 1】図 1 A ~ 図 1 H は、様々な IL - 2 融合タンパク質のフォーマットの概略を示す図である。図 1 A は、ヘテロ二量体ノブインホール (knob-in-hole) IgG1 Fc の N 末端に連結された IL - 2 を示す。図 1 B は、シングルドメイン抗体のヘテロ二量体 IgG1 Fc の C 末端に連結された IL - 2 を示す。図 1 C ~ 図 1 E は、1 つの VHH (図 1 E)、2 つの同一の VHH (図 1 C)、又は 2 つの異なる VHH (図 1 D) に連結された IL - 2 を示す。図 1 F は、従来 of 抗体のホモ二量体重鎖定常領域の C 末端に連結された IL - 2 を示す。図 1 G は、従来 of 抗体のヘテロ二量体重鎖定常領域の C 末端に連結された IL - 2 を示す。図 1 H は、ヘテロ二量体 scFv 抗体の C 末端に融合された IL - 2 を示す。 30

【図 2】図 2 A ~ 図 2 C は、フローサイトメトリーによって測定される、IL - 2 受容体 (CD25、CD122、及び CD132) の様々な組合せを一過的にトランスフェクションした 293F 細胞に対する、図 1 A に示されるようにヘテロ二量体 Fc の N 末端に融合された野生型 IL - 2 (図 2 A) 又は修飾 IL - 2 (図 2 A ~ 図 2 C) を含む IL - 2 融合タンパク質の結合を示す図である。「UT 293F」は、トランスフェクションされていない 293F 細胞を示す。 40

【図 3】図 3 A 及び図 3 B は、フローサイトメトリーによって測定される、CD25 及び CD122 を一過的にトランスフェクションした 293F 細胞に対する、図 1 A に示されるようにヘテロ二量体 Fc の N 末端に融合された野生型 IL - 2 又は修飾 IL - 2 を含む融合タンパク質の結合を示す図である。

【図 4】図 4 A 及び図 4 B は、フローサイトメトリーによって測定される、CD122 及び CD132、又は CD25、CD122、及び CD132 を一過的にトランスフェクションした 293F 細胞に対する、図 1 A に示されるようにヘテロ二量体 Fc の N 末端に融合された野生型 IL - 2 又は修飾 IL - 2 を含む融合タンパク質の結合を示す図である。

【図 5】図 5 A 及び図 5 B は、フローサイトメトリーによって測定される、休止 CD4<sup>+</sup>T 細胞及び活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞に対する、図 1 B に示されるようにヘテロ二量体 Fc に 50

連結された非標的化VHHのC末端に融合された野生型IL-2又は修飾IL-2を含む融合タンパク質の結合を示す図である。「アイソタイプコントロール」は、IL-2を含まないコントロールタンパク質を示す。

【図6】図6A及び図6Bは、フローサイトメトリーによって測定される、濃縮された制御性T細胞(Treg、図6A)、誘導された制御性T細胞(誘導されたTreg、図6B)、及び濃縮されたレスポナーCD4<sup>+</sup>T細胞(Tresp、図6C)に対する、図1Bに示されるようにヘテロ二量体Fcに連結された非標的化VHHのC末端に融合された野生型IL-2又は修飾IL-2を含む融合タンパク質の結合を示す図である。

【図7】図7A~図7Dは、休止CD4<sup>+</sup>T細胞及びCD8<sup>+</sup>T細胞に対する、図1Bに示されるようにヘテロ二量体Fcに連結された非標的化VHHのC末端に融合された野生型IL-2又は修飾IL-2を含む融合タンパク質の活性を示す図である。増殖(図7A及び図7C)及びCD71レベル(図7B及び図7D)を測定した。図7E及び図7Fは、細胞内リン酸化STAT5レベルのフローサイトメトリー検出によって測定される、休止CD4<sup>+</sup>T細胞及びCD8<sup>+</sup>T細胞に対する、図1Bに示されるようにヘテロ二量体Fcに連結された非標的化VHHのC末端に融合された野生型IL-2又は修飾IL-2の活性を示す図である。「アイソタイプ」は、IL-2を含まないコントロールタンパク質を示す。

【図8】図8A及び図8Bは、図1Bに示されるようにヘテロ二量体Fcに連結された非標的化VHHのC末端に融合された野生型IL-2又は修飾IL-2を含む融合タンパク質での7日間の処理後の濃縮されたTregの活性化のマーカールとしての増殖及びCD25レベルを示す図である。

【図9】図9A~図9Dは、CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞に対するペンプロリズマブ、図1Fに示されるようにIL-2-RASが重鎖C末端に融合されたペンプロリズマブの類縁体、及びIL-2-RAS単独(図9C及び図9D)の活性及び結合を示す図である。CD8<sup>+</sup>(図9A)及びCD4<sup>+</sup>(図9B)T細胞に対する活性をCellTrace Violetのフローサイトメトリー検出によって測定した。CD8<sup>+</sup>T細胞(図9C)及びCD4<sup>+</sup>T細胞(図9D)に対する結合の程度をフローサイトメトリーによって測定した。

【図10】図10A~図10Dは、IL-2に対するCD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖の誘導の依存性を示す図である。プレブロッキング(pre-blocking)を行わない(図10A及び図10B)又は飽和濃度のペンプロリズマブでプレブロッキングした(図10C及び図10D)場合のCD8<sup>+</sup>T細胞(図10A及び図10C)又はCD4<sup>+</sup>T細胞(図10B及び図10D)の増殖に対するペンプロリズマブ、非標的化IL-2-RAS、及び図1Fに示されるようにIL-2-RASが重鎖C末端に融合されたペンプロリズマブの類縁体の影響を示す。

【図11】図1Fに示されるようにIL-2-RASが重鎖C末端に融合されたペンプロリズマブの類縁体、並びに図1Bに示されるように非標的化VHHのC末端に融合されたIL-2-RAS、及び図1Bに示されるように非標的化VHHのC末端に融合された野生型IL-2によるCD4<sup>+</sup>Tレスポナー(Tresp)細胞増殖の回復を示す図である。Tresp増殖をCD3結合(Tresp+ビーズ)によって誘導した後、自家制御性T細胞(Treg)を用いて抑制した。「Tresp+ビーズ」の線は、Treg細胞の非存在下でのCD3結合によるベースラインTresp細胞増殖を示す。「No Ab」の線は、Treg細胞の存在下でのCD3結合によるベースラインTresp細胞増殖を示す。

【図12】図12A及び図12Bは、プレートに結合した、図1Bに示されるように非標的化VHHのC末端に融合された非標的化野生型IL-2(「IL-2 WT」)又はIL-2-RASによるT細胞のトランス活性化を示す図である。T細胞活性化を細胞内リン酸化STAT5レベルのフローサイトメトリー検出によって測定した。CD8<sup>+</sup>T細胞(図12A)及びCD4<sup>+</sup>T細胞(図12B)の応答を示す。

【図13】図13A~図13Iは、NK細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、及びCD4<sup>+</sup>T細胞に対

10

20

30

40

50

する、図 1 H に示されるように NK p 4 6 を標的とするヘテロ二量体 s c F v 抗体の C 末端に融合された I L - 2 - R A S、NK p 4 6 を標的とするヘテロ二量体 s c F v 抗体単独、及び図 1 B に示されるようにヘテロ二量体 F c に連結された非標的化 V H H の C 末端に融合された野生型 I L - 2 又は I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質の活性及び結合を示す図である。NK 細胞 (図 1 3 A)、C D 8 + T 細胞 (図 1 3 B)、及び C D 4 + T 細胞 (図 1 3 C) の増殖、並びに NK 細胞 (図 1 3 D)、C D 8 + T 細胞 (図 1 3 E)、及び C D 4 + T 細胞 (図 1 3 F) の p S T A T レベルをフローサイトメトリーによって測定した。NK 細胞 (図 1 3 G)、C D 8 + T 細胞 (図 1 3 H) 及び C D 4 + T 細胞 (図 1 3 I) に対する指定のポリペプチドの結合もフローサイトメトリーによって測定した。

【図 1 4】図 1 4 A ~ 図 1 4 H は、C D 8 + T 細胞又は C D 4 + T 細胞に対する、図 1 G に示されるように従来の抗 L A G 3 ヘテロ二量体抗体 (M A b) の C 末端に融合された I L - 2 - R A S、図 1 B に示されるようにヘテロ二量体 F c を有する抗 L A G 3 V H H の C 末端に融合された I L - 2 - R A S、図 1 B に示されるように非標的化 V H H の C 末端に融合された I L - 2 - R A S、図 1 B に示されるように非標的化ヘテロ二量体 F c の C 末端に融合された野生型 I L - 2、又は I L - 2 を有しない L A G 3 標的化 M A b 若しくは L A G 3 標的化 V H H - F c 分子の活性及び結合を示す図である。C D 8 + T 細胞 (図 1 4 A) 及び C D 4 + T 細胞 (図 1 4 B) の増殖、並びに C D 8 + T 細胞 (図 1 4 C 及び図 1 4 E) 及び C D 4 + T 細胞 (図 1 4 D 及び図 1 4 F) 上での活性化マーカー C D 2 5 (図 1 4 C 及び図 1 4 D) 及び C D 7 1 (図 1 4 E 及び図 1 4 F) の発現をフローサイトメトリーによって測定した。図 1 4 G 及び図 1 4 H は、活性化前 (pre-activated) C D 8 + T 細胞 (図 1 4 G) 及び C D 4 + T 細胞 (図 1 4 H) に対する結合を示す。

【図 1 5】V H H の標的抗原を発現せず、したがってレポーター遺伝子の誘導について過剰発現された I L - 2 受容体に対する修飾 I L - 2 の結合のみに依存する H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞に対する、図 1 B に示されるようにヘテロ二量体 F c を有する V H H の C 末端に融合された指定の修飾 I L - 2 を含む融合タンパク質の活性を示す図である。レポーター細胞において p S T A T 5 シグナル伝達の I L - 2 受容体媒介性誘導に应答して発現された分泌型胚性アルカリホスファターゼの活性を測定した。

【図 1 6】図 1 6 A 及び図 1 6 B は、P D - 1 を発現しない H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞 (図 1 6 A) 及び P D - 1 を発現する I L - 2 レポーター細胞 (図 1 6 B) に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。図 1 6 A 及び図 1 6 B で使用される「R A S」は、I L - 2 突然変異 T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 S、及び C 1 2 5 S を意味する。

【図 1 7】図 1 7 A ~ 図 1 7 C は、C D 2 5 遮断抗体の存在下及び非存在下における P D - 1 を発現しない H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。図 1 7 A ~ 図 1 7 C で使用される「R A S」は、I L - 2 突然変異 T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 S、及び C 1 2 5 S を意味する。

【図 1 8】図 1 8 A 及び図 1 8 B は、P D - 1 を発現しない H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞 (図 1 8 A) 及び P D - 1 を発現する I L - 2 レポーター細胞 (図 1 8 B) に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。図 1 8 A 及び図 1 8 B で使用される「R A S」は、I L - 2 突然変異 T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 S、及び C 1 2 5 S を意味する。図 1 8 B で使用される「I N B R X - 1 0 8」は、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む修飾 I L - 2 を意味する。

【図 1 9】図 1 9 A ~ 図 1 9 E は、指定のように P D - 1 を発現する又は P D - 1 を発現しない I L - 2 レポーター細胞に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。図 1 9 A ~ 図 1 9 E で使用される「N T \_\_突然変異体」は、ポリペプチドがパネルタイトルに記載の I L - 2 突然変異を含み、P D - 1 を発現しない細胞に対して試験されたことを意味する。図 1 9 A ~ 図 1 9 E で使用される「P D 1 \_\_突然変異体」は、ポリペプチドがパネルタイトルに記載の I L - 2 突然変異を含み、P D - 1 を発現する細胞に対して試験されたことを意味する。図 1 9 A ~ 図 1 9 E で使用される「R A S」は

、 I L - 2 突然変異 T 3 A、 P 6 5 R、 H 1 6 A、 D 8 4 S、 及び C 1 2 5 S を意味する。 図 1 9 A ~ 図 1 9 E で使用される「 N T \_ I N B R X - 1 0 8 」は、 ポリペプチドが配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む修飾 I L - 2 を含み、 P D - 1 を発現しない細胞に対して試験されたことを意味する。 図 1 9 A ~ 図 1 9 E で使用される「 P D 1 \_ I N B R X - 1 0 8 」は、 ポリペプチドが配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む修飾 I L - 2 を含み、 P D - 1 を発現する細胞に対して試験されたことを意味する。 I L - 2 突然変異を含むポリペプチドは、 実施例 1 9 及び表 7 にも記載される。

【図 2 0】 図 2 0 A ~ 図 2 0 E は、 指定のように P D - 1 を発現する又は P D - 1 を発現しない I L - 2 レポーター細胞に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。 図 2 0 A ~ 図 2 0 E で使用される「 N T \_ 突然変異体」は、 ポリペプチドがパネルタイトルに記載の I L - 2 突然変異を含み、 P D - 1 を発現しない細胞に対して試験されたことを意味する。 図 2 0 A ~ 図 2 0 E で使用される「 P D 1 \_ 突然変異体」は、 ポリペプチドがパネルタイトルに記載の I L - 2 突然変異を含み、 P D - 1 を発現する細胞に対して試験されたことを意味する。 図 2 0 A ~ 図 2 0 E で使用される「 R A S 」は、 I L - 2 突然変異 T 3 A、 P 6 5 R、 H 1 6 A、 D 8 4 S、 及び C 1 2 5 S を意味する。 図 2 0 A ~ 図 2 0 E で使用される「 N T \_ I N B R X - 1 0 8 」は、 ポリペプチドが配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む修飾 I L - 2 を含み、 P D - 1 を発現しない細胞に対して試験されたことを意味する。 図 2 0 A ~ 図 2 0 E で使用される「 P D 1 \_ I N B R X - 1 0 8 」は、 ポリペプチドが配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む修飾 I L - 2 を含み、 P D - 1 を発現する細胞に対して試験されたことを意味する。 I L - 2 突然変異を含むポリペプチドは、 実施例 2 0 及び表 8 にも記載される。

【図 2 1】 図 2 1 A ~ 図 2 1 D は、 指定のように P D - 1 を発現する又は P D - 1 を発現しない I L - 2 レポーター細胞に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。 図 2 1 A ~ 図 2 1 D で使用される「 N T \_ 突然変異体」は、 ポリペプチドがパネルタイトルに記載の I L - 2 突然変異を含み、 P D - 1 を発現しない細胞に対して試験されたことを意味する。 図 2 1 A ~ 図 2 1 D で使用される「 P D 1 \_ 突然変異体」は、 ポリペプチドがパネルタイトルに記載の I L - 2 突然変異を含み、 P D - 1 を発現する細胞に対して試験されたことを意味する。 図 2 1 A ~ 図 2 1 D で使用される「 R A S 」は、 I L - 2 突然変異 T 3 A、 P 6 5 R、 H 1 6 A、 D 8 4 S、 及び C 1 2 5 S を意味する。 図 2 1 A ~ 図 2 1 D で使用される「 N T \_ I N B R X - 1 0 8 」は、 ポリペプチドが配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む修飾 I L - 2 を含み、 P D - 1 を発現しない細胞に対して試験されたことを意味する。 図 2 1 A ~ 図 2 1 D で使用される「 P D 1 \_ I N B R X - 1 0 8 」は、 ポリペプチドが配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む修飾 I L - 2 を含み、 P D - 1 を発現する細胞に対して試験されたことを意味する。 I L - 2 突然変異を含むポリペプチドは、 実施例 2 1 及び表 9 にも記載される。

【図 2 2】 図 2 2 A 及び図 2 2 B は、 P D - 1 を発現しない H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞 ( 図 2 2 A ) 及び P D - 1 を発現する I L - 2 レポーター細胞 ( 図 2 2 B ) に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。 図 2 2 A 及び図 2 2 B で使用される「 R A S 」は、 I L - 2 突然変異 T 3 A、 P 6 5 R、 H 1 6 A、 D 8 4 S、 及び C 1 2 5 S を意味する。 さらに、 指定の修飾 I L - 2 突然変異は全て、 T 3 A 及び C 1 2 5 S 並びに記載の突然変異を含む。

【図 2 3】 図 2 3 A 及び図 2 3 B は、 P D - 1 を発現しない H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞 ( 図 2 3 A ) 及び P D - 1 を発現する I L - 2 レポーター細胞 ( 図 2 3 B ) に対する指定の修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性を示す図である。 図 2 3 A 及び図 2 3 B で使用される「 R A S 」は、 I L - 2 突然変異 T 3 A、 P 6 5 R、 H 1 6 A、 D 8 4 S、 及び C 1 2 5 S を意味する。

【図 2 4】 図 2 4 A 及び図 2 4 B は、 C D 8 a を発現しない H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞 ( 図 2 4 A ) 及び C D 8 a を発現する I L - 2 レポーター細胞 ( 図 2 4 B ) に対する指定の突然変異を含む修飾 I L - 2 を含む指定のポリペプチドの活性を示す図である。 図 2 4 A 及び図 2 4 B で使用される「 R A S 」は、 I L - 2 突然変異 T 3 A、 P

10

20

30

40

50

65R、H16A、D84S、及びC125Sを意味する。図24A及び図24Bで使用される「RAY」は、IL-2突然変異T3A、P65R、H16A、D84Y、及びC125Sを意味する。

【図25】図25A～図25Cは、HEK-Blue IL-2レポーター細胞（図25A）、NKp46を発現するIL-2レポーター細胞（図25B）、及びCD8aを発現するIL-2レポーター細胞（図25C）に対する指定の修飾又は野生型IL-2を含む指定のポリペプチドの活性を示す図である。図25A～図25Cで使用される「OprIX IL-2-WT tgcs」は、IL-2レポーター細胞上の標的に結合しないOprI結合ドメインと、T3G及びC125S突然変異を含むIL-2とを含むポリペプチドを意味する。

【図26】図26A～図26Eは、IL-2突然変異体を含む様々なポリペプチドの活性の分析を示す図である。図26Aは、様々なIL-2突然変異体の非標的化活性を示す。図26B及び図26Cは、非標的化EC<sub>50</sub>に対するPD-1（図26B）又はNKp46（図26C）の標的化EC<sub>50</sub>のプロットである。図26D及び図26Eは、PD-1（図26D）及びNKp46（図26E）の標的化ウィンドウを示し、これは、非標的化IL-2活性を回避した上で標的化活性が達成される濃度範囲を示す。

【図27】図27A～図27Hは、ヘテロ二量体Fcを有するTCR結合VHHのC末端に融合された修飾IL-2を含む融合タンパク質でのPBMCの処理後のpSTAT5レベルを示す図である。ここで、TCR結合ドメインは、指定のように一価又は二価である。図27A、図27C、図27E、及び図27Gは、指定のポリペプチドでの処理後のT細胞、NK細胞、及びT細胞に対する細胞内pSTAT5染色の中央蛍光強度を示す。図27B、図27D、図27F、及び図27Hは、指定のポリペプチドでの処理後のpSTAT5染色を有するT細胞、NK細胞、及びT細胞のパーセントを示す。

【図28】図28A～図28Dは、ヘテロ二量体Fcを有するTCR結合VHHのC末端に融合された修飾IL-2を含む融合タンパク質でのPBMCの処理後のT細胞増殖（図28A）、T細胞蓄積（図28B）、T細胞増殖（図28C）、及びT細胞蓄積（図28D）を示す図である。

【図29】図29A及び図29Bは、野生型IL-2及び修飾IL-2を含む非標的化ポリペプチドでのPBMCの処理後のpSTAT5レベルを示す図である。図29Aは、CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK細胞に対するpSTAT5染色を有する細胞のパーセントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0197】

本明細書に示される実施形態は、T細胞の活性を調節する修飾IL-2を含むポリペプチド、及び癌を治療する様々な方法におけるそれらの使用に関する。

【0198】

定義及び様々な実施形態

本明細書に使用されるセクションの見出しは編成のみを目的とし、記載される主題を限定すると解釈されるものではない。

【0199】

特許出願、特許公報、及びGenbankアクセッション番号を含む本明細書で引用される全ての参考文献は、各個別の参考文献が、引用することによりその全体が本明細書の一部をなすと具体的かつ個別に示されているかのように、引用することにより本明細書の一部をなす。

【0200】

本明細書に記載又は参照される技術及び手順は、一般に十分に理解されており、通常、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausuble, et

10

20

30

40

50

al. eds., (2003)), the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.), PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL、及びANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)), Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984)、Methods in Molecular Biology, Humana Press、Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press、Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987)、Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press、Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell eds., 1993 -8) J. Wiley and Sons、Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al. eds., 1991)、Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)、Antibodies (P. Finch, 1997)、Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)、Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)、Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)、及びCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)並びにそれらの最新版に記載される広く利用されている方法論等の当業者による慣例的な方法論を用いて使用される。

#### 【0201】

別段の規定がない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈により別段の要求がない限り、又は明白に特段の指示がない限り、単数名辞は複数を含み、複数名辞は単数を含むものとする。様々な出典又は参考文献の間での定義の矛盾については、本明細書に示される定義が優先される。

#### 【0202】

一般に、免疫グロブリン重鎖における残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)でのようなE Uインデックスの番号付けである。「K a b a tでのようなE Uインデックス」は、ヒトI g G 1 E U抗体の残基番号付けを指す。

#### 【0203】

本明細書に記載される本発明の実施形態は、「からなる (consisting)」実施形態及び/又は「から本質的になる (consisting essentially of)」実施形態を含むと理解される。本明細書で使用される場合に、単数形 ("a", "an", and "the") は、特段の指示がない限り複数の参照を含む。本明細書での「又は」という用語の使用は、選択肢が互いに排他的であることを意味すると解釈されない。

#### 【0204】

本出願では、「又は」の使用は、明白に特段の指定がない限り又は当業者によって理解されない限り、「及び/又は」を意味する。多項従属請求項の文脈では、「又は」の使用は、2項以上の先行する独立請求項又は従属請求項を引用する。

#### 【0205】

「参照試料」、「参照細胞」、又は「参照組織」という語句は、少なくとも1つの未知の特徴を有する試料との比較として使用され得る少なくとも1つの既知の特徴を有する試

料を示す。幾つかの実施形態においては、参照試料は、陽性又は陰性の指標として使用され得る。参照試料を使用することで、未知の特徴を有する試料中に存在するタンパク質及び/又はmRNAのレベルに対して、例えば、健康な組織中に存在するタンパク質及び/又はmRNAのレベルを確立することができる。幾つかの実施形態においては、参照試料は、同じ被験体に由来するが、試験される部分とは異なる被験体の部分に由来する試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、癌を取り囲む又は癌に隣接する組織領域に由来する試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、試験される被験体に由来するものではなく、対象の障害（例えば、特定の癌又はT細胞関連障害）を有する又は有しないことが既知の被験体に由来する試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、同じ被験体に由来するものであるが、被験体が癌を発症する前の時点での試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、同じ被験体又は異なる被験体からの良性癌試料に由来する試料である。比較のために陰性参照試料が使用される場合に、陰性参照試料における対象の分子の発現レベル又は量は、当業者が本開示を考慮して、該分子が存在しない及び/又は低いレベルの該分子が存在することを認識するレベルを示す。比較のために陽性参照試料が使用される場合に、陽性参照試料における対象の分子の発現レベル又は量は、当業者が本開示を考慮して、或るレベルの該分子が存在することを認識するレベルを示す。

10

#### 【0206】

療法剤の投与から恩恵を受ける又は療法剤の投与に応答するという文脈において本明細書で使用される「便益」、「臨床的便益」、「応答性」、及び「治療的応答性」という用語は、様々なエンドポイント、例えば、減速及び完全な停止を含む疾患進行の或る程度の抑止、疾患エピソード及び/又は症状の数の減少、病変サイズの縮小、隣接する末梢器官及び/又は末梢組織内への疾患細胞浸潤の抑止（すなわち、減少、減速、又は完全な停止）、病気蔓延の抑止（すなわち、減少、減速、又は完全な停止）、障害に関連する1つ以上の症状の或る程度の軽減、治療後の無病提示、例えば無増悪生存期間の長さの増加、全生存期間の延長、より高い奏効率、及び/又は治療後の所与の時点での死亡率の低下を評価することによって推し量ることができる。「非応答性」又は「応答しない」被験体又は癌は、「応答する」という上記の条件を満たさないものである。

20

#### 【0207】

「核酸分子」、「核酸」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は、区別なく使用され、ヌクレオチドのポリマーを指し得る。そのようなヌクレオチドのポリマーは、天然及び/又は非天然のヌクレオチドを含み、限定されるものではないが、DNA、RNA、及びPNAを含み得る。「核酸配列」は、核酸分子又はポリヌクレオチドに含まれるヌクレオチドの線状配列を指す。

30

#### 【0208】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために区別なく使用され、最小の長さに限定されない。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然又は非天然のアミノ酸残基を含み、限定されるものではないが、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体、及び多量体を含み得る。この定義には、完全長タンパク質及びその断片の両方が含まれる。これらの用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアル化、アセチル化、リン酸化等を含む。さらに、本開示の目的で、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対する欠失、付加、及び置換等の修飾（一般に性質について保存的）を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発によるような意図的なものであり得る、又はタンパク質を産生する宿主の突然変異若しくはPCR増幅によるエラーによるような偶発的なものであり得る。「アミノ酸配列」は、ポリペプチド又はタンパク質に含まれるアミノ酸の線状配列を指す。

40

#### 【0209】

本明細書で使用される「IL-2」又は「インターロイキン-2」は、細胞内でのIL-2前駆体のプロセッシングから生ずるあらゆる天然の成熟IL-2を指す。この用語は、

50

特段の指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト及びカニクイザル又はアカゲザル）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含むあらゆる脊椎動物起源からのIL-2を含む。この用語はまた、スプライス変異体又はアレル変異体等のIL-2の天然に存在する変異体を含む。非限定的な例示的なヒトIL-2アミノ酸配列は、例えば、GenBankアクセッション番号NP\_000577.2に示されている。配列番号1（成熟型）を参照されたい。

【0210】

本明細書で使用される「修飾IL-2」は、少なくとも1つのアミノ酸位置での置換により野生型IL-2アミノ酸配列とは異なるポリペプチドを指す。

【0211】

抗原又はエピトープに「特異的に結合する」という用語は、当該技術分野で十分に理解されている用語であり、そのような特異的な結合を決定する方法も当該技術分野で十分に知られている。別の細胞又は物質と反応又は会合するよりも特定の細胞又は物質とより頻繁に、より迅速に、より長い持続時間及び/又はより高い親和性で反応又は会合する場合に、分子は「特異的な結合」又は「優先的な結合」を示すと言及される。抗原結合ドメインは、他の物質に結合するよりも高い親和性、アビディティーで、より容易に、及び/又はより長い持続時間で結合する場合に、抗原に「特異的に結合」又は「優先的に結合」する。例えば、エピトープに特異的に又は優先的に結合するsdAb又はVHH含有ポリペプチドは、同じ標的抗原上の他のエピトープ又は他の標的抗原上のエピトープに結合するよりも高い親和性、アビディティーで、より容易に、及び/又はより長い持続時間でこのエピトープと結合するsdAb又はVHH含有ポリペプチドである。また、この定義を解釈することにより、例えば、第1の抗原に特異的又は優先的に結合する抗原結合ドメインが、第2の抗原に特異的又は優先的に結合し得る又は結合し得ないことも理解される。したがって、「特異的な結合」又は「優先的な結合」は、排他的な結合を（含み得るものの）必ずしも必要としない。一般に、必ずしもそうとは限らないが、結合への言及は優先的な結合を意味する。「特異性」は、結合性タンパク質が抗原に選択的に結合する能力を指す。

【0212】

本明細書で使用される場合に、IL-2の活性に関する「調節する」という用語は、IL-2の活性の変化を指す。幾つかの実施形態においては、「調節する」とは、IL-2活性の増加を指す。

【0213】

本明細書で使用される場合に、「エピトープ」という用語は、抗原結合分子（例えば、抗原結合ドメイン含有ポリペプチド）が結合する標的分子（例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、又は脂質等の抗原）上の部位を指す。エピトープは、しばしば、アミノ酸、ポリペプチド、又は糖側鎖等の分子の化学的に活性な表面編成物を含み、特定の3次元構造的特徴及び特定の電荷特徴を有する。エピトープは、標的分子の連続残基及び/又は並置された非連続残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）の両方から形成され得る。連続残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）から形成されるエピトープは、通常、変性溶剤への曝露で保持されるが、三次フォールディングにより形成されるエピトープは、通常、変性溶剤による処理で失われる。エピトープは、限定されるものではないが、少なくとも3個、少なくとも5個、又は8個~10個の残基（例えば、アミノ酸又はヌクレオチド）を含み得る。幾つかの実施形態においては、エピトープは、20残基（例えば、アミノ酸又はヌクレオチド）未満、15残基未満、又は12残基未満の長さである。2つの抗体は、それらが抗原に対して競合的結合を示す場合に、抗原内の同じエピトープに結合し得る。幾つかの実施形態においては、エピトープは、抗原結合分子上のCDR残基との或る特定の最小距離によって特定され得る。幾つかの実施形態においては、エピトープは、上記距離によって特定され得て、抗原結合分子の残基と抗原残基との間の結合（例えば、水素結合）に関与するそれらの残基に更に限定され得る。エピトープは、様々なスキャンによっても同様に特定され得る。例えば、アラニンスキャン又は

10

20

30

40

50

アルギニンスキャンは、抗原結合分子が相互作用し得る1つ以上の残基を示すことができる。明示的に示されない限り、エピトープとしての残基のセットは、特定の抗原結合ドメイン又は分子に対するエピトープの一部であることから他の残基を除外するものではない。むしろ、そのようなセットの存在は、最小のエピトープの列（又は種類のセット）を示す。したがって、幾つかの実施形態においては、エピトープとして特定された残基のセットは、抗原上のエピトープについての残基の排他的リストではなく、抗原に関連する最小のエピトープを示す。

**【0214】**

「非線状エピトープ」又は「立体構造エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子（例えば、抗原結合ドメイン含有ポリペプチド）が結合する抗原性タンパク質内の非連続的なポリペプチド、アミノ酸及び/又は糖を含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの残基がエピトープの他の示された残基と非連続的であるが、1つ以上の残基が他の残基と連続的である場合もある。

10

**【0215】**

「線状エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子（例えば、抗原結合ドメイン含有ポリペプチド）が結合する抗原性タンパク質内の連続的なポリペプチド、アミノ酸及び/又は糖を含む。幾つかの実施形態においては、線状エピトープ内の残基の全てが、抗原結合分子によって直接的に結合される（又は結合に関与する）必要があるわけではないことに留意されたい。幾つかの実施形態においては、線状エピトープは、事実上線状エピトープの配列からなるペプチドによる免疫化に由来し得る、又はタンパク質の残部から相対的に分離されたタンパク質の構造区間に由来し得る（こうして、抗原結合分子は、少なくとも主として、まさにその配列区間と相互作用し得る）。

20

**【0216】**

「抗体」及び「抗原結合分子」という用語は、最も広い意味で区別なく使用され、限定されるものではないが、慣例的な抗体（典型的には、少なくとも1つの重鎖及び少なくとも1つの軽鎖を含む）、シングルドメイン抗体（s d A b、典型的には重鎖に類似している1つだけの鎖を含む）、V H H含有ポリペプチド（少なくとも1つの重鎖のみの抗体可変ドメイン、すなわちV H Hを含むポリペプチド）、及び所望の抗原結合活性を示す限り上述のいずれかのフラグメントを含む抗原結合ドメインを含む様々なポリペプチドを包含する。幾つかの実施形態においては、抗体は二量体化ドメインを含む。そのような二量体化ドメインとしては、限定されるものではないが、重鎖定常ドメイン（C H 1、ヒンジ、C H 2、及びC H 3を含み、C H 1は典型的には、軽鎖定常ドメインC Lと対をなす一方で、ヒンジは二量体化を介在する）及びF c領域（ヒンジ、C H 2、及びC H 3を含み、ヒンジは二量体化を介在する）が挙げられる。抗体という用語には、限定されるものではないが、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びラクダ（ラマを含む）、サメ、マウス、ヒト、カニクイザル等の様々な種の抗体も含まれる。

30

**【0217】**

「シングルドメイン抗体」及び「s d A b」という用語は、単一の単量体ドメイン、典型的には、軽鎖を有しない重鎖（又はV H H）を有する抗体を指すために、本明細書では区別なく使用される。

40

**【0218】**

本明細書で使用される「V H H」又は「V H Hドメイン」又は「V H H抗原結合ドメイン」という用語は、ラクダ抗体又はサメ抗体等のシングルドメイン抗体の抗原結合部分を指す。幾つかの実施形態においては、V H Hは、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、及びF R 4と表される3つのC D Rと4つのフレームワーク領域とを含む。幾つかの実施形態においては、V H Hは、V H Hが実質的に抗原結合及び特異性を維持する限り、部分的なF R 1及び/又はF R 4のみを含むように又はそれらのフレームワーク領域の一方若しくは両方を欠くように、N末端又はC末端で切断されていてもよい。

**【0219】**

50

「V H H含有ポリペプチド」という用語は、少なくとも1つのV H Hドメインを含むポリペプチドを指す。幾つかの実施形態においては、V H Hポリペプチドは、2つ、3つ、又は4つ以上のV H Hドメインを含み、ここで、各V H Hドメインは、同じ又は異なってもよい。幾つかの実施形態においては、V H H含有ポリペプチドは、F c領域を含む。幾つかのそのような実施形態においては、V H Hポリペプチドは、二量体を形成し得る。V H H含有ポリペプチドの非限定的な構造としては、V H H<sub>1</sub>-F c、V H H<sub>1</sub>-V H H<sub>2</sub>-F c、及びV H H<sub>1</sub>-V H H<sub>2</sub>-V H H<sub>3</sub>-F cが挙げられ、ここで、V H H<sub>1</sub>、V H H<sub>2</sub>、及びV H H<sub>3</sub>は、同じ又は異なってもよい。そのような構造の幾つかの実施形態においては、或るV H Hは、リンカーによって別のV H Hに連結され得る、又は或るV H Hは、リンカーによってF cに連結され得る。幾つかのそのような実施形態においては、リンカーは、1個~20個のアミノ酸、好ましくは、主にグリシン及び任意にセリンから構成される1個~20個のアミノ酸を含む。幾つかの実施形態においては、V H H含有ポリペプチドがF cを含む場合に、それは二量体を形成する。したがって、構造V H H<sub>1</sub>-V H H<sub>2</sub>-F cは、それが二量体を形成する場合に、四価であるとみなされる(すなわち、二量体は4つのV H Hドメインを有する)。同様に、構造V H H<sub>1</sub>-V H H<sub>2</sub>-V H H<sub>3</sub>-F cは、それが二量体を形成する場合に、六価であるとみなされる(すなわち、二量体は6つのV H Hドメインを有する)。

10

#### 【0220】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体集団の抗体(s d A b又はV H H含有ポリペプチドを含む)を指す。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る天然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、典型的には、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する抗体である。したがって、モノクローナル抗体の試料は、抗原上の同じエピトープに結合することができる。「モノクローナル」という修飾成句は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の性質を示し、何らかの特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495により最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製され得る、又は米国特許第4,816,567号に記載されるような組換えDNA法によって作製され得る。モノクローナル抗体はまた、例えば、McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554に記載される技術を使用して作製されたファージライブラリーから単離され得る。

20

30

#### 【0221】

「CDR」という用語は、少なくとも1つの当業者に対する特定様式によって定義される相補性決定領域を示す。幾つかの実施形態においては、CDRは、Chothia番号付けスキーム、Kababat番号付けスキーム、KababatとChothiaとの組合せ、AbM定義、及び/又は接触定義(contact definition)のいずれかに従って定義され得る。V H Hは、CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>、及びCDR<sub>3</sub>と表される3つのCDRを含む。

#### 【0222】

本明細書で使用される「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも3つの重鎖定常ドメイン、すなわち、C<sub>H</sub>1、ヒンジ、C<sub>H</sub>2、及びC<sub>H</sub>3を含む領域を指す。当然ながら、ドメイン内の機能を変えない欠失及び改変は、特段の指定がない限り、「重鎖定常領域」という用語の範囲内に含まれる。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、 $\mu$ 、及び $\delta$ が挙げられる。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、 $\mu$ 及び $\mu$ も挙げられる。それぞれの重鎖定常領域は、1つの抗体アイソタイプに対応する。例えば、 $\mu$ 定常領域を含む抗体はI g G抗体であり、 $\delta$ 定常領域を含む抗体はI g D抗体であり、 $\delta$ 定常領域を含む抗体はI g A抗体である。さらに、 $\mu$ 定常領域を含む抗体はI g M抗体であり、 $\delta$ 定常領域を含む抗体はI g E抗体である。或る特定のアイソタイプは、更にサブクラスに細分化され得る。例えば、I g G抗体としては、限定されるものではないが、I g G<sub>1</sub>( $\mu$ <sub>1</sub>定常領域を含む)抗体、I g G<sub>2</sub>( $\mu$ <sub>2</sub>定常領域を含む)抗体、I g G<sub>3</sub>( $\mu$ <sub>3</sub>定常領

40

50

域を含む)抗体、及びIgG4(4定常領域を含む)抗体が挙げられ、IgA抗体としては、限定されるものではないが、IgA1(1定常領域を含む)抗体及びIgA2(2定常領域を含む)抗体が挙げられ、IgM抗体としては、限定されるものではないが、IgM1及びIgM2が挙げられる。

【0223】

本明細書で使用される「Fc領域」は、CH2及びCH3を含む重鎖定常領域の一部を指す。幾つかの実施形態においては、Fc領域は、ヒンジ、CH2、及びCH3を含む。様々な実施形態において、Fc領域がヒンジを含む場合に、ヒンジは、2つのFc含有ポリペプチド間の二量体化を介在する。Fc領域は、本明細書で論じられる任意の抗体重鎖定常領域アイソタイプのものであり得る。幾つかの実施形態においては、Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4である。

10

【0224】

本明細書で使用される「アクセプターヒトフレームワーク」は、本明細書で論じられるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来するアクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含むことができる、又はアミノ酸配列の変化を含み得る。幾つかの実施形態においては、アミノ酸の変化の数は、VHH等の単一の抗原結合ドメイン内の全てのヒトフレームワークにわたって10個未満、又は9個未満、又は8個未満、又は7個未満、又は6個未満、又は5個未満、又は4個未満、又は3個未満である。

20

【0225】

「親和性」は、分子(例えば、抗体又はVHH含有ポリペプチド)の単一の結合部位及びその結合相手(例えば、抗原)の間の非共有結合的相互作用の合計の強さを指す。分子Xのその相手Yに対する親和性又は見かけの親和性は、一般に、それぞれ解離定数(KD)又はKD(見かけ)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載されている方法を含む、当該技術分野で既知の通常の方法(例えば、ELISA KD、KinExA、フローサイトメトリー、及び/又は表面プラズモン共鳴デバイス等)によって測定され得る。このような方法としては、限定されるものではないが、BIAcore(商標)、Octet(商標)、又はフローサイトメトリーを要する方法が挙げられる。

30

【0226】

本明細書で使用される「KD」という用語は、抗原結合分子/抗原相互作用の平衡解離定数を指す。本明細書で「KD」という用語が使用される場合に、それには、KD及びKD(見かけ)が含まれる。

【0227】

幾つかの実施形態においては、抗原結合分子のKDは、フローサイトメトリーによって、抗原発現細胞システムを使用し、各抗体濃度で測定された平均蛍光を非線形1サイト結合方程式(graphpad社のPrism Software)にフィッティングして測定される。幾つかのそのような実施形態においては、KDはKD(見かけ)である。

【0228】

「生物学的活性」という用語は、分子の任意の1つ以上の生物学的特性(in vivoで見られるように天然に存在するか、又は組換え手段によって提供される若しくは可能となるかどうか)を指す。生物学的特性としては、限定されるものではないが、リガンドの結合、細胞増殖(T細胞増殖等)の誘導又は増加、及びサイトカインの発現の誘導又は増加が挙げられる。

40

【0229】

本明細書で使用される「IL-2活性」又はIL-2の「生物学的活性」という用語には、IL-2の任意の生物学的作用又は生物学的関連機能の少なくとも1つが含まれる。幾つかの実施形態においては、IL-2活性としては、IL-2がT細胞増殖を誘導し、及び/又はナチュラルキラー(NK)細胞を活性化する能力が挙げられる。非限定的な例

50

示的な I L - 2 活性としては、 p S T A T 5 発現の増加、 C D 4 + T 細胞及び / 又は C D 8 + T 細胞の増殖の増加、 T 細胞上での C D 7 1 発現の増加、並びに C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞の活性化及び増殖に対する T r e g 細胞の抑制活性の低下が挙げられる。

【 0 2 3 0 】

「アゴニスト」抗体又は「活性化」抗体 ( s d A b 又は V H H 含有ポリペプチド等 ) は、標的抗原の生物学的活性を増加及び / 又は活性化する抗体である。幾つかの実施形態においては、アゴニスト抗体は、抗原に結合し、その生物学的活性を少なくとも約 2 0 %、4 0 %、6 0 %、8 0 %、8 5 % 以上増加させる。

【 0 2 3 1 】

「アンタゴニスト」抗体、「ブロッキング」抗体、又は「中和」抗体は、標的抗原の生物学的活性を低下及び / 又は不活性化する抗体である。幾つかの実施形態においては、中和抗体は、抗原に結合し、その生物学的活性を少なくとも約 2 0 %、4 0 %、6 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 以上低下させる。

【 0 2 3 2 】

「親和性成熟」 V H H 含有ポリペプチドは、 V H H 含有ポリペプチドの抗原に対する親和性に改善をもたらす変化を有しない親 V H H 含有ポリペプチドと比較して 1 つ以上の C D R に 1 つ以上のそのような変化を有する V H H 含有ポリペプチドを指す。

【 0 2 3 3 】

本明細書で使用される「ヒト化 V H H」は、 1 つ以上のフレームワーク領域が実質的にヒトフレームワーク領域で置き換えられた V H H を指す。幾つかの場合には、ヒト免疫グロブリンの或る特定のフレームワーク領域 ( F R ) 残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化 V H H は、当初の V H H にもヒトフレームワーク配列にも見られないが、 V H H 又は V H H 含有ポリペプチドの性能を更に改良及び最適化するために含まれる残基を含み得る。幾つかの実施形態においては、ヒト化 V H H 含有ポリペプチドは、ヒト F c 領域を含む。理解されるように、ヒト化配列は、その一次配列によって特定され得て、必ずしも抗体が作製された過程を示すわけではない。

【 0 2 3 4 】

「機能的 F c 領域」は、天然配列の F c 領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」としては、 F c 受容体結合、 C 1 q 結合及び補体依存性細胞傷害作用 ( C D C )、 F c 受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 ( A D C C )、食作用、細胞表面受容体 (例えば、 B 細胞受容体) の下方調節、並びに B 細胞活性化等が挙げられる。このようなエフェクター機能は、一般に、 F c 領域を結合ドメイン (例えば、抗体可変ドメイン) と組み合わせることを要し、様々なアッセイを使用して評価することができる。

【 0 2 3 5 】

「天然配列の F c 領域」は、天然に見られる F c 領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列のヒト F c 領域としては、天然配列のヒト I g G 1 F c 領域 (非 A アロタイプ及び A アロタイプ)、天然配列のヒト I g G 2 F c 領域、天然配列のヒト I g G 3 F c 領域、及び天然配列のヒト I g G 4 F c 領域、並びにそれらの天然に存在する変異体が挙げられる。

【 0 2 3 6 】

「変異型 F c 領域」は、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾により天然配列の F c 領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施形態においては、「変異型 F c 領域」は、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾により天然配列の F c 領域のアミノ酸配列とは異なるが、天然配列の F c 領域の少なくとも 1 つのエフェクター機能を保持するアミノ酸配列を含む。幾つかの実施形態においては、変異型 F c 領域は、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域と比較して、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域において、少なくとも 1 個のアミノ酸置換、例えば、約 1 個 ~ 約 1 0 個のアミノ酸置換、好ましくは、約 1 個 ~ 約 5 個のアミノ酸置換を有する。幾つかの実施形態においては、本明細書の変異型 F c 領域は、天然配列の F c 領域及び / 又は親ポリペプチドの F c 領域

と少なくとも約 80% の配列同一性、それらと少なくとも約 90% の配列同一性、それらと少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% の配列同一性を有する。

【0237】

「Fc 受容体」又は「FcR」は、抗体の Fc 領域に結合する受容体を記載している。幾つかの実施形態においては、FcR は、天然のヒト FcR である。幾つかの実施形態においては、FcR は、IgG 抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、FcRI サブクラス、FcRII サブクラス、及び FcRIII サブクラスの受容体であって、これらの受容体のアレル変異体及び選択的スプライシングされた形態を含む受容体を含む。FcRII 受容体には、FcRIIA（「活性化受容体」）及び FcRIIB（「阻害受容体」）が含まれ、これらは同様のアミノ酸配列を有するが、主にその細胞質ドメインが異なる。活性化受容体 FcRIIA は、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を含む。阻害受容体 FcRIIB は、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）を含む（例えば、Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997) を参照されたい）。FcR は、例えば、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)、Cappel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994)、及び de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) でレビューされている。将来特定されるものを含む他の FcR は、本明細書では「FcR」という用語によって包含される。例えば、「Fc 受容体」又は「FcR」という用語はまた、胎児性受容体 FcRn を含み、これは、母体の IgG の胎児への移動（Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) 及び Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)）及び免疫グロブリンの恒常性の調節の役割を担う。FcRn への結合を測定する方法は既知である（例えば、Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997)、Ghetie et al., *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997)、Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004)、国際公開第 2004/92219 号（Hinton ら）を参照されたい）。

【0238】

本明細書で使用される「実質的に同様」又は「実質的に同じ」という用語は、当業者が 2 つ以上の値の間の差を、上記値によって測定される生物学的特徴の文脈内で生物学的意義及び/又は統計学的有意性が殆どない又は全くないとみなすような、2 つ以上の数値の間の十分に高度な類似性を示す。幾つかの実施形態においては、2 つ以上の実質的に同様の値は、5%、10%、15%、20%、25%、又は 50% のいずれか 1 つの概数以下だけ異なる。

【0239】

ポリペプチド「変異体」とは、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大パーセントの配列同一性を達成した後に、配列同一性の部分として保存的置換を一切考慮せずに、天然配列のポリペプチドと少なくとも約 80% のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのような変異体としては、例えば、ポリペプチドの N 末端又は C 末端で 1 つ以上のアミノ酸残基が付加又は欠失されているポリペプチドが挙げられる。幾つかの実施形態においては、変異体は、少なくとも約 80% のアミノ酸配列同一性を有する。幾つかの実施形態においては、変異体は、少なくとも約 90% のアミノ酸配列同一性を有する。幾つかの実施形態においては、変異体は、天然配列のポリペプチドと少なくとも約 95% のアミノ酸配列同一性を有する。

【0240】

本明細書で使用される場合に、ペプチド配列、ポリペプチド配列、又は抗体配列に関する「パーセント (%) のアミノ酸配列同一性」及び「ホモロジー」は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大パーセントの配列同一性を達成した後に、配列同一性の部分として保存的置換を一切考慮せずに、特定のペプチド配列又はポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントのアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、例

10

20

30

40

50

例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMEGALIGN(商標)(DN ASTAR社)ソフトウェア等の公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当業者の技能の範囲内である様々な方法で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

【0241】

アミノ酸置換には、限定されるものではないが、ポリペプチド中の或るアミノ酸を別のアミノ酸により置き換えることが含まれ得る。例示的な置換を表1に示す。アミノ酸置換を対象の抗体に導入し、産物を所望の活性、例えば、抗原若しくはレセプター結合の保持/改善、抗原若しくはレセプター結合の減少、免疫原性の減少、又はADCC若しくはCD

10

【0242】

【表1】

表1

当初の残基	例示的な置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

20

30

【0243】

共通の側鎖特性に従ってアミノ酸をグループ分けすることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、
- (3) 酸性：Asp、Glu、
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg、
- (5) 鎖の配向に影響する残基：Gly、Pro、
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

40

【0244】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴う。

【0245】

「ベクター」という用語は、宿主細胞内で増殖され得る、クローニングされたポリヌクレオチド(単数又は複数)を含むように操作することができるポリヌクレオチドを記載す

50

るために使用される。ベクターは、以下のエレメントのうちの一つ以上を含み得る：複製起点、対象のポリペプチドの発現を調節する一つ以上の調節配列（例えば、プロモーター及び/又はエンハンサー等）、及び/又は一つ以上の選択可能なマーカー遺伝子（例えば、抗生物質耐性遺伝子及び比色アッセイで使用することができる遺伝子、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等）。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞において対象のポリペプチドを発現するために使用されるベクターを指す。

#### 【0246】

「宿主細胞」は、ベクター又は単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであり得る又はレシピエントであった細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。例示的な真核細胞としては、霊長類動物細胞又は非霊長類動物細胞等の哺乳動物細胞、酵母等の真菌細胞、植物細胞、及び昆虫細胞が挙げられる。非限定的な例示的な哺乳動物細胞としては、限定されるものではないが、NSO細胞、PER.C6（商標）細胞（CruCell社）、並びに293F細胞及びCHO細胞、並びにそれらの派生物、例えば293-6E細胞、CHO-DG44細胞、CHO-K1細胞、CHO-S細胞、及びCHO-DS細胞が挙げられる。宿主細胞には、単一の宿主細胞の子孫が含まれるが、自然突然変異、偶発突然変異、又は意図的突然変異のため、子孫は必ずしも当初の親細胞と完全に同一（形態又はゲノムDNA相補において）であるとは限らない。宿主細胞には、本明細書で提供されるポリヌクレオチド（複数の場合もある）と共に*in vivo*でトランスフェクションされた細胞も含まれる。

10

#### 【0247】

本明細書で使用される「単離された」という用語は、典型的に天然に一緒に見出される又は一緒に産生される成分の少なくとも幾つかから分離された分子を指す。例えば、ポリペプチドは、それを産生した細胞の成分の少なくとも一部から分離される場合に、「単離された」と称される。ポリペプチドが発現後に細胞によって分泌される場合に、ポリペプチドを含む上清を、それを産生した細胞から物理的に分離することは、ポリペプチドを「単離する」とみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、それが典型的に天然に見られるより大きなポリヌクレオチド（例えば、DNAポリヌクレオチドの場合に、ゲノムDNA又はミトコンドリアDNA等）の一部ではない場合に、又は例えば、RNAポリヌクレオチドの場合に、それを産生した細胞の成分の少なくとも一部から分離される場合に、「単離された」と称される。したがって、宿主細胞内のベクターに含まれるDNAポリヌクレオチドは、「単離された」と称され得る。

20

30

#### 【0248】

「個体」及び「被験体」という用語は、動物、例えば哺乳動物を指すために本明細書では区別なく使用される。幾つかの実施形態においては、限定されるものではないが、ヒト、齧歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳動物実験動物、哺乳動物家畜、哺乳動物競技用動物（sport animals）、及び哺乳動物ペットを含む哺乳動物を治療する方法が提供される。幾つかの例では、「個体」又は「被験体」は、疾患又は障害の治療を必要とする個体又は被験体を指す。幾つかの実施形態においては、治療を受ける被験体は、被験体が治療に関連する障害を有する又は障害を患う十分なリスクがあると特定されたことを表す患者であり得る。

40

#### 【0249】

本明細書で使用される「疾患」又は「障害」は、治療が必要とされる及び/又は所望される状態を指す。

#### 【0250】

「腫瘍細胞」、「癌細胞」、「癌」、「腫瘍」、及び/又は「新生物」という用語は、特段の指定がない限り、本明細書では区別なく使用され、身体器官及び系の正常な機能を妨げる制御不能な増殖及び/又は異常な細胞生存の増加及び/又はアポトーシスの阻害を示す細胞（又は複数の細胞）を指す。この定義には、良性及び悪性の癌、ポリープ、過形成、並びに潜伏腫瘍又は微小転移が含まれる。

#### 【0251】

50

「癌」及び「腫瘍」という用語は、固形癌及び血液癌／リンパ腺癌を包含するとともに、異形成等の悪性腫瘍、前悪性腫瘍、及び良性腫瘍も包含する。また、この定義には、免疫系（例えば、免疫回避メカニズム及び免疫エスケープメカニズム）によって妨げられない異常な増殖を伴う細胞（例えば、ウイルス感染細胞）も含まれる。例示的な癌としては、限定されるものではないが、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌（胃腸癌を含む）、膠芽腫、肝癌、肝細胞癌、上皮内新生物、腎臓癌又は腎癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌（唇、舌、口、及び咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃部癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮又は子宮内膜癌、泌尿器系癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）、小リンパ球（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非分割細胞NHL、巨大病変NHLを含む）、マンツル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、及びワルデンストレームマクログロブリン血症、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、有毛細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、並びにその他の癌腫及び肉腫、並びに移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（脳腫瘍に関連する浮腫等）及びメイグス症候群に関連する異常血管増殖が挙げられる。

10

20

#### 【0252】

本明細書で使用される「非腫瘍細胞」という用語は、正常な細胞又は組織を指す。例示的な非腫瘍細胞としては、限定されるものではないが、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、間質性腎臓細胞、線維芽細胞様滑膜細胞、骨芽細胞、及び乳房、骨格筋、膵臓、胃、卵巣、小腸、胎盤、子宮、精巣、腎臓、肺、心臓、脳、肝臓、前立腺、結腸、リンパ器官、骨に位置する細胞、及び骨由来の間葉系幹細胞が挙げられる。本明細書で使用される「末梢に位置する細胞又は組織」という用語は、腫瘍細胞の近く及び／又は腫瘍微小環境内に位置しない非腫瘍細胞を指す。

#### 【0253】

本明細書で使用される「腫瘍微小環境内の細胞又は組織」という用語は、腫瘍細胞を取り囲む及び／又は腫瘍細胞に栄養を与える細胞、分子、細胞外マトリックス及び／又は血管を指す。例示的な腫瘍微小環境内の細胞又は組織としては、限定されるものではないが、腫瘍血管系、腫瘍浸潤リンパ球、線維芽細胞網細胞、内皮前駆細胞（EPC）、癌関連線維芽細胞、周皮細胞、他の間質細胞、細胞外マトリックス（ECM）の成分、樹状細胞、抗原提示細胞、T細胞、制御性T細胞（Treg細胞）、マクロファージ、好中球、骨髄由来抑制細胞（MDSC）及び腫瘍の近位に位置する他の免疫細胞が挙げられる。腫瘍細胞及び／又は腫瘍微小環境内に位置する細胞／組織を特定する方法は、本明細書で以下に記載されるように当該技術分野で十分に知られている。

30

#### 【0254】

幾つかの実施形態においては、「増加」又は「減少」は、それぞれ、統計学的に有意な増加又は減少を指す。当業者に明らかであるように、「調節」はまた、試験作用物質が存在することを除き同じ条件と比較した、標的又は抗原のそのリガンド、結合相手、ホモ多量体形若しくはヘテロ多量体形へと会合する相手又は基質の1つ以上に対する親和性、アピディティ、特異性及び／又は選択性の変化（増加又は減少のいずれかであり得る）を引き起こすこと、標的又は抗原が存在する培地又は環境における1つ以上の条件（pH、イオン強度、補因子の存在等）に対する標的又は抗原の感受性の変化（増加又は減少のいずれかであり得る）を引き起こすこと、及び／又は細胞増殖若しくはサイトカイン産生を含み得る。これは、関与する標的に応じて、それ自体が既知の又は本明細書に記載される任意の適切な方法で及び／又は任意の適切なアッセイを使用して決定され得る。

40

50

## 【0255】

本明細書で使用される場合に、「免疫応答」は、疾患（例えば、癌又は癌転移）の発症を抑止若しくは未然防止する又はその症状を改善するのに十分である細胞性免疫応答及び/又は体液性免疫応答を包含することが意図される。「免疫応答」は、自然免疫系及び適応免疫系の両方の側面を包含し得る。

## 【0256】

本明細書で使用される場合に、「治療」は、有益な又は所望の臨床結果を得るための手法である。本明細書で使用される「治療」は、ヒトを含む哺乳動物における疾患用の療法薬の任意の投与又は適用を対象とする。本開示の目的では、有益な又は所望の臨床結果としては、限定されるものではないが、1つ以上の症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の進展（例えば、転移、例えば肺又はリンパ節への転移）の未然防止又は遅延、疾患の再発の未然防止又は遅延、疾患の進行の遅延又は減速、疾患状態の改善、疾患又は疾患の進行の抑止、疾患又はその進行の抑止又は減速、その発達の阻止、及び寛解（部分的でも全体的でも）のいずれか1つ以上が挙げられる。「治療」には、増殖性疾患の病理学的結果の軽減も含まれる。本明細書で提供される方法は、治療のこれらの側面のいずれか1つ以上を企図している。上記に従って、治療という用語は、障害の全ての側面を100パーセント除去する必要はない。

10

## 【0257】

「改善」とは、療法剤を投与しない場合と比べて、1つ以上の症状が軽減又は向上することを意味する。「改善」には、症状の持続期間が短縮又は減少することも含まれる。

20

## 【0258】

「抗癌剤」という用語は、本明細書では、その最も広い意味で、1つ以上の癌の治療に使用される作用物質を指すために使用される。そのような作用物質の例示的なクラスとしては、限定されるものではないが、化学療法剤、抗癌生物製剤（サイトカイン、受容体細胞外ドメイン - Fc 融合物、及び抗体等）、放射線療法薬、CAR-T療法薬、治療用オリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド及び siRNA 等）、及び腫瘍溶解性ウイルスが挙げられる。

## 【0259】

「生体試料」という用語は、生きている生き物又はかつて生きていた生き物からの或る量の物質を意味する。そのような物質としては、限定されるものではないが、血液（例えば、全血）、血漿、血清、尿、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単球、他の細胞、器官、組織、骨髄、リンパ節、及び脾臓が挙げられる。

30

## 【0260】

「コントロール」又は「参照」という用語は、分析物を含まないことが既知の組成物（「ネガティブコントロール」）又は分析物を含むことが既知の組成物（「ポジティブコントロール」）を指す。ポジティブコントロールは、既知の濃度の分析物を含み得る。

## 【0261】

「抑止」又は「抑止する」という用語は、任意の表現型特徴の減少若しくは停止、又はその特徴の発生率、程度、若しくは可能性の減少若しくは停止を指す。「低減する」又は「抑止する」とは、参照と比較して、活性、機能、及び/又は量を減少させる、低減する、又は停止することである。幾つかの実施形態においては、「低減する」又は「抑止する」とは、10%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。幾つかの実施形態においては、「低減する」又は「抑止する」とは、50%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。幾つかの実施形態においては、「低減する」又は「抑止する」とは、75%、85%、90%、95%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。幾つかの実施形態においては、上記の量は、或る期間にわたって、同じ期間にわたるコントロールに対して抑止又は減少される。

40

## 【0262】

本明細書で使用される場合に、「疾患の発症を遅延させる」とは、疾患（癌等）の発症を遅らせる、妨げる、減速させる、遅滞させる、安定化させる、抑制する、及び/又は引

50

き延ばすことを意味する。この遅延は、疾患の病歴及び／又は治療される個体に応じて、様々な長さの時間となり得る。当業者に明らかであるように、十分な又は大幅な遅延は、事実上、個体が疾患を発症しないという点で未然防止を包含し得る。例えば、転移の発生等の末期癌を遅延させることができる。

【0263】

本明細書で使用される「未然防止」は、疾患の素因を有し得るが、まだ疾患と診断されていない被験体における疾患の発生又は再発に対する予防をもたらすことを含む。特段の指示がない限り、「低減する」、「抑止する」、又は「未然防止する」という用語は、全期間にわたる完全な未然防止を示すのではなく又は必要とするのではなく、測定される期間だけにわたる未然防止を示す又は必要とする。

10

【0264】

物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重、並びに物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストが個体において所望の応答を誘発する能力等の要因によって変動し得る。治療有効量はまた、治療的に有益な作用が物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの任意の有毒作用又は有害作用を上回る量である。治療有効量は、1回以上の投与で送達され得る。治療有効量は、必要な投与量で必要な時間にわたって、所望の治療的結果及び／又は予防的結果を達成するのに有効な量を指す。

【0265】

「医薬製剤」及び「医薬組成物」という用語は、有効成分（複数の場合もある）の生物学的活性が有効になることを可能にするような形態であり、製剤を投与する被験体に対して許容不可能なほど有毒な追加の成分を含まない調製物を指す。そのような製剤は滅菌され得る。

20

【0266】

「薬学的に許容可能な担体」は、被験体に投与するための「医薬組成物」を一緒に含む療法剤とともに使用される当該技術分野において慣用の非毒性の固体、半固体又は液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料、製剤補助剤、又は担体を指す。薬学的に許容可能な担体は、使用される投与量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、製剤の他の成分と適合性がある。薬学的に許容可能な担体は、使用される製剤にとって適切である。

【0267】

1つ以上の更なる療法剤と「組み合わせる」の投与には、同時（併用）投与及び任意の順序での連続投与が含まれる。

30

【0268】

「併用して」という用語は、本明細書では、2つ以上の療法剤の投与であって、投与の少なくとも一部が時間的に重複する、又は1つの療法剤の投与が他の療法剤の投与に対して短い期間に含まれる、又は両方の療法剤の治療効果が少なくとも或る期間にわたり重複する、投与を指すために使用される。

【0269】

「連続的に」という用語は、本明細書では、2つ以上の療法剤の投与であって、時間的に重複しない、又は療法剤の治療効果が重複しない、投与を指すために使用される。

40

【0270】

本明細書で使用される場合に、「～と組み合わせる」は、或る治療法の施与に別の治療法を加えることを指す。したがって、「～と組み合わせる」は、或る治療法を、個体に他の治療法を施す前、その間、又はその後には施すことを指す。

【0271】

「添付文書」という用語は、治療製品の市販パッケージに通例含まれる使用説明書であって、そのような治療製品の使用に関する指示、使用法、投与量、投与、併用療法、禁忌及び／又は警告に関する情報を含む、使用説明書を指すために使用される。

【0272】

「製造品」は、少なくとも1つの試薬、例えば、疾患若しくは障害（例えば、癌）の治

50

療用の医薬、又は本明細書に記載されるバイオマーカーを特異的に検出するプローブを含む任意の製造物（例えば、パッケージ又は容器）又はキットである。幾つかの実施形態においては、製造物又はキットは、本明細書に記載される方法を実施するユニットとして宣伝、配送、又は販売される。

### 【0273】

「標識」及び「検出可能な標識」という用語は、例えば、抗体又は抗原に結合されて、特異的結合ペアのメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能にする部分を意味する。特異的結合ペアの標識されたメンバーは、「検出可能に標識された」と称される。したがって、「標識された結合性タンパク質」という用語は、結合性タンパク質の特定をもたらす標識が組み込まれたタンパク質を指す。幾つかの実施形態においては、標識は、視覚的に又は機器的手段により検出可能なシグナルを生成し得る検出可能なマーカー、例えば、放射性標識されたアミノ酸の組み込み又はマーキングされたアビジン（例えば、蛍光マーカー又は光学的方法若しくは比色法により検出され得る酵素活性を含むストレプトアビジン）によって検出され得るピオチニル部のポリペプチドへの結合である。ポリペプチドの標識の例としては、限定されるものではないが、放射性同位体又は放射性核種（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、又は $^{153}\text{Sm}$ ）、色素原、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ピオチニル基、二次レポーターによって認識される予め決められたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、及びガドリニウムキレート等の磁性剤が挙げられる。イムノアッセイに通常使用される標識の代表的な例としては、光を発する部分、例えば、アクリジニウム化合物、及び蛍光を発する部分、例えば、フルオレセインが挙げられる。この点について、その部分自体は検出可能に標識されていない場合もあるが、更に別の部分と反応すると検出可能になり得る。

10

20

### 【0274】

例示的な修飾IL-2含有ポリペプチド

本明細書では、修飾IL-2を含むポリペプチドが提供される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、IL-2受容体に対する修飾IL-2の親和性を野生型IL-2と比較して低下させる少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。様々な実施形態において、本明細書で提供される修飾IL-2を含むポリペプチドは、IL-2Rのアゴニストである。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は修飾ヒトIL-2であり、IL-2RはヒトIL-2Rである。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、IL-2Rに対するヒト野生型IL-2の親和性より少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも50倍、又は少なくとも100倍低い親和性でヒトIL-2Rに結合する。

30

### 【0275】

様々な実施形態において、修飾IL-2を含むポリペプチドは、T細胞又はナチュラルキラー（NK）細胞抗原に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2を含むポリペプチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、又は8つの抗原結合ドメインを含み、ここで、少なくとも1つ又は全てがT細胞又はナチュラルキラー細胞抗原に結合する。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2を含むポリペプチドは、1つ、2つ、3つ、又は4つの抗原結合ドメインを含み、ここで、少なくとも1つ又は全てがT細胞又はナチュラルキラー細胞抗原に結合する。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、抗原結合ドメインの非存在下でIL-2Rに結合しない又はIL-2Rを活性化しない。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、ポリペプチドがIL-2Rと同じ細胞上の抗原に結合する抗原結合ドメインを含む場合のみ細胞上のIL-2Rに結合し、及び/又はIL-2Rを活性化する。

40

### 【0276】

50

様々な実施形態において、修飾 I L - 2 は、L 1 9、Q 2 2、R 3 8、E 6 1、N 8 8、R 1 2 0、T 1 2 3、Q 1 2 6、S 1 2 7、I 1 2 9、及び S 1 3 0 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む。幾つかの実施形態においては、修飾 I L - 2 は、T 3、P 6 5、H 1 6、D 8 4、M 2 3、E 9 5、及び C 1 2 5 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置に少なくとも 1 つの置換を含む。幾つかの実施形態においては、修飾 I L - 2 は、L 1 9、Q 2 2、R 3 8、E 6 1、N 8 8、R 1 2 0、T 1 2 3、Q 1 2 6、S 1 2 7、I 1 2 9、及び S 1 3 0 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸位置、並びにアミノ酸位置 T 3、P 6 5、H 1 6、D 8 4、及び C 1 2 5 に置換を含む。幾つかのそのような実施形態においては、修飾 I L - 2 は、更にアミノ酸位置 M 2 3 及び / 又は E 9 5 に置換を含む。

10

**【 0 2 7 7 】**

幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 L 1 9 での置換は、L 1 9 A、L 1 9 N、L 1 9 P、L 1 9 Q、L 1 9 Y、L 1 9 S、L 1 9 T、及び L 1 9 V から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 Q 2 2 での置換は、Q 2 2 A、Q 2 2 D、Q 2 2 G、Q 2 2 H、Q 2 2 K、Q 2 2 N、Q 2 2 R、Q 2 2 S、Q 2 2 T、Q 2 2 V、及び Q 2 2 Y から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 R 3 8 での置換は、R 3 8 A 又は R 3 8 G である。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 E 6 1 での置換は、E 6 1 A、E 6 1 P、E 6 1 G、E 6 1 H、E 6 1 Q、E 6 1 N、E 6 1 R、E 6 1 S、E 6 1 T、E 6 1 K、及び E 6 1 Y から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 N 8 8 での置換は、N 8 8 A、N 8 8 S、及び N 8 8 T から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 R 1 2 0 での置換は、R 1 2 0 A、R 1 2 0 D、R 1 2 0 G、R 1 2 0 H、R 1 2 0 E、R 1 2 0 F、R 1 2 0 K、R 1 2 0 N、R 1 2 0 P、R 1 2 0 Q、R 1 2 0 S、R 1 2 0 V、及び R 1 2 0 Y から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 T 1 2 3 での置換は、T 1 2 3 D、T 1 2 3 E、T 1 2 3 H、T 1 2 3 K、T 1 2 3 N、T 1 2 3 R、及び T 1 2 3 Q から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 Q 1 2 6 での置換は、Q 1 2 6 A、Q 1 2 6 N、及び Q 1 2 6 Y から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 S 1 2 7 での置換は、S 1 2 7 E、S 1 2 7 D、S 1 2 7 N、S 1 2 7 H、S 1 2 7 P、S 1 2 7 Q、及び S 1 2 7 R から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 I 1 2 9 での置換は、I 1 2 9 A、I 1 2 9 H、I 1 2 9 R、及び I 1 2 9 S から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 S 1 3 0 での置換は、S 1 3 0 D、S 1 3 0 P、S 1 3 0 E、S 1 3 0 K、S 1 3 0 N、S 1 3 0 R、S 1 3 0 H、及び S 1 3 0 Q から選択される。

20

30

**【 0 2 7 8 】**

幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 P 6 5 での置換は、P 6 5 R、P 6 5 E、P 6 5 K、P 6 5 H、P 6 5 Y、P 6 5 Q、P 6 5 D、及び P 6 5 N から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 H 1 6 での置換は、H 1 6 A、H 1 6 N、H 1 6 T、及び H 1 6 V から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 D 8 4 での置換は、D 8 4 S、D 8 4 N、D 8 4 G、D 8 4 A、D 8 4 T、D 8 4 V、及び D 8 4 Y から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 M 2 3 での置換は、M 2 3 A、M 2 3 R、M 2 3 Q、M 2 3 N、M 2 3 L、M 2 3 K、M 2 3 G、M 2 3 E、M 2 3 D、M 2 3 S、M 2 3 T、及び M 2 3 V から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 E 9 5 での置換は、E 9 5 Q、E 9 5 Y、E 9 5 G、E 9 5 T、E 9 5 V、E 9 5 P、E 9 5 H、及び E 9 5 N から選択される。

40

**【 0 2 7 9 】**

幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 T 3 での置換は、T 3 A 及び T 3 G から選択される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸位置 C 1 2 5 での置換は、C 1 2 5 A 及び C 1 2 5 S から選択される。

**【 0 2 8 0 】**

幾つかの実施形態においては、修飾 I L - 2 は、アミノ酸位置 F 4 2 に置換を更に含む

50

。幾つかのそのような実施形態においては、F 4 2での置換は、F 4 2 K、F 4 2 A、F 4 2 R、F 4 2 G、F 4 2 S、及びF 4 2 Tから選択される。

【0 2 8 1】

幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、Y 4 5及びL 7 2から選択される少なくとも1つのアミノ酸位置に少なくとも1つの置換を更に含む。幾つかのそのような実施形態においては、修飾I L - 2は、Y 4 5 R、Y 4 5 K、及びL 7 2 Gから選択される少なくとも1つの置換を含む。

【0 2 8 2】

幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、置換T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 Y、及びC 1 2 5 Sを含む。幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、置換T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 Y、及びC 1 2 5 Sを含み、L 1 9、Q 2 2、R 3 8、E 6 1、N 8 8、R 1 2 0、T 1 2 3、Q 1 2 6、S 1 2 7、I 1 2 9、及びS 1 3 0から選択される少なくとも1つの位置に1つ以上の置換を含む。幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、置換T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 S、及びC 1 2 5 Sを含み、L 1 9、Q 2 2、R 3 8、E 6 1、N 8 8、R 1 2 0、T 1 2 3、Q 1 2 6、S 1 2 7、I 1 2 9、及びS 1 3 0から選択される少なくとも1つの位置に1つ以上の置換を含む。幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、置換T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、及びE 6 1 Rを含む。幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、置換T 3 A、P 6 5 R、H 1 6 A、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、及びE 6 1 Rを含み、L 1 9 N、M 2 3 T、E 9 5 Q、及びS 1 2 7 Dから選択される少なくとも1つの置換を含む。幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、置換：

a) T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、及びC 1 2 5 S、

b) T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、及びC 1 2 5 S、

c) T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、及びC 1 2 5 S、

d) T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、及びC 1 2 5 S、

e) T 3 A、H 1 6 A、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、及びS 1 2 7 D

f) T 3 A、H 1 6 A、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、及びS 1 2 7 D、

g) T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、C 1 2 5 S、及びS 1 2 7 D、又は、

h) T 3 A、H 1 6 A、L 1 9 N、M 2 3 T、E 6 1 R、P 6 5 R、D 8 4 Y、E 9 5 Q、C 1 2 5 S、及びS 1 2 7 D、

を含む。

【0 2 8 3】

本明細書に記載される実施形態のいずれにおいても、修飾I L - 2は、修飾ヒトI L - 2であってもよい。様々な実施形態において、置換のアミノ酸位置は、配列番号1中のアミノ酸位置に対応する。

【0 2 8 4】

幾つかの実施形態においては、修飾I L - 2は、配列番号8 4と少なくとも9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は9 9 %同一のアミノ酸配列を含み、或る特定の配列の表の説明欄に記載される配列番号1 0 5 ~ 配列番号2 7 7から選択されるアミノ酸配列中の置換に対応するアミノ酸置換を含む。対応する置換とは、2つの配列をアラインメントした際に同じアミノ酸を意味する。例えば、配列番号1 0 6は、置換T 3 A、E 6 1 R、P 6 5 R、及びC 1 2 5 Sを含む。配列番号8 4及び配列番号1 0 6をアラインメントした場合、配列番号1 0 6中の位置E 6 1は、配列番号8 4中の順序位置E 5 1に対応する。配列番号1 0 6のT 3は、対応するアミノ酸が存在しないため、配列番号8 4中に対応する位置を有しない。したがって、配列番号1 0 6

の置換に対応する位置に配列番号106の置換を含む配列番号84は、E61R、P65R、及びC125Sに対応する突然変異を含み、配列番号84では、それぞれE51R、P55R、及びC115Sとなり得る。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、配列番号84と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列を含み、配列番号1のL19、Q22、R38、E61、N88、R120、T123、Q126、S127、I129、及びS130から選択される位置に対応する少なくとも1つの位置に置換を含む。

#### 【0285】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含み、それぞれのアミノ酸配列について或る特定の配列の表の説明に指定される置換を含む。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一のアミノ酸配列を含み、L19、Q22、R38、E61、N88、R120、T123、Q126、S127、I129、及びS130から選択される少なくとも1つの位置に置換を含む。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2は、配列番号270～配列番号277から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0286】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、T細胞又はナチュラルキラー細胞抗原に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、1つ、2つ、3つ、又は4つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む。幾つかの実施形態においては、Fc領域は、生理学的条件で修飾IL-2含有ポリペプチドの二量体化を介在し、こうして二量体が形成されることにより、抗原結合部位の数が2倍となる。例えば、3つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、単量体としては三価であるが、生理学的条件では、Fc領域が二量体化を介在することができ、こうして修飾IL-2含有ポリペプチドは、そのような条件下で六価の二量体として存在する。

#### 【0287】

様々な実施形態において、修飾IL-2を含むポリペプチドは、配列番号105～配列番号290から選択される配列を含む。様々な実施形態において、修飾IL-2を含むポリペプチドは、配列番号270～配列番号277から選択される配列を含む。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、抗原結合ドメインを更に含む。幾つかの実施形態においては、抗原結合ドメインはヒト化されている。

#### 【0288】

幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、天然の(natural or native)同種結合相手、Anticalin(操作されたりポカリン)、Darpin、Fynomer、Centyrin(操作されたフィブロネクチンIII型ドメイン)、シスチンノットドメイン、Affilin、Affibody、又は操作されたCH3ドメインである。幾つかの実施形態においては、天然の同種結合相手は、腫瘍関連抗原(TAA)の天然の同種結合相手又はTAAに対する結合活性を示すその変異体のリガンド若しくは細胞外ドメイン、又はその結合フラグメントを含む。

#### 【0289】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2と少なくとも1つの抗原結合ドメインとを含むポリペプチドは、抗腫瘍T細胞応答又はナチュラルキラー細胞応答を増強する一方でTreg、末梢T細胞、及び内皮細胞を回避する。幾つかのそのような実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインが修飾IL-2を活性化T細胞に対して標的化す

る。幾つかの実施形態においては、修飾 I L - 2 は、I L - 2 R が、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインが結合する抗原と同じ細胞上にある場合にのみ I L - 2 R に結合して I L - 2 R を調節する。幾つかの実施形態においては、修飾 I L - 2 は、I L - 2 R が、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインが結合する抗原を発現する細胞とは異なる細胞上にある場合に I L - 2 R に結合しない又は I L - 2 R を活性化しない。

#### 【0290】

様々な実施形態において、抗原結合ドメインは、P D - 1、C T L A - 4、L A G 3、T I M 3、4 - 1 B B、O X 4 0、G I T R、C D 8 a、C D 8 b、C D 4、N K p 3 0、N K G 2 A、T I G I T、T G F R 1、T G F R 2、F a s、N K G 2 D、N K p 4 6、P D - L 1、C D 1 0 7 a、I C O S、T N F R 2、C D 1 6 a 及び T C R から選択されるタンパク質に結合する。幾つかの実施形態においては、修飾 I L - 2 を含むポリペプチドは、ニボルマブ (BMS社; P D - 1)、ペンプロリズマブ (Merck社; P D - 1)、A M P - 5 1 4 (Amplimmune社; P D - 1)、T S R - 0 4 2 (Tesaro/AnaptysBio社、A N B - 0 1 1; P D - 1)、S T I - A 1 1 1 0 (Sorrento Therapeutics社; P D - 1)、イピリムマブ (BMS社; C T L A - 4)、トレメリムマブ (AstraZeneca社、C T L A - 4)、ウレルマブ (BMS、4 - 1 B B)、ウトミルマブ (Pfizer社、4 - 1 B B)、アテゾリズマブ (Roche社、P D - L 1)、デュルバルマブ (AstraZeneca社、P D - L 1)、モナリズマブ (N K G 2 A、Innate Pharma社及びAstraZeneca社)、B M S - 9 8 6 0 1 6 (Bristol-Myers Squibb社、L A G - 3) の抗原結合ドメインを含む。

10

20

#### 【0291】

幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、P D - 1 に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、L A G 3 に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、N K p 4 6 に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、N K G 2 D に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、C D 8 a に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む。

#### 【0292】

幾つかの実施形態においては、抗原結合ドメインはヒト化され得る。ヒト化抗原結合ドメイン (V H H 含有ポリペプチド等) を含むポリペプチドは、治療分子として有用である。それというのも、ヒト化抗原結合ドメイン及びヒト化抗体は、抗体療法薬に対する免疫応答をもたらして療法薬の有効性を低下させ得る非ヒト抗体に対するヒト免疫応答を低減又は排除するからである。一般に、ヒト化抗原結合ドメイン又はヒト化抗体は、C D R (又はその一部) が非ヒト抗体に由来し、F R (又はその一部) がヒト抗体配列に由来する 1 つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗原結合ドメイン又はヒト化抗体はまた、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部を含む。幾つかの実施形態においては、ヒト化抗原結合ドメイン又はヒト化抗体における幾つかの F R 残基は、例えば、抗体の特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体 (例えば、C D R 残基の元となる抗体) からの対応する残基で置換される。

30

40

#### 【0293】

ヒト化抗体及びその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 においてレビューされており、例えば、Riechmann et al., (1988) *Nature* 332:323-329、Queen et al., (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033、米国特許第 5, 821, 337 号、米国特許第 7, 527, 791 号、米国特許第 6, 982, 321 号、及び米国特許第 7, 087, 409 号、Kashmiri et al., (2005) *Methods* 36:25-34、Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (「リサーフェイシング (resurfacing)」を記載している)、Daill'Acqua et al., (2005) *Methods* 36:43-60 (「F R シャッフリング (FR shuffling)」を記載している)、並びに Osbourn et al., (2005) *Methods* 36:61-68 及

50

びKlimka et al., (2000) Br. J. Cancer, 83:252-260 (FRシャッフリングに対する「ガイド選択(guided selection)」アプローチを記載している)で更に記載されている。

【0294】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域としては、限定されるものではないが、「ベストフィット(best-fit)」法を使用して選択されたフレームワーク領域(例えば、Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296を参照されたい)、重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域(例えば、Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285、及びPresta et al. (1993) J. Immunol, 151:2623を参照されたい)、ヒト成熟(体細胞突然変異した)フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系フレームワーク領域(例えば、Almagro and Fransson, (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633を参照されたい)、及びFRライブラリーのスクリーニングから得られるフレームワーク領域(例えば、Baca et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:10678-10684、及びRosok et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618を参照されたい)が挙げられる。典型的には、VHHのFR領域をヒトFR領域と置き換えることで、ヒト化VHHが作製される。幾つかの実施形態においては、ヒトFRの或る特定のFR残基を置き換えることで、ヒト化VHHの1つ以上の特性が改善される。そのような置き換えられた残基を有するVHHドメインも、本明細書では更に「ヒト化」と称される。

10

【0295】

様々な実施形態において、修飾IL-2含有ポリペプチドに含まれるFc領域は、ヒトFc領域であるか、又はヒトFc領域に由来する。

20

【0296】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドに含まれるFc領域は、ヒトFc領域に由来し、IgG1 E233、L234、及びL235に対応する3つのアミノ酸欠失を下部ヒンジに含み、本明細書で「Fc x ELL」と称される。Fc x ELLポリペプチドはFc Rと結合しないため、「エフェクターサイレント」又は「エフェクターナル」と称されるが、幾つかの実施形態においては、x ELL Fc領域はFc Rnに結合するため、半減期の延長及びFc Rn媒介性リサイクリング(FcRn mediated recycling)と関連したトランスサイトーシスを伴う。

30

【0297】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドに含まれるFc領域は、ヒトFc領域に由来し、突然変異M252Y及びM428Vを含み、本明細書で「Fc-YV」と称される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドに含まれるFc領域は、ヒトFc領域に由来し、突然変異M252Y及びM428Lを含み、本明細書で「Fc-YL」と称される。幾つかの実施形態においては、そのような突然変異は、エンドソームの酸性pH(6.5近く)でFc Rnへの結合を増強するのに対し、中性pH(約7.2)では検出可能な結合が失われることから、Fc Rn媒介性リサイクリングの増強及び半減期の延長が可能となる。

【0298】

幾つかの実施形態においては、本明細書で修飾IL-2含有ポリペプチドに含まれるFc領域は、ヒトFc領域に由来し、ヘテロ二量体化のために設計された突然変異を含み、本明細書において「ノブ」及び「ホール」と称される。幾つかの実施形態においては、「ノブ」Fc領域は、突然変異T366Wを含む。幾つかの実施形態においては、「ホール」Fc領域は、突然変異T366S、L368A、及びY407Vを含む。幾つかの実施形態においては、ヘテロ二量体化に使用されるFc領域は、ヘテロ二量体Fcペアの第1のメンバー上の突然変異S354C等の追加の突然変異を含み、この突然変異は、ヘテロ二量体Fcペアの第2のメンバー上の対応する突然変異Y349Cと非対称ジスルフィドを形成する。幾つかの実施形態においては、ヘテロ二量体Fcペアの一方のメンバーは、修飾H435R又はH435Kを含むことで、Fc Rn結合を維持しつつプロテインAの

40

50

結合を妨げる。幾つかの実施形態においては、ヘテロ二量体Fcペアの一方のメンバーは、修飾H435R又はH435Kを含むのに対して、ヘテロ二量体Fcペアの第2のメンバーは、H435で修飾されていない。様々な実施形態において、ホールFc領域は、修飾H435R又はH435Kを含むが（修飾がH435Rである場合に、場合によっては「ホール-R」と称される）、ノブFc領域はそれを含まない。幾つかの場合には、ホール-R突然変異は、存在し得るホモ二量体ホールFc領域に対するヘテロ二量体の精製を改善する。

#### 【0299】

修飾IL-2含有ポリペプチドで使用され得る非限定的な例示的なFc領域としては、配列番号47～配列番号83、配列番号292及び配列番号293のアミノ酸配列を含むFc領域が挙げられる。

10

#### 【0300】

幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と、そのアミノ酸配列のC末端に融合されたFc領域とを含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、配列番号270～配列番号277から選択されるアミノ酸配列と、そのアミノ酸配列のC末端に融合されたFc領域とを含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と、そのアミノ酸配列のN末端に融合されたFc領域とを含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、配列番号270～配列番号277から選択されるアミノ酸配列と、そのアミノ酸配列のN末端に融合されたFc領域とを含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と、配列番号47～配列番号83、配列番号292、及び配列番号293から選択されるアミノ酸配列とを含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と、配列番号48、配列番号64、配列番号292、及び配列番号293から選択されるアミノ酸配列とを含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも1つの抗原結合ドメインとFc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドは、配列番号270～配列番号277から選択されるアミノ酸配列と、配列番号48、配列番号64、配列番号292、及び配列番号293から選択されるアミノ酸配列とを含む。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号105～配列番号290から選択されるアミノ酸配列と、T細胞又はナチュラルキラー細胞上で発現される抗原に結合する抗原結合ドメインとを含む。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、配列番号270～配列番号277から選択されるアミノ酸配列と、T細胞又はナチュラルキラー細胞上で発現される抗原に結合する抗原結合ドメインとを含む。

20

30

#### 【0301】

修飾IL-2含有ポリペプチドの例示的な活性

40

様々な実施形態において、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、IL-2R活性のアゴニストである。アゴニスト活性は、幾つかの実施形態においては、本明細書の実施例に示される方法を使用して、例えば293F細胞又は同様の細胞を使用して決定され得る。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、T細胞に標的化される場合にIL-2R活性のアゴニストであるが、標的化の非存在下でアゴニスト活性を殆ど又は全く示さない。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、NK細胞及び/又はT細胞に標的化される場合にIL-2R活性のアゴニストであるが、標的化の非存在下でアゴニスト活性を殆ど又は全く示さない。幾つかの実施形態においては、T細胞又はNK細胞を標的とする修飾IL-2含有ポリペプチドは、T細胞又はNK細胞上で発現される抗原に特

50

異的に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。

【0302】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*及び/又は*in vivo*でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を増加させる。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、Treg細胞の存在下でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を増加させる。幾つかのそのような実施形態においては、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞は、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞である。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*で活性化CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を増加させる。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を、ポリペプチドの非存在下でのCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖と比べて少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍増加させる。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍増加させ、休止CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を、ポリペプチドの非存在下で観察される増殖と比べて実質的に増加させない。

10

【0303】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*及び/又は*in vivo*でNK細胞の増殖を増加させる。幾つかのそのような実施形態においては、NK細胞は活性化NK細胞である。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*で活性化NK細胞の増殖を増加させる。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、活性化NK細胞の増殖を、ポリペプチドの非存在下でのNK細胞増殖と比べて少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍増加させる。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、活性化NK細胞の増殖を少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍増加させ、休止NK細胞の増殖を、ポリペプチドの非存在下で観察される増殖と比べて実質的に増加させない。

20

【0304】

活性化CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖の増加は、例えば、本明細書の実施例に示される方法等の当該技術分野における任意の方法によって決定され得る。非限定的な例示的なアッセイは以下の通りである。CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞を1人以上の健康なヒトドナーから分離することができる。T細胞は、CellTrace Violet (CTV)で染色し、抗CD3抗体で活性化し、修飾IL-2含有ポリペプチドと接触させた後に、FACSで分析する。CTV染色の喪失は増殖を示す。幾つかの実施形態においては、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖の増加は、例えば、異なる健康なヒトドナーから分離されたCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を測定することによって、一連の実験又はプールされたT細胞からの平均として決定される。幾つかの実施形態においては、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖の増加は、少なくとも5人若しくは少なくとも10人の異なる健康なドナーからのT細胞を使用して実施される実験からの、又は少なくとも5人若しくは少なくとも10人の異なる健康なドナーからのT細胞のプールからの平均として決定される。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、Treg細胞の存在下でさえもCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を増加させる。

30

40

【0305】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*及び/又は*in vivo*でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を増加させる。CD71発現はT細胞の活性化を示している。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in*

50

*in vitro*でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を増加させる。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を、ポリペプチドの非存在下でのCD71発現と比べて少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍増加させる。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍増加させ、休止CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を、ポリペプチドの非存在下で観察されるCD71発現と比べて実質的に増加させない。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、Treg細胞の存在下でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を増加させる。

10

## 【0306】

CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現の増加は、例えば、本明細書の実施例に示される方法等の当該技術分野における任意の方法によって決定され得る。非限定的な例示的なアッセイは以下の通りである。CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞を、1人以上の健康なヒトドナーから分離し、抗CD3抗体で刺激し、修飾IL-2含有ポリペプチドと接触させた後に、FACSによってCD71発現について分析することができる。幾つかの実施形態においては、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現の増加は、例えば、異なる健康なヒトドナーから分離されたCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を測定することによって、一連の実験又はプールされたT細胞からの平均として決定される。幾つかの実施形態においては、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現の増加は、少なくとも5人若しくは少なくとも10人の異なる健康なドナーからのT細胞を使用して実施される実験からの、又は少なくとも5人若しくは少なくとも10人の異なる健康なドナーからのT細胞のプールからの平均として決定される。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、Treg細胞の存在下でさえもCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのCD71発現を増加させる。

20

## 【0307】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*及び/又は*in vivo*でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞におけるpSTAT5発現を増加させる。pSTAT5発現はT細胞の活性化を示している。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞におけるpSTAT5発現を増加させる。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのpSTAT5発現を、ポリペプチドの非存在下でのpSTAT5発現と比べて少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍増加させる。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、Treg細胞の存在下でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのpSTAT5発現を増加させる。CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞におけるpSTAT5発現の増加は、例えば、本明細書の実施例に示される方法等の当該技術分野における任意の方法によって決定され得る。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、Treg細胞の存在下でさえもCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞におけるpSTAT5発現を増加させる。

30

40

## 【0308】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*及び/又は*in vivo*でNK細胞におけるpSTAT5発現を増加させる。pSTAT5発現はNK細胞の活性化を示している。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、*in vitro*でNK細胞におけるpSTAT5発現を増加させる。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、NK細胞上でのpSTAT5発現を、ポリペプチドの非存在下でのpSTAT5発現と比べて少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、又

50

は少なくとも5倍増加させる。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、Treg細胞の存在下でNK細胞におけるpSTAT5発現を増加させる。NK細胞におけるpSTAT5発現の増加は、例えば、本明細書の実施例に示される方法等の当該技術分野における任意の方法によって決定され得る。

#### 【0309】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、制御性T細胞(Treg)の抑制活性を低減又は減弱させる。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞に対するTreg抑制活性を、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、又は少なくとも50%低減させる。慣例的なCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞上でのTreg抑制活性の減少は、例えば、本明細書の実施例に示される方法等の当該技術分野における任意の方法によって決定され得る。非限定的な例示的なアッセイは以下の通りである。Treg及びCD4<sup>+</sup>T細胞を、健康なヒトドナーPBMCから分離した後に、増殖性細胞用蛍光色素で異なる様式で標識する。CD4<sup>+</sup>T細胞を抗CD3抗体で刺激し、一方で、Treg細胞を本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドの存在下でインキュベートする。2つのT細胞集団を3日間共培養し、CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖及び活性化をフローサイトメトリーでモニターする。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、例えば、Treg細胞の存在下であるが本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドの非存在下でのCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の活性化及び増殖と比較して、Treg細胞の存在下でCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の活性化及び増殖を増加させる。

10

20

#### 【0310】

ポリペプチドの発現及び産生

修飾IL-2含有結合性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子が提供される。したがって、様々な実施形態において、修飾IL-2を含むポリペプチドをコードする核酸分子が提供される。幾つかの実施形態においては、核酸分子は、修飾IL-2及び少なくとも1つの抗原結合ドメインをコードする。様々な実施形態において、核酸分子は、修飾IL-2と、Fc領域と、任意に少なくとも1つの抗原結合ドメインとをコードする。幾つかの実施形態においては、Fc領域は、「ノブ」又は「ホール」突然変異等のヘテロ二量体化のために設計された突然変異を含む。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2と、少なくとも1つの抗原結合ドメインと、Fc領域とを含む修飾IL-2含有ポリペプチドをコードする核酸分子が提供され、ここで、Fc領域は少なくとも1つの抗原結合ドメインのC末端に融合され、修飾IL-2はFc領域のC末端に融合される。上述の実施形態のいずれかにおいて、核酸分子はまた、修飾IL-2含有ポリペプチドの分泌を指示するリーダー配列もコードすることができ、そのリーダー配列は、典型的には、これが分泌されたポリペプチド中に存在しないように切断される。リーダー配列は、天然の重鎖(又はVHH)リーダー配列であり得る、又は別の異種リーダー配列であり得る。

30

#### 【0311】

核酸分子は、当該技術分野で慣用の組換えDNA技術を使用して構築され得る。幾つかの実施形態においては、核酸分子は、選択された宿主細胞における発現に適した発現ベクターである。

40

#### 【0312】

本明細書に記載される修飾IL-2含有ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターが提供される。そのようなベクターとしては、限定されるものではないが、DNAベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が挙げられる。幾つかの実施形態においては、293F細胞、CHO細胞若しくはCHO由来細胞等の所望の細胞型、又はNSO細胞におけるポリペプチドの発現のために最適化されたベクターが選択される。例示的なそのようなベクターは、例えば、Running Deer et al., *Biotecnol. Prog.* 20:880-889 (2004)に記載されている。

50

## 【0313】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、細菌細胞等の原核細胞において、又は真菌細胞（酵母等）、植物細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞等の真核細胞において発現され得る。そのような発現は、例えば、当該技術分野で既知の手順に従って実施され得る。ポリペプチドの発現に使用され得る例示的な真核細胞としては、限定されるものではないが、COS7細胞を含むCOS細胞、293F細胞を含む293細胞、CHO-S、DG44、Lec13 CHO細胞及びFUT8 CHO細胞を含むCHO細胞、PER.C6（商標）細胞（Crucell社）、並びにNSO細胞が挙げられる。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、酵母において発現され得る。例えば、米国特許出願公開第2006/0270045号を参照されたい。幾つかの実施形態においては、特定の真核宿主細胞は、ポリペプチドに対して所望の翻訳後修飾を行うその能力に基づいて選択される。例えば、幾つかの実施形態においては、CHO細胞は、293F細胞で産生される同じポリペプチドよりも高レベルのシアリル化を有するポリペプチドを産生する。

10

## 【0314】

所望の宿主細胞への1つ以上の核酸（ベクター等）の導入は、限定されるものではないが、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染等を含むあらゆる方法によって達成され得る。非限定的な例示的な方法は、例えばSambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。核酸は、任意の適切な方法に従って、所望の宿主細胞に一過的又は安定的にトランスフェクションされ得る。

20

## 【0315】

本明細書に記載される核酸又はベクターのいずれかを含む宿主細胞も提供される。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される修飾IL-2含有ポリペプチドを発現する宿主細胞が提供される。宿主細胞で発現された修飾IL-2含有ポリペプチドは、任意の適切な方法によって精製され得る。そのような方法としては、限定されるものではないが、親和性マトリックス又は疎水性相互作用クロマトグラフィーの使用が挙げられる。適切なアフィニティリガンドとしては、ROR1 ECD及びFc領域に結合する作用物質が挙げられる。例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、又は抗体アフィニティカラムを使用して、Fc領域に結合することで、Fc領域を含む修飾IL-2含有ポリペプチドを精製することができる。疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えば、ブチルカラム又はフェニルカラムもまた、抗体等の幾つかのポリペプチドを精製するのに適切であり得る。イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー及び/又は陽イオン交換クロマトグラフィー）もまた、抗体等の幾つかのポリペプチドを精製するのに適切であり得る。混合モードクロマトグラフィー（例えば、逆相/陰イオン交換、逆相/陽イオン交換、親水性相互作用/陰イオン交換、親水性相互作用/陽イオン交換等）も、抗体等の幾つかのポリペプチドを精製するのに適切であり得る。ポリペプチドを精製する多くの方法が当該技術分野で知られている。

30

## 【0316】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、無細胞系において産生される。非限定的な例示的な無細胞系は、例えば、Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009)、Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004)、Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)に記載されている。

40

## 【0317】

幾つかの実施形態においては、上記の方法によって作製された修飾IL-2含有ポリペプチドが提供される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、宿主細胞において作製される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは、無細胞系において作製される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドは精製される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチ

50

ドを含む細胞培養培地が提供される。

【0318】

幾つかの実施形態においては、上記の方法によって作製された抗体を含む組成物が提供される。幾つかの実施形態においては、該組成物は、宿主細胞において作製された修飾IL-2含有ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態においては、該組成物は、無細胞系において作製された修飾IL-2含有ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態においては、該組成物は、精製された修飾IL-2含有ポリペプチドを含む。

【0319】

修飾IL-2含有ポリペプチドを使用して疾患を治療する例示的な方法

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドを投与することを含む、  
 10  
 個体における疾患を治療する方法が提供される。このような疾患としては、CD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖及び活性化の増加から恩恵を受けるあらゆる疾患が挙げられる。幾つかの実施形態においては、個体における癌を治療する方法が提供される。該方法は、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドを有効量、個体に投与することを含む。そのような治療方法は、ヒト又は動物における治療方法であり得る。幾つかの実施形態においては、ヒトを治療する方法が提供される。本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドを使用して治療することができる非限定的な例示的な癌としては、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、  
 20  
 絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、胃腸癌、膠芽腫、肝癌、肝細胞癌、上皮内新生物、腎臓癌又は腎癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃部癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮又は子宮内膜癌、泌尿器系癌、並びに外陰癌、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球(SL)NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非分割細胞NHL、巨大病変NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、慢性リンパ球性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、有毛細胞白血病、並びに慢性骨髄芽球性白血病が挙げられる。  
 30

【0320】

修飾IL-2含有ポリペプチドは、必要に応じて被験体に投与され得る。投与の頻度の決定は、治療される病態、治療される被験体の年齢、治療される病態の重症度、治療される被験体の全般的健康状態等の考慮に基づいて、主治医等の当業者によって行われ得る。幾つかの実施形態においては、有効用量の修飾IL-2含有ポリペプチドが被験体に1回以上投与される。幾つかの実施形態においては、有効用量の修飾IL-2含有ポリペプチドが、被験体に毎日、週に2回、毎週、2週間ごとに、月に1回等で投与される。有効用量の修飾IL-2含有ポリペプチドが被験体に少なくとも1回投与される。幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドの有効用量は、少なくとも1ヶ月、少なくとも6ヶ月、又は少なくとも1年間にわたる複数回を含む複数回で投与され得る。  
 40

【0321】

幾つかの実施形態においては、修飾IL-2含有ポリペプチドを含む医薬組成物は、癌を治療する(癌の予防を含む)及び/又はT細胞増殖を増加させるのに有効な量で投与される。治療有効量は、典型的には、治療される被験体の体重、その被験体の身体的状態若しくは健康状態、治療される病態の広範さ、又は治療される被験体の年齢に依存する。一般に、ポリペプチドは、用量当たり約0.05mg/kg(体重)~約100mg/kg(体重)の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、用量当たり約10µg/kg(体重)~約100mg/kg(体重)の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、用量当たり約50µg/kg(体重)~約5mg/kg(体重)の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においてはは  
 50

、ポリペプチドは、用量当たり約  $100 \mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) ~ 約  $10 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、用量当たり約  $100 \mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) ~ 約  $20 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、用量当たり約  $0.5 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) ~ 約  $20 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、用量当たり約  $0.05 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) ~ 約  $20 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、用量当たり約  $0.05 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) ~ 約  $10 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、約  $5 \text{mg} / \text{kg}$  (体重) 以下、例えば、 $4 \text{mg} / \text{kg}$  未満、 $3 \text{mg} / \text{kg}$  未満、 $2 \text{mg} / \text{kg}$  未満、又は  $1 \text{mg} / \text{kg}$  未満の範囲の抗体の量で投与され得る。 10

#### 【0322】

幾つかの実施形態においては、修飾 IL - 2 含有ポリペプチドは、限定されるものではないが、静脈内、動脈内、非経口、腹腔内、又は皮下を含む様々な経路によって *in vivo* で投与され得る。意図される用途に応じて、適切な製剤及び投与経路を選択することができる。

#### 【0323】

幾つかの実施形態においては、修飾 IL - 2 含有ポリペプチドを使用する治療的処置は、T細胞の増殖及び/又は活性化を増加させることによって達成される。幾つかの実施形態においては、T細胞の増殖及び/又は活性化の増加は、癌の成長を抑制する。 20

#### 【0324】

##### 医薬組成物

幾つかの実施形態においては、修飾 IL - 2 含有ポリペプチドを含む組成物は、多種多様な薬学的に許容可能な担体を含む製剤で提供される (例えば、Gennaro, Remington : The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003)、Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7<sup>th</sup> ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)、Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> ed., Pharmaceutical Press (2000) を参照されたい)。賦形剤、アジュバント、及び希釈剤を含む様々な薬学的に許容可能な担体が利用可能である。さらに、pH調整剤及び緩衝剤、張性調整剤、安定剤、湿潤剤等の様々な薬学的に許容可能な補助物質も利用可能である。非限定的な例示的な担体としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及びそれらの組合せが挙げられる。 30

#### 【0325】

幾つかの実施形態においては、医薬組成物は、少なくとも  $10 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $20 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $30 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $40 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $50 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $60 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $70 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $80 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $90 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $100 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $125 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $150 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $175 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $200 \text{mg} / \text{mL}$ 、 $225 \text{mg} / \text{mL}$ 、又は  $250 \text{mg} / \text{mL}$  の濃度で修飾 IL - 2 含有ポリペプチドを含む。 40

#### 【0326】

##### 併用療法

修飾 IL - 2 含有ポリペプチドは、単独で又は他の抗癌剤等の他の治療方式と組み合わせて投与され得る。修飾 IL - 2 含有ポリペプチドは、他の治療方式の前、実質的にそれと同時に、又はその後供給され得る (すなわち、同時に又は連続的に)。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される治療方法は、放射線療法、化学療法、ワクチン接種、標的腫瘍療法、CAR - T療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、癌免疫療法、サイトカイン療法、外科的切除、クロマチン修飾、切除、冷却療法、腫瘍標的に対するアンチセンス剤、腫瘍標的に対する siRNA 剤、腫瘍標的に対するマイクロRNA 剤若しくは抗癌剤 / 抗腫瘍剤、又は抗体、サイトカイン若しくは受容体細胞外ドメイン - Fc 融合物等の生 50

物製剤を施すことを更に含み得る。

【0327】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、第2の療法剤、例えば、PD-1抗体と同時に与えられる。PD-1抗体の例としては、ニボルマブ(BMS社)、ペンブロリズマブ(Merck社)、AMP-514(AMPLIMUNE社)、TSR-042(Tesaro/AnaptysBio社、ANB-011)、STI-A1110(Sorrento Therapeutics社)、及びプログラム死-1(PD-1)に対する他の作用物質が挙げられる。

【0328】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、第2の療法剤、例えば、PD-L1療法薬と同時に与えられる。PD-L1療法薬の例としては、ピディリズマブ(CureTech社、CT-011)、デュルバルマブ(Medimune/AstraZeneca社)、アテゾリズマブ(Genentech/Roche社)、アベルマブ(Pfizer社)、AMP-224(AMPLIMUNE社)、BMS-936559(Bristol-Myers Squibb社)、STI-A1010(Sorrento Therapeutics社)、及びプログラム死-1リガンド(PD-L1)に対する他の作用物質が挙げられる。

【0329】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供される修飾IL-2含有ポリペプチドは、CAR-T(キメラ抗原受容体T細胞)療法薬、腫瘍溶解性ウイルス療法薬、サイトカイン療法薬、及び/又はVISTA、gpNMB、B7H3、B7H4、HHLA2、CD73、CTLA4、TIGIT等の他のチェックポイント分子を標的とする作用物質と同時に与えられる。

【0330】

診断及び治療の非限定的な例示的な方法

幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法は、被験体及び/又は被験体(例えば、癌患者)からの検体を評価するのに有用である。幾つかの実施形態においては、評価は、診断、予後診断、及び/又は治療への奏効のうちの一つ以上である。

【0331】

幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法は、タンパク質の存在、非存在、又はレベルを評価することを含む。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法は、核酸の存在、非存在、又は発現のレベルを評価することを含む。これらの測定に本明細書に記載される組成物を使用することができる。例えば、幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法は、腫瘍の検体又は腫瘍から培養された細胞を、本明細書に記載される療法剤と接触させることを含む。

【0332】

幾つかの実施形態においては、評価により、治療(本明細書に記載されるポリペプチドによる治療を含む)が指示され得る。幾つかの実施形態においては、評価により、切除後の補助療法を使用する又は差し控えることが指示され得る。補助治療とも呼ばれる補助療法は、一次治療、主治療、又は初回治療に加えてなされる治療である。非限定的な例として、補助療法は、全ての検出可能な疾患が取り除かれたが、潜在疾患のため再燃の統計的リスクが残っている場合に、通常は手術後になされる追加の治療であり得る。幾つかの実施形態においては、上記ポリペプチドは、癌の治療における補助療法薬として使用される。幾つかの実施形態においては、上記抗体は、癌の治療における単独補助療法薬として使用される。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される抗体は、癌の治療における補助療法薬としては差し控えられる。例えば、患者が本明細書に記載される抗体に应答する可能性が低い又は最小限の应答しか有しない場合に、生活の質のために、及び無効な化学療法による不必要な毒性を避けるために、治療を施さなくてもよい。このような場合に、緩和ケアが使用される場合がある。

【0333】

幾つかの実施形態においては、切除前に術前補助療法薬として上記ポリペプチドが投与

される。幾つかの実施形態においては、術前補助療法薬は、任意の手術の前に腫瘍を縮小及び/又はダウングレードする療法薬を指す。幾つかの実施形態においては、術前補助療法薬は、手術前に癌患者に投与される化学療法薬を意味する。幾つかの実施形態においては、術前補助療法薬は、手術前に癌患者に投与されるポリペプチドを意味する。術前補助化学療法薬が通常考慮される癌型としては、例えば、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱癌、及び肺癌が挙げられる。幾つかの実施形態においては、上記抗体は、癌の治療における術前補助療法薬として使用される。幾つかの実施形態においては、その使用は切除前である。

#### 【0334】

幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法で企図される腫瘍微小環境は、腫瘍血管系、腫瘍浸潤リンパ球、線維芽細胞、内皮前駆細胞（EPC）、癌関連線維芽細胞、周皮細胞、他の間質細胞、細胞外マトリックス（ECM）の成分、樹状細胞、抗原提示細胞、T細胞、制御性T細胞、マクロファージ、好中球、及び腫瘍の近位に位置する他の免疫細胞の1つ以上である。

10

#### 【0335】

キット

本明細書に記載される修飾IL-2含有ポリペプチドのいずれか及び適切な包装を含む製造品及びキットも提供される。幾つかの実施形態においては、本発明は、(i)修飾IL-2含有ポリペプチドと、(ii)該キットを使用して修飾IL-2含有ポリペプチドを個体に投与するための使用説明書とを備えるキットを含む。

20

#### 【0336】

本明細書に記載される組成物に適切な包装は、当該技術分野で知られており、例えば、バイアル（例えば、密封バイアル）、容器、アンプル、ボトル、広口瓶、フレキシブルな包装（例えば、密封マイラー又はプラスチックバッグ）等が含まれる。これらの製造品は、更に滅菌及び/又は密封され得る。本明細書に記載される組成物を含む単位剤形も提供される。これらの単位剤形は、単回又は多回単位剤形で適切な包装内で保存され得て、更に滅菌及び密封もされ得る。本発明のキットに提供される使用説明書は、典型的には、ラベル又は添付文書（例えば、キットに含まれる紙シート）に書かれた指示であるが、機械可読の指示（例えば、磁気記憶ディスク又は光学記憶ディスクに保持された指示）も許容可能である。抗体の使用に関する使用説明書は一般に、意図された治療又は工業的使用のための投与量、投与スケジュール、及び投与経路に関する情報を含む。キットは、個々の適切な治療を選択することの説明を更に含み得る。

30

#### 【0337】

容器は、単位用量、バルク包装（例えば、多回用量包装）又はサブユニット用量であり得る。例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月以上のいずれかの概数の期間等の長期間にわたって個体に効果的な治療をもたらすのに十分な用量の本明細書に開示される分子を含むキットも提供され得る。キットはまた、多回単位用量の分子及び使用説明書を含むことができ、薬局、例えば、病院薬局及び調剤薬局での保存及び使用に十分な量で包装され得る。幾つかの実施形態においては、キットは、再構成、再懸濁、又は再水和することで、一般的にポリペプチドの安定な水性懸濁液を形成することができる乾燥（例えば、凍結乾燥）組成物を含む。

40

#### 【実施例】

#### 【0338】

以下で論じられる実施例は、本発明を純粹に例示することが意図され、決して本発明を限定するとみなされるべきではない。これらの実施例は、以下の実験が、実施された全て又は唯一の実験であることを表すとは意図されない。使用される数値（例えば、量、温度等）に関して正確さを保証するための努力がなされたが、幾らかの実験誤差及び偏差が考慮に入れられるべきである。特段の指示がない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧であるか又は近大気圧である。

50

## 【0339】

実施例1：IL-2のP65R突然変異は、CD25結合を本質的に排除する

IL-2突然変異体を、立体閉塞(steric occlusion)によってCD25界面を破壊するように設計し(P65R及びP65E)、IL-2受容体の1つ以上の成分(CD25、CD122、及び/又はCD132)を一過的にトランスフェクションした293F細胞に対する結合について試験した。突然変異体を、CD25に対する親和性が低下していることが報告された突然変異体であるIL-2-F42Kと比較した。「ノブ」FcのN末端に融合され、「ホール」Fc(配列番号44)と複合された野生型ヒトIL-2(配列番号32)、IL-2-F42K(配列番号33)、IL-2-P65R(配列番号35)、又はIL-2-P65E(配列番号34)を含む漸増濃度の融合タンパク質を、トランスフェクションされた293F細胞に添加し、4で45分間インキュベートした。

10

## 【0340】

結合を、実質的に以下のようにフローサイトメトリーによって分析した。細胞を200µLのFACSバッファー(PBS、2%FBS、0.05%アジ化ナトリウム)中で1回洗浄し、細胞ペレットを100µLの表面マーカー染色溶液(FACSバッファー中に1:300の希釈率でA647結合抗ヒトFcγ2抗体を含有する)中に再懸濁した。細胞を4で45分間インキュベートした後に、最終洗浄し、フローサイトメーターで分析した。細胞デブリをFSC/SSCでのサイズ排除によって除外し、死細胞をそれらのヨウ化プロビジウムの陽性シグナルに基づいて除外した。FSC-A/FSC-Hでのダブレット及び凝集物の除外を使用して単一細胞を選択した。一過的にトランスフェクションされた細胞も細胞質EGFPを発現し、FL1陽性であった細胞を分析した。抗ヒト二次抗体のMFIレベルの増加は、IL-2結合を示していた。細胞集団の分析にFlowJoソフトウェアを使用した。次いで、各マーカーについての生の平均蛍光強度(「MFI」)をエクスポートし、Excel及びGraphPad PRISMを使用して分析した。値をグラフ化し、力価測定曲線をフィッティングさせて、非線形回帰One-site - Total曲線フィットを使用して用量反応関係を評価した。

20

## 【0341】

図2A~図2Cに示されるように、IL-2-P65E変異体を含む融合タンパク質は、野生型IL-2を含む融合タンパク質と比べて僅かに低下したIL-2Rに対する親和性を示した。IL-2-F42Kを含む融合タンパク質は、IL-2-P65Eを含む融合タンパク質よりも低い親和性を示したが、IL-2-P65Rを含む融合タンパク質は、ヘテロ三量体IL-2Rに対して最も低い親和性を示した(図2A)。さらに、IL-2-P65Rを含む融合タンパク質は、CD25/CD132に対して検出可能な結合を示さず、CD25/CD122に弱くしか結合しなかったが(図2C)、IL-2-F42Kを含む融合タンパク質は、CD25/CD132に対して幾らかの親和性を保持し(図2B)、IL-2-P65Rを含む融合タンパク質よりも高い親和性でCD25/CD122に結合した(図2B及び図2C)。したがって、P65Rで突然変異したIL-2は、CD25含有IL-2受容体に対する結合が顕著に低下していた。

30

## 【0342】

実施例2：CD122に対する親和性を低下させるIL-2修飾

実施例1で述べたように、P65R IL-2突然変異は、立体閉塞によってCD25界面を破壊するように設計された。加えて、IL-2突然変異を、或る特定の接触残基相互作用の排除によってCD122界面に対する親和性を低下させるように設計した(例えば、D84S、E95Q、M23A、H16A、及びE15S)。単一又は二重突然変異体を、IL-2Rに対する一価IL-2結合のためにヘテロ二量体Fc(ジスルフィドにより「ホール」Fc配列番号44を含むホールにノブを安定化させた)の「ノブ」部分のN末端に融合させた。相対結合親和性を、293F細胞にCD25及びCD122を一過的にトランスフェクションすることによって評価した(CD132との同時トランスフェクションは、同様の結果を示したが、付加的な結合アビディティにより観察される親和

40

50

性の差が減少した)。結合した I L - 2 - F c 融合タンパク質を、実施例 1 に実質的に記載されるように蛍光抗ヒト二次抗体で検出し、フローサイトメトリーによって分析した。

【 0 3 4 3 】

図 3 A 及び図 3 B に示されるように、C D 1 2 2 界面に突然変異を有する F 4 2 K を組み込んだ二重 I L - 2 突然変異体を含む融合タンパク質 ( 配列番号 3 6 ~ 配列番号 3 9 ) は全て、I L - 2 - F 4 2 K - E 1 5 S ( 配列番号 8 5 ) を除き、単一突然変異体 I L - 2 - F 4 2 K ( 配列番号 3 3 ) を含むものと比べて、C D 2 5 / C D 1 2 2 に対する結合親和性の低下を示した。

【 0 3 4 4 】

実施例 3 : I L - 2 - R A S ( P 6 5 R、H 1 6 A、及び D 8 4 S ) は、三量体及び二量体形態の I L - 2 R の状況で C D 1 2 2 に対する親和性が低下した

実施例 2 に記載の C D 1 2 2 親和性を低下させる突然変異を P 6 5 R 突然変異と組み合わせ、I L - 2 二重及び三重突然変異体を構築した。I L - 2 突然変異体を、I L - 2 受容体 ( I L - 2 R ) に対する一価 I L - 2 結合のためにヘテロ二量体 F c 「ノブ」部分の N 末端に融合させ、配列番号 4 4 を含む「ホール」F c と対合させた。得られる融合タンパク質の相対結合親和性を、実施例 1 に実質的に記載されるように、I L - 2 R サブユニットを一過的にトランスフェクションした 2 9 3 F 細胞において評価した。

【 0 3 4 5 】

野生型 I L - 2 ( 配列番号 3 2 ) を含む融合タンパク質と比べて、I L - 2 - P 6 5 R - H 1 6 A ( 配列番号 4 1 ) を含む融合タンパク質及び I L - 2 - P 6 5 R - D 8 4 S ( 配列番号 4 2 ) を含む融合タンパク質は、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 ( ヘテロ二量体 I L - 2 R ) ( 図 4 A ) 及びヘテロ三量体 I L - 2 R ( 図 4 B ) の両方に対する親和性が低下したが、三重突然変異体 I L - 2 P 6 5 R - H 1 6 A - D 8 4 S ( 「 I L - 2 - R A S 」、配列番号 4 3 ) を含む融合タンパク質の親和性は、更に一層減弱した ( 図 4 A 及び図 4 B ) 。最大結合及び E C <sub>50</sub> の両方においてこれらの I L - 2 突然変異体について観察された結合のシフトは、これらの突然変異がオンレート ( E C <sub>50</sub> の右へのシフト ) 及びオフレート ( 最大結合の低下 ) を低下させたことを示唆している。

【 0 3 4 6 】

実施例 4 . I L - 2 - R A S は、休止 T 細胞及び活性化前 T 細胞に対する親和性が低下した

T 細胞を単離するために、非 T 細胞集団を、C D 1 4、C D 1 6、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 6、C D 5 6、C D 1 2 3、T C R / に対するビオチン化された抗系譜マーカー抗体 ( BioLegend 社 ) で室温にて 2 0 分間標識した。次いで、磁性ストレプトアビジン粒子と一緒に室温で 2 0 分間インキュベートすることにより、非 T 細胞集団を減少させた ( 5 0 0 μ l のビーズスラリーに加えて 1 0 0 × 1 0 <sup>6</sup> 個当たり 5 0 0 μ l の細胞懸濁液、マグネット上で 2 × 8 分間インキュベートする ) 。非結合細胞の上清は単離した T 細胞を含んでいた。

【 0 3 4 7 】

一部の単離 T 細胞 ( 3 m L 中 5 . 5 × 1 0 <sup>6</sup> 個 ) を、1 μ g / m l 抗 C D 3 O K T 3 抗体 ( BD Biosciences 社 ) でプレコートした 6 ウェルプレートにおいて 2 日間インキュベートすることによって活性化した後、P B S / 2 % F B S で洗浄し、R P M I + 1 0 % F B S 中 2 × 1 0 <sup>6</sup> 個 / m L で 1 日静置した。休止 T 細胞又は活性化前 T 細胞を結合アッセイに直接使用した。休止 T 細胞又は活性化前 T 細胞に対する、非標的化 V H H - F c アイソタイプコントロール、及びヘテロ二量体 F c に連結された非標的化 V H H の C 末端に融合された I L - 2 - R A S 又は野生型 I L - 2 を含む融合タンパク質の結合を、以下の二次抗体 : A F 6 4 7 抗ヒト F c ( 1 : 1 0 0 0 )、P I ( 1 : 2 0 0 0 )、B V 7 8 5 - C D 4 ( 1 : 3 0 0 )、A P C / F i r e - C D 8 ( 1 : 5 0 0 ) 及び P E / C y 7 - C D 2 5 ( 1 : 1 0 0 ) を使用した以外は実施例 1 に実質的に記載されるように、フローサイトメトリーによって測定した。

【 0 3 4 8 】

10

20

30

40

50

非標的化 I L - 2 - R A S 融合タンパク質（配列番号 4 6 を含む）は、休止 T 細胞（図 5 A）及び活性化前 T 細胞（図 5 B）に対し、非標的化 V H H ドメイン及び野生型 I L - 2（配列番号 4 5 を含む）を含む融合タンパク質と比較して低下した親和性で結合した。I L - 2 を含まないアイソタイプコントロールは、図 5 A 及び図 5 B に示されるように休止 T 細胞又は活性化前 T 細胞に結合しなかった。

【 0 3 4 9 】

実施例 5：I L - 2 - R A S は、T r e g に対する親和性が低下した

制御性 T 細胞（「T r e g」）は C D 2 5、並びに C D 1 2 2 及び C D 1 3 2 の高い内因性発現を有し、野生型 I L - 2 に対して高度に応答性であった。非標的化 V H H のヘテロ二量体 F c（ジスルフィドによりホールにノブを安定化させた）の「ノブ」部分の C 末端に融合された野生型 I L - 2（配列番号 4 5 を含む）又は I L - 2 - R A S 三重突然変異体（配列番号 4 6 を含む）を含む融合タンパク質の T r e g に対する結合を測定した。

【 0 3 5 0 】

E a s y S e p H u m a n C D 4 + C D 1 2 7 <sup>l o w</sup> C D 2 5 + 制御性 T 細胞分離キット（Stemcell 社）を製造業者の指示に従って使用することにより、T r e g 及び C D 4 + T レスポンダー細胞（T r e s p）を新鮮で健康なドナー P B M C から濃縮し、単離した。r h T G F - B 1、オールトランスレチノイン酸、C D 3 / C D 2 8 T C e l l A c t i v a t o r 及び I L - 2 を補充した I m m u n o C u l t - X F T C e l l E x p a n s i o n M e d i u m 中で 7 日間の培養によって T r e g をナイーブ C D 4 + T 細胞から生成した。

【 0 3 5 1 】

2 つの細胞集団を区別するために、濃縮された T r e g 及び C D 4 + レスポンダー T 細胞を、それぞれ増殖色素 C e l l T r a c e V i o l e t（C T V）及び C F S E により 3 7 °C で 1 0 分間標識した。洗浄後に、T r e g 及び C D 4 + T 細胞を 1 0 % F B S 及び 1 × 抗生物質 / 抗真菌剤を補充した R P M I 中で  $1.5 \times 10^6$  細胞 / m l に再懸濁した。T r e g を 5 0  $\mu$  l の容量で播種することで、9 6 ウェル丸底プレートにおいて 7 5 0 0 0 個の T r e g / ウェルを得た。1 0 n M の I L - 2 - R A S の存在下で、T r e g を 3 7 °C にて一晩インキュベートし、実施例 1 に記載のようにフローサイトメトリーによって分析した。

【 0 3 5 2 】

図 6 に示されるように、野生型 I L - 2 を含む融合タンパク質とは対照的に、I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質は、P B M C から濃縮された T r e g（図 6 A）、誘導された T r e g（図 6 B）、又は C D 4 + T レスポンダー（図 6 C）に対して観察可能な結合を示さなかった。

【 0 3 5 3 】

実施例 6：I L - 2 - R A S は、休止 T 細胞に対する活性を低下させた

T 細胞を、実施例 4 に実質的に記載されるように磁性ビーズ分離によって単離し、C e l l T r a c e V i o l e t（C T V）で標識し、ヘテロ二量体 F c に連結された非標的化 V H H の C 末端に融合された野生型 I L - 2（配列番号 4 5 を含む）又は I L - 2 - R A S（配列番号 4 6 を含む）を含む融合タンパク質で処理した。C D 4、C D 8、C D 7 1、及び C T V のレベルをフローサイトメトリーによって測定した。増殖 T 細胞は C T V レベルが低下している。

【 0 3 5 4 】

図 7 A 及び図 7 C に示されるように、休止 C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞の増殖を誘導するのに必要とされる I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質の濃度は、同じ増殖の誘導を達成するのに必要とされる野生型 I L - 2 を含む融合タンパク質の濃度又は I L - 2 v - 類縁体を含む融合タンパク質の濃度よりも 1 0 0 倍超高かった。

【 0 3 5 5 】

図 7 B 及び図 7 D に示されるように、C D 8 + T 細胞及び C D 4 + T 細胞上で T 細胞活性化のマーカーである C D 7 1 発現を誘導するのに必要とされる I L - 2 - R A S を含む

10

20

30

40

50

融合タンパク質の濃度は、同じ活性化の誘導を達成するのに必要とされる野生型 I L - 2 又は I L - 2 v - 類縁体を含む融合タンパク質の濃度よりも少なくとも 1 0 0 倍高かった。

#### 【 0 3 5 6 】

T 細胞活性化は、活性化 T 細胞において増加するリン酸化 S T A T 5 レベルによっても測定することができる。T 細胞を磁性ビーズ分離によって単離し、ヘテロ二量体 F c を含む非標的化 V H H の C 末端に融合された野生型 I L - 2 ( 配列番号 4 5 を含む ) を含む融合タンパク質又はヘテロ二量体 F c を含む非標的化 V H H の C 末端に融合された I L - 2 - R A S ( 配列番号 4 6 を含む ) を含む融合タンパク質で 1 5 分間処理した。細胞を B D C y t o f i x / C y t o p e r m ( 商標 ) ( B D B i o s c i e n c e s 社 ) で固定し、9 0 % 氷冷メタノール中で透過処理し、C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞上でのリン酸化 S T A T 5 ( 「 p S T A T 5 」 ) のレベルを、抗 p S T A T 5 - P E 抗体 ( 1 : 7 0 ) を使用するフローサイトメトリーを用いて測定した。細胞を以下の抗体：抗 C D 3 - F I T C ( 1 : 2 0 0 ) 、 C D 5 6 - B V 4 2 1 ( 1 : 1 0 0 ) 、 C D 4 - B V 7 8 5 ( 1 : 2 0 0 ) 、 C D 8 - A P C - F i r e ( 1 : 3 0 0 ) で共染色した。

10

#### 【 0 3 5 7 】

図 7 E 及び図 7 F に示されるように、非標的化 I L - 2 - R A S 融合タンパク質は、試験した最も高い濃度であっても休止 C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞において S T A T 5 の最小のリン酸化しか達成しなかったが、非標的化 I L - 2 - 野生型融合タンパク質は、試験した最も高い濃度よりも 1 0 0 0 倍超低い濃度で S T A T 5 リン酸化を誘導した。

20

#### 【 0 3 5 8 】

実施例 7 : I L - 2 突然変異体は、T r e g に対する活性が低下した

E a s y S e p ( 商標 ) H u m a n C D 4 + C D 1 2 7 <sup>l o w</sup> C D 2 5 + 制御性 T 細胞分離キット ( S t e m c e l l 社 ) を使用して、T r e g を P B M C から単離した。T r e g を C e l l T r a c e V i o l e t で標識し、1 0 0 μ l の R P M I / 1 0 % F B S 中において 1 ウェル ( 9 6 ウェル、U 型底 ) 当たり 0 . 1 5 × 1 0 <sup>6</sup> 個の細胞で播種した。細胞を 1 0 0 n M から開始する 1 0 0 μ l の融合タンパク質の力価測定と組み合わせ、1 : 4 で力価測定した。細胞を 7 日間インキュベートした。7 日目に、増殖及び活性化のマーカである C D 2 5 を、以下の抗体：B V 7 8 5 - C D 4 ( 1 : 3 0 0 ) 、 A P C / F i r e - C D 8 ( 1 : 5 0 0 ) 、 P E / C y 7 - C D 2 5 ( 1 : 1 0 0 ) 、 P I ( 1 : 2 0 0 0 ) を使用した以外は実施例 1 に実質的に記載されるように、フローサイトメトリー ( N o v o c y t e ) によって測定した。

30

#### 【 0 3 5 9 】

図 8 A 及び図 8 B に示されるように、ヘテロ二量体 F c に連結された非標的化 V H H の C 末端に融合された野生型 I L - 2 ( 配列番号 4 5 を含む ) を含む融合タンパク質は、T r e g の増殖及び活性化マーカ C D 2 5 の発現を誘導したが、野生型 I L - 2 の代わりに I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質 ( 配列番号 4 6 を含む ) では誘導されなかった。

#### 【 0 3 6 0 】

実施例 8 : P D - 1 を発現する活性化 T 細胞は、P D - 1 標的化 I L - 2 - R A S によって刺激される

40

P D - 1 発現 T 細胞に結合してこの細胞を刺激する能力を、ペンプロリズマブ ( 従来の抗 P D - 1 抗体 ) 、並びにペンプロリズマブ類縁体及び重鎖の C 末端に連結された I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質 ( 図 1 F を参照されたい ) を使用して試験した。

#### 【 0 3 6 1 】

健康なドナーに由来する濃縮された T 細胞を、実施例 4 に実質的に記載されるように活性化した。6 ウェルプレートを 1 μ g / m l O K T 3 抗体で 4 にて一晚コーティングした。翌日、プレートを 2 回洗浄して非結合 O K T 3 抗体を除去した。濃縮された T 細胞を、C T L 培地を用いて融解し、完全 R P M I 中で 5 . 5 × 1 0 <sup>6</sup> 個の細胞 / m L に再懸濁し、コーティングしたプレートに 1 ウェル当たり 3 m L で播種した。2 日後に、活性化

50

T細胞を収集し、1回洗浄した後、OKT3抗体を含まない培地中に24時間播種して静置した。細胞を増殖色素CellTrace(商標) Violet(CTV)で標識した。T細胞を計数した後、 $2 \times 10^6$ 個の細胞/mLに再懸濁した。1ウェル当たり100 $\mu$ Lの再懸濁した細胞を96ウェル丸底プレートに播種した。ペンブロリズマブ又はペンブロリズマブ類縁体-IL-2-RAS融合物を100nMの最終濃度から開始して添加し、1:5で力価測定した。3日目に、T細胞を生存率マーカーPI及び以下の蛍光標識抗体:CD4-BV785、CD8-APC/Fire、CD25-PE/Cy7、CD71-FITC、及びCD69-APCにより室温で20分間染色した。プレートを、増殖の測定について実施例7に実質的に記載されるように、また結合については実施例1のように、Novocytフローサイトメーターで読み取り、更なる分析のためにデータをExcelにエクスポートした。

10

#### 【0362】

図9に示されるように、ペンブロリズマブ類縁体-IL-2-RAS融合タンパク質は、CD8<sup>+</sup>T細胞増殖(図9A)及びCD4<sup>+</sup>T細胞増殖(図9B)を刺激したが、ペンブロリズマブ単独では刺激しなかった。特定の理論に縛られることを意図するものではないが、観察された増殖の二相性の性質により、低濃度での活性がPD-1標的化活性によるものであり、より高濃度での活性の増加が非標的化活性によるものであることが示唆され得る。図9C及び図9Dに示されるように、ペンブロリズマブ及びペンブロリズマブ類縁体-IL-2-RASは、どちらも同様の親和性で活性化CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞に結合したが、但し、付加的な結合が10nM超の希釈範囲の上限でIL-2-RASを含む融合タンパク質について観察され、これはIL-2Rに対するIL-2-RASの結合によって媒介された可能性がある。

20

#### 【0363】

実施例9:活性化T細胞上でのPD-1のプレブロッキングは、PD-1標的化IL-2-RASによるシグナル伝達を妨げる

実施例4に実質的に記載されるように、T細胞を健康なドナーから磁性ビーズ分離によって単離して濃縮し、OKT3抗体をコーティングしたプレート上でインキュベートして、T細胞を活性化した。細胞をCTVで標識した。活性化前T細胞を、PD-1結合部位をブロッキングするために抗PD-1抗体であるペンブロリズマブと一緒にインキュベートするか、又はコントロールとして非標的化抗体と一緒にインキュベートした。次いで、細胞を、ペンブロリズマブ類縁体に融合されたIL-2-RASを含む融合タンパク質、又はコントロールとして非標的化抗体に融合されたIL-2-RASを含む融合タンパク質と一緒に3日間インキュベートした。IL-2シグナル伝達の程度を、実施例7に実質的に記載されるように、CD4<sup>+</sup>T細胞及びCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖をフローサイトメトリによって測定することで評価した。

30

#### 【0364】

図10A~図10Dに示されるように、野生型IL-2は、CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞の両方の強い増殖を誘導したが、ペンブロリズマブ又はIL-2-RAS及び非標的化抗体を含む融合タンパク質で処理したCD4<sup>+</sup>T細胞及びCD8<sup>+</sup>T細胞は、PD-1のプレブロッキングの影響を受けない低レベルの増殖を示した。対照的に、IL-2-RAS及びペンブロリズマブ類縁体を含む融合タンパク質で処理したCD4<sup>+</sup>T細胞(図10B及び図10D)及びCD8<sup>+</sup>T細胞(図10A及び図10C)は、どちらも顕著なPD-1依存性増殖を示し(図10A及び図10B)、これは抗PD-1抗体とのプレインキュベーションによってブロッキングされた(図10C及び図10D)。したがって、IL-2-RAS及び抗PD-1抗体を含む融合タンパク質は、PD-1がT細胞上で発現され、かつ接近可能な場合にのみT細胞を活性化した。

40

#### 【0365】

実施例10:PD-1標的化IL-2-RASは、Treg抑制を克服する

CD4<sup>+</sup>Tレスポンドー細胞及びTregを、実施例5に記載されるように単離した。CD4<sup>+</sup>レスポンドー細胞をCTVで標識し、単離されたTregと2:1の比率で混合

50

し、抗CD3ビーズ(2個のT細胞につき1個のビーズ)により活性化した。得られる混合物を、図1Bに示されるように非標的化VHHのC末端に融合された野生型IL-2、図1Bに示されるように非標的化VHHのC末端に融合されたIL-2-RASを含む融合タンパク質、又は抗PD-1抗体に融合されたIL-2-RASを含む融合タンパク質(ペンプロリズマブ類縁体-IL-2-RAS)の希釈系列で7日間処理した。実施例7に実質的に記載されるように、増殖をフローサイトメトリーによって測定した。

【0366】

図11に示されるように、Tレスポナー細胞はTregによって抑制されたが、非標的化野生型IL-2、並びにIL-2-RAS及び抗PD-1抗体を含む融合タンパク質(ペンプロリズマブ類縁体-IL-2-RAS)は、Tregの存在に関わらず、CD4<sup>+</sup>Tレスポナー細胞の増殖を誘導した。IL-2-RAS及び非標的化抗体を含む融合タンパク質での細胞の処理は、増殖を同程度まで回復させなかった。非標的化IL-2-RASのみが、PD-1標的化IL-2-RAS融合タンパク質よりもはるかに高い濃度でTレスポナーに対するTregの抑制効果を打ち消すことができた。したがって、PD-1標的化IL-2-RASは、Tregの抑制効果を克服し、この活性はT細胞上で発現されるPD-1への結合に依存していた。

【0367】

実施例11: PD-1標的化IL-2-RASは、トランスでシグナル伝達しない

ビーズを、製造業者の推奨コーティング手順に従って、 $4 \times 10^8$ 個のビーズ当たり200 $\mu$ gのPD-1抗原でコーティングする。簡潔には、ビーズをバッファー1(0.1Mのリン酸ナトリウムバッファー、pH7.4~8.0)中で1回洗浄した後に、チューブローターにおいてPD-1抗原を含むバッファー1中で室温にて18時間インキュベートする。次いで、ビーズをバッファー2(PBS、0.1%BSA、2mMのEDTA pH7.4)で4回洗浄する。ビーズをバッファー3(0.2MのTris、0.1%BSA、pH8.5)中で37 $^{\circ}$ Cにて4時間インキュベートすることにより、遊離トシル基を不活性化させる。次いで、ビーズをバッファー2中で1回洗浄し、 $400 \times 10^6$ 個のビーズ/mLの濃度に再懸濁する。

【0368】

コーティングされたビーズを、野生型IL-2又は抗PD-1抗体に融合されたIL-2-RASを含む融合タンパク質と一緒にインキュベートし、洗浄する。次いで、ビーズを単離された休止T細胞と一緒にインキュベートする。IL-2シグナル伝達を、フローサイトメトリーによってpSTAT5レベルを測定することで評価する。

【0369】

ビーズに結合した野生型IL-2を含む融合タンパク質は、CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞を強く活性化するが、ビーズに結合したIL-2-RASを含む融合タンパク質は、試験した最も高い濃度までCD4<sup>+</sup>T細胞又はCD8<sup>+</sup>T細胞に対して活性を有しない。したがって、IL-2-RASのT細胞標的化がIL-2シグナル伝達に必要とされ、標的化IL-2-RASのシグナル伝達は、トランスでは起こらない。

【0370】

実施例12: IL-2-RASは、トランスでシグナル伝達しない

1000nMから開始して1:4で希釈した非標的化野生型IL-2及び非標的化IL-2-RASの希釈系列をアッセイプレートにコーティングし、一晚インキュベートし、洗浄した。T細胞を添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞の活性化を、実施例6に実質的に記載されるように、リン酸化STAT5レベルを検出することによって測定した。

【0371】

図12A及び図12Bに示されるように、CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞は、pSTAT5誘導によって測定したところ、野生型IL-2によってトランスで活性化されたが、非標的化IL-2-RASはトランスで活性化することができなかった。特定の理論に縛られることを意図するものではないが、IL-2受容体に対するIL-2-RASの

親和性の低下は、下流のシグナル伝達を誘導する I L - 2 R の効率的な結合及びクラスター形成を妨げた可能性がある。したがって、標的化 I L - 2 - R A S 融合タンパク質のみが p S T A T 5 シグナル伝達を引き起こす。

【 0 3 7 2 】

実施例 1 3 : N K p 4 6 標的化 I L - 2 - R A S は、N K 細胞増殖を特異的に引き起こす  
 図 1 H に示されるように N K p 4 6 を標的とするヘテロ二量体 s c F v 抗体の C 末端に融合された I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質、図 1 B に示されるようにヘテロ二量体 F c に連結された非標的化 V H H の C 末端に融合された野生型 I L - 2 又は I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質、及び N K p 4 6 を標的とするヘテロ二量体 s c F v 抗体単独の N K 細胞、C D 4 + T 細胞、及び C D 8 + T 細胞に対する影響を決定した。

10

【 0 3 7 3 】

健康なドナーに由来する新鮮な P B M C を C e l l T r a c e ( 商 標 ) V i o l e t で標識し、丸底 9 6 ウェルプレートにおいて 2 0 0 0 0 0 個の細胞 / ウェルで播種した。融合タンパク質及び N K p 4 6 s c F v - F c コントロールの希釈物を、播種した細胞に添加し、3 7 °C で 7 日間インキュベートした。7 日目に、以下の抗体：抗 C D 3 - B V 7 8 5 ( 1 : 2 0 0 )、抗 C D 5 6 - A P C ( 1 : 1 0 0 )、抗 C D 4 - P E ( 1 : 2 0 0 )、抗 C D 8 - A P C - F i r e ( 1 : 3 0 0 ) 及び P I ( 1 : 2 0 0 0 ) を使用した以外は実施例 7 に実質的に記載されるように、細胞増殖を測定した。

【 0 3 7 4 】

加えて、健康なドナーに由来する新鮮な P B M C を、同じ融合タンパク質又は N K p 4 6 s c F v - F c コントロールで処理し、3 7 °C で 1 5 分間インキュベートした。C D 8 + T 細胞、C D 4 + T 細胞、及び N K 細胞 ( C D 3 + 、 C D 5 6 + ) における p S T A T 5 レベルを、実施例 6 に実質的に記載されるように、リン酸化 S T A T 5 レベルを検出することによって測定した。

20

【 0 3 7 5 】

健康なドナーに由来する新鮮な P B M C に対する融合タンパク質及び N K p 4 6 s c F v - F c コントロールの結合を、以下の抗体：抗 C D 3 - F I T C ( 1 : 1 0 0 )、抗 C D 5 6 - B V 4 2 1 ( 1 : 1 0 0 )、抗 C D 4 - B V 7 8 5 ( 1 : 2 0 0 )、抗 C D 8 - A P C - F i r e ( 1 : 3 0 0 )、抗ヒト I g G - A l e x a F l u o r 6 4 7 ( 1 : 5 0 0 )、及び P I ( 1 : 2 0 0 0 ) を使用した以外は実施例 1 に実質的に記載されるように測定した。

30

【 0 3 7 6 】

図 1 3 A ~ 図 1 3 I に示されるように、N K p 4 6 標的化 I L - 2 - R A S は、N K 細胞の増殖及び活性化を強力に活性化したが、C D 4 + T 細胞又は C D 8 + T 細胞には影響を及ぼさなかった。対照的に、非標的化野生型 I L - 2 は、試験した全てのリンパ球 ( N K 、 C D 4 + T 細胞、及び C D 8 + T 細胞 ) の増殖及び活性化を引き起こした。N K p 4 6 s c F v - F c ( I L - 2 - R A S を有しない ) の結合は、N K 増殖又は p S T A T 5 誘導を引き起こさなかった。したがって、N K p 4 6 標的化 I L - 2 - R A S は、N K 細胞上で I L - 2 のシグナル伝達を引き起こしたが、C D 4 + T 細胞又は C D 8 + T 細胞をトランスで活性化しなかった。

40

【 0 3 7 7 】

実施例 1 4 : L A G 3 標的化 I L - 2 - R A S は、活性化前 L A G 3 + T 細胞を刺激する  
 図 1 G に示されるように従来抗 L A G 3 ヘテロ二量体抗体 ( M a b ) の C 末端に融合された I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質、図 1 B に示されるようにヘテロ二量体 F c を含む抗 L A G 3 V H H に融合された I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質、図 1 B に示されるように非標的化 V H H に融合された I L - 2 - R A S を含む融合タンパク質、又は図 1 B に示されるように非標的化ヘテロ二量体 F c の C 末端に融合された野生型 I L - 2 を含む融合タンパク質、又は L A G 3 標的化 M a b ( コントロール )、又は L A G 3 標的化 V H H - F c ( コントロール ) の C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞に対する影響をアッセイした。

50

## 【0378】

健康なドナーに由来する濃縮されたT細胞を、コーティングした1 μg/mL抗CD3 (OKT3) 及び10 μg/mL可溶性抗CD28で48時間刺激した後、24時間静置した。活性化前細胞をCellTrace (商標) Violetで標識し、20000細胞/ウェルで播種した。融合タンパク質及びコントロールタンパク質の希釈物を添加し、3日間インキュベートした。活性化マーカーであるCD25及びCD71の増殖及び発現を、実質的に実施例7のように、但し付加的な抗体：抗CD25-FITC (1:100) 及び抗CD71-PE/Cy7を用いて測定した。

## 【0379】

刺激されたCD8<sup>+</sup>T細胞は、LAG3をCD8<sup>+</sup>T細胞の45%まで上方調節し、CD4<sup>+</sup>T細胞は、LAG3をCD4<sup>+</sup>T細胞の22%まで上方調節した。対照的に、非刺激T細胞は、CD8<sup>+</sup>T細胞又はCD4<sup>+</sup>T細胞のいずれについてもLAG3発現に対してほぼ0%陽性である。

10

## 【0380】

図14A~図14Dに示されるように、抗LAG3 Mab-IL-2-RAS及び抗LAG3 VHH-IL-2-RASの両方が、CD25 (図14C及び図14D) 及びCD71 (図14E及び図14F) の発現レベルによって示されるCD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>の増殖 (図14A及び図14B) 及び活性化を増加させた。非標的化野生型IL-2は、CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖及び活性化の強力な誘導因子であり、刺激されたT細胞により高い親和性及び飽和度で結合した。

20

## 【0381】

実施例15：IL-2の突然変異体の組合せは、非標的化活性を更に低下させる

HEK-Blue IL-2レポーター細胞 (InvivoGen社) を使用して、非標的化IL-2突然変異体の相対活性を測定した。レポーター細胞を非標的化VHHのC末端に融合されたIL-2突然変異体の希釈物で処理し、20時間インキュベートした後、比色酵素基質であるQUANTIL-Blue (商標) (Invivogen) を用いてレポーター細胞によるアルカリホスファターゼのIL-2誘導分泌を定量した。

## 【0382】

図15に示されるように、IL-2突然変異体は広範な活性を示した。上記の実験から、IL-2-RAS (P65R、H16A、及びD84S) がIL-2Rに対する結合を野生型IL-2と比較して劇的に低下させ (図4~図6を参照されたい)、活性を野生型IL-2と比較して低下させた (図7A~図7Eを参照されたい) ことが示された。付加的なM23A突然変異を有するIL-2-RAS及び付加的なE95Q突然変異を有するIL-2-RASは、どちらもIL-2-RASと比較して活性の低下を示し、IL-2-RASとM23A及びE95Qの両方との組合せは、活性を更に一層減弱させた。PD-1発現レポーター細胞を用いた実験では、これらの親和性が低下したIL-2突然変異体が全て同等のPD-1標的化活性を示し (データは示さない)、PD-1に対するシスでの高親和性結合が、IL-2Rに対するIL-2突然変異体の親和性の低下を相殺し得ることが示唆される。HEK-Blue IL-2レポーター系は相対活性の測定に有用であったが、レポーター系においてIL-2突然変異体について観察されたEC<sub>50</sub>は、おそらくは初代細胞上でのより低いIL-2Rレベルと比較したレポーター細胞におけるIL-2R成分の過剰発現のために、初代リンパ球と比較して顕著に左にシフトした。

30

40

## 【0383】

実施例16：修飾IL-2を含むポリペプチドの活性

HEK-Blue IL-2レポーター細胞 (InvivoGen) 又はPD-1を発現する修飾IL-2レポーター細胞クローンを、PD-1結合VHHのC末端に融合された修飾IL-2を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。IL-2修飾及び各修飾IL-2の配列番号を表2及び表3に示す。T3G及びC125S突然変異のみを含むIL-2又は野生型IL-2を含むコントロールポリペプチドも試験した。PD-1を発現しないレポーター細胞を用いて非標的化IL-2活性を測定した。レポーター細胞を

50

ポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 15 に記載のように Q u a n t i - B l u e 分析の前に 20 時間インキュベートした。P D - 1 を欠く細胞での試験したポリペプチドの E C <sub>50</sub> を、P r i s m 8 において 4 パラメーター非線形曲線フィットを用いて算出し ( (アゴニスト) 対応答 - 可変勾配 )、下記表 2 に示し、用量応答曲線を図 16 A に示す。  
【 0 3 8 4 】

## 【表 2】

表 2 : P D - 1 を欠く細胞での修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの E C <sub>50</sub>

I L - 2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
T3A, H16A, F42R, P65R, D84S, C125S	2.1	282
T3A, H16A, Δ 42, P65R, D84S, C125S	4.2	278
T3A, H16A, K43E, Y45R, P65R, D84S, C125S	1.5	279
T3A, H16A, P65R, D84S, C125S (INBRX-108)	0.9	28
T3A, H16A, K43E, P65R, D84S, C125S	1.1	280
T3A, H16A, P65R, D84S, I114F, C125S	1.4	281
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S	3.2	108
T3A, H16A, R38A, P65R, D84S, C125S	2.0	109

10

## 【 0 3 8 5 】

表 2 及び図 16 A に示されるように、修飾 I L - 2 を含む試験したポリペプチドは、広範な活性を示した。付加的な F 4 2 R、 Δ 4 2、K 4 3 E 及び / 又は Y 4 5 R、I 1 1 4 F、E 6 1 R、又は R 3 8 A 修飾を有する I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S は、I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S と比較して低下した活性を示した。図 25 A ~ 図 25 C に示されるように、レポーター細胞は、野生型 I L - 2 と T 3 G 及び C 1 2 5 S 突然変異を含む I L - 2 とに 20 対応する。

20

## 【 0 3 8 6 】

同じポリペプチドの P D - 1 標的化 I L - 2 活性を P D - 1 発現 I L - 2 レポーター細胞において試験した。P D - 1 を発現する細胞での E C <sub>50</sub> を、P r i s m 8 において 4 パラメーター非線形曲線フィットを用いて算出し ( (アゴニスト) 対応答 - 可変勾配 )、下記表 3 に示し、用量応答曲線を図 16 B に示す。  
【 0 3 8 7 】

30

## 【表 3】

表 3 : P D - 1 を発現する細胞での修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの E C <sub>50</sub>

I L - 2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
T3A, H16A, F42R, P65R, D84S, C125S	0.003	282
T3A, H16A, Δ 42, P65R, D84S, C125S	0.005	278
T3A, H16A, K43E, Y45R, P65R, D84S, C125S	0.002	279
T3A, H16A, P65R, D84S, C125S (INBRX-108)	0.001	28
T3A, H16A, K43E, P65R, D84S, C125S	0.001	280
T3A, H16A, P65R, D84S, I114F, C125S	0.002	281
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S	0.002	108
T3A, H16A, R38A, P65R, D84S, C125S	0.002	109

40

## 【 0 3 8 8 】

表 3 及び図 16 B に示されるように、付加的な F 4 2 R、 Δ 4 2、K 4 3 E 及び / 又は Y 4 5 R、I 1 1 4 F、E 6 1 R、又は R 3 8 A 修飾を有する I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドの P D - 1 標的化 I L - 2 活性は、I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S の活性の 2 倍 ~ 5 倍以内の活性を示した。  
【 0 3 8 9 】

50

### 実施例 17：修飾 IL-2 を含むポリペプチドの活性に対する CD25 の遮断の影響

PD-1 を発現しない HEK-Blue IL-2 レポーター細胞 (InvivoGen) を、CD25 への IL-2 の結合を遮断する CD25 抗体の存在下又は非存在下で PD-1 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL-2 を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。IL-2 修飾及び修飾 IL-2 の配列番号を表 4 に示す。レポーター細胞をポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 15 に記載のように Quanti-Blue 分析の前に 20 時間インキュベートした。用量応答曲線を図 17A ~ 図 17C に示し、IL-2 活性に対する CD25 遮断の影響を下記表 4 に記載する。

【0390】

【表 4】

表 4：PD-1 を欠く細胞に対する CD25 の遮断の影響

IL-2 修飾	CD25 抗体による活性の遮断？	配列番号
T3A, H16A, F42R, P65R, D84S, C125S	なし	282
T3A, H16A, Δ42, P65R, D84S, C125S	なし	278
T3A, H16A, K43E, Y45R, P65R, D84S, C125S	なし	279
T3A, H16A, P65R, D84S, C125S (INBRX-108)	あり	28
T3A, H16A, K43E, P65R, D84S, C125S	あり	280
T3A, H16A, P65R, D84S, I114F, C125S	あり	281
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S	なし	108
T3A, H16A, R38A, P65R, D84S, C125S	なし	109

10

20

【0391】

表 4 及び図 17A ~ 図 17C に示されるように、IL-2-RAS-T3A-C125S 又は付加的な K43E 又は I114F 修飾を有する IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチドは、CD25 遮断抗体の存在下で完全な IL-2 活性を保持せず、CD25 がそれらの活性に必要であることが示された。付加的な F42R、Δ42、E61R、若しくは R38A 修飾又は付加的な K43E 及び Y45R 修飾を含む IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチドは、CD25 遮断抗体の存在下で完全な活性を保持し、CD25 がそれらの活性に必要でないことが示された。

30

【0392】

### 実施例 18：修飾 IL-2 を含むポリペプチドの活性

実施例 16 に記載の HEK-Blue IL-2 レポーター細胞を、PD-1 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL-2 を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。IL-2 修飾及び各修飾 IL-2 の配列番号を表 5 に示す。PD-1 を発現しないレポーター細胞を用いて非標的化 IL-2 活性を測定した。レポーター細胞をポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 15 に記載のように Quanti-Blue 分析の前に 20 時間インキュベートした。PD-1 を欠く細胞での試験したポリペプチドの EC<sub>50</sub> を、Prism 8 において 4 パラメーター非線形曲線フィットを用いて算出し ( (アゴニスト) 対応答 - 可変勾配)、下記表 5 に示し、用量応答曲線を図 18A に示す。

40

【0393】

50

## 【表 5】

表 5 : PD-1 を欠く細胞での修飾 IL-2 を含むポリペプチドの EC<sub>50</sub>

IL-2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
T3A, H16A, L19A, P65R, D84S, C125S	>100	110
T3A, H16A, P65R, D84S, N88S, C125S	3.1	111
T3A, H16A, P65R, D84S, E95Q, C125S	3.9	112
T3A, H16A, M23A, P65R, D84S, C125S	3.1	113
T3A, H16A, M23A, P65R, D84S, E95Q, C125S	8.7	114
T3A, H16A, P65R, D84S, C125S (INBRX-108)	0.9	28

10

## 【0394】

表 5 及び図 18A に示されるように、修飾 IL-2 を含む試験したポリペプチドは、広範な活性を示した。付加的な N88S、E95Q、及び / 又は M23A 修飾を有する IL-2-RAS-T3A-C125S は、IL-2-RAS-T3A-C125S と比較して低下した活性を示した。L19A 修飾の付加は、IL-2 活性の大幅な低下をもたらした。

## 【0395】

同じポリペプチドの PD-1 標的化 IL-2 活性を PD-1 発現 IL-2 レポーター細胞において試験した。PD-1 を発現する細胞での EC<sub>50</sub> を、Prism 8 において 4 パラメーター非線形曲線フィットを用いて算出し ( (アゴニスト) 対応答 - 可変勾配 )、下記表 6 に示し、用量応答曲線を図 18B に示す。

20

## 【0396】

## 【表 6】

表 6 : PD-1 を発現する細胞での修飾 IL-2 を含むポリペプチドの EC<sub>50</sub>

IL-2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
T3A, H16A, L19A, P65R, D84S, C125S	>100	110
T3A, H16A, P65R, D84S, N88S, C125S	0.001	111
T3A, H16A, P65R, D84S, E95Q, C125S	0.0006	112
T3A, H16A, M23A, P65R, D84S, C125S	0.001	113
T3A, H16A, M23A, P65R, D84S, E95Q, C125S	0.002	114
T3A, H16A, P65R, D84S, C125S (INBRX-108)	0.001	28

30

## 【0397】

表 6 及び図 18B に示されるように、付加的な N88S、M23A、又は M23A 及び E95Q 修飾 ( 複数の場合もある ) を有する IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチドの PD-1 標的化 IL-2 活性は、IL-2-RAS-T3A-C125S の活性の 2 倍以内の活性を示した。L19A 修飾の付加は、PD-1 の存在にもかかわらず IL-2 活性の大幅な低下をもたらした。

40

## 【0398】

実施例 19 : 修飾 IL-2 を含むポリペプチドの活性

実施例 16 に記載の HEK-Blue IL-2 レポーター細胞を、PD-1 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL-2 を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。レポーター細胞をポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 15 に記載のように Quantiblot 分析の前に 20 時間インキュベートした。修飾 IL-2 の同一性及び配列番号並びに試験したポリペプチドの EC<sub>50</sub> を下記表 7 に示し、用量応答曲線を図 19A ~ 図 19E に示す。

## 【0399】

50

## 【表 7】

表 7：修飾 IL-2 を含むポリペプチドの EC<sub>50</sub>

細胞株	IL-2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19A, E61R, P65R,	0.002	115
HEK-Blue IL-2	D84S, C125S	10.13	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, M23A, E61R, P65R,	0.003	116
HEK-Blue IL-2	D84S, E95Q, C125S	39.42	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, M23A, E61R, P65R,	0.02	117
HEK-Blue IL-2	D84S, N88S, C125S	>100	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, E61R, P65R, D84S,	0.02	118
HEK-Blue IL-2	N88S, E95Q, C125S	>100	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, M23A, E61R, P65R,	0.6	119
HEK-Blue IL-2	D84S, N88S, E95Q, C125S	>100	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, P65R, D84S, C125S	0.001	28
HEK-Blue IL-2	(INBRX-108)	0.512	

10

## 【0400】

表 7 及び図 19A ~ 図 19E に示されるように、修飾 IL-2 を含む試験したポリペプチドは、広範な活性を示した。付加的な修飾を有する IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチドは全て、IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチドと比較して顕著に低下した非標的化活性を示したが、付加的な L19A 及び E61R 修飾を有する IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチド並びに付加的な M23A、E61R、及び E95Q 修飾を有するものは、IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチドと同等の PD-1 標的化活性を示した。実施例 18 では、L19A 突然変異が E61R 突然変異の非存在下で IL-2-RAS-T3A-C125S を含むポリペプチドの非標的化及び標的化活性を低下させることが示された。しかしながら、これらの結果から、E61R 突然変異の付加が PD-1 標的化活性を回復させたことが示される。このため、個々の突然変異の組合せの影響を予測することは困難である。

20

## 【0401】

実施例 20：修飾 IL-2 を含むポリペプチドの活性

30

実施例 16 に記載の HEK-Blue IL-2 レポーター細胞を、PD-1 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL-2 を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。レポーター細胞をポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 15 に記載のように Quantitative-Blue 分析の前に 20 時間インキュベートした。修飾 IL-2 の同一性及び配列番号並びに試験したポリペプチドの EC<sub>50</sub> を下記表 8 に示し、用量応答曲線を図 20A ~ 図 20E に示す。

## 【0402】

40

50

## 【表 8】

表 8 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの E C <sub>50</sub>

細胞株	I L - 2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19A, R38A, P65R,	0.002	120
HEK-Blue IL-2	D84S, C125S	3.6	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, M23A, R38A, P65R,	0.004	121
HEK-Blue IL-2	D84S, E95Q, C125S	17.5	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, M23A, R38A, P65R,	0.05	124
HEK-Blue IL-2	D84S, N88S, E95Q, C125S	>100	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, M23A, R38A, P65R,	0.008	122
HEK-Blue IL-2	D84S, N88S, C125S	>100	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, R38A, P65R, D84S,	0.06	123
HEK-Blue IL-2	N88S, E95Q, C125S	>100	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, P65R, D84S, C125S	0.001	28
HEK-Blue IL-2	(INBRX-108)	0.512	

10

## 【0403】

表 8 及び図 20A ~ 図 20E に示されるように、修飾 I L - 2 を含む試験したポリペプチドは、広範な活性を示した。付加的な修飾を有する I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドは全て、I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと比較して低下した非標的化活性を示し、幾つかは非標的化活性を示さなかった。付加的な L 1 9 A 及び R 3 8 A 修飾を有する I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチド及び付加的な M 2 3 A、R 3 8 A、及び E 9 5 Q 修飾を有するものは、I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと同等の P D - 1 標的化活性を示した。

20

## 【0404】

実施例 21 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性

実施例 16 に記載の H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞を、P D - 1 結合 V H H の C 末端に融合された修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。レポーター細胞をポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 15 に記載のように Q u a n t i - B l u e 分析の前に 20 時間インキュベートした。修飾 I L - 2 の同一性及び配列番号並びに試験したポリペプチドの E C <sub>50</sub> を下記表 9 に示し、用量応答曲線を図 21A ~ 図 21D に示す。

30

## 【0405】

## 【表 9】

表 9 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの E C <sub>50</sub>

細胞株	I L - 2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, P65R, D84S,	0.001	125
HEK-Blue IL-2	C125S	20.1	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19S, P65R, D84S,	0.002	126
HEK-Blue IL-2	C125S	4.02	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19T, P65R, D84S,	0.005	127
HEK-Blue IL-2	C125S	4.37	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19V, P65R, D84S,	0.002	128
HEK-Blue IL-2	C125S	3.72	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, P65R, D84S, C125S	0.001	28
HEK-Blue IL-2	(INBRX-108)	0.512	

40

## 【0406】

表 9 及び図 21A ~ 図 21D に示されるように、付加的な L 1 9 修飾を有する I L - 2

50

- R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドは、 I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと同等の P D - 1 標的化活性を示したが、試験したポリペプチドの非標的化活性は、 I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと比較して僅かな低下から顕著な低下まで様々であった。

【 0 4 0 7 】

実施例 2 2 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性

実施例 1 6 に記載の H E K - B l u e I L - 2 レポーター細胞を、 P D - 1 結合 V H H の C 末端に融合された修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。ポリペプチドを、 I L - 2 - C D 2 5 界面を破壊するように設計された I L - 2 突然変異で修飾し、 I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むコントロールポリペプチドと比較した。レポーター細胞をポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 1 5 に記載のように Q u a n t i - B l u e 分析の前に 2 0 時間インキュベートした。修飾 I L - 2 の同一性及び配列番号並びに試験したポリペプチドの E C <sub>50</sub> を下記表 1 0 に示し、用量応答曲線を図 2 2 A ( P D - 1 を欠く細胞 ) 及び図 2 2 B ( P D - 1 を発現する細胞 ) に示す。

10

【 0 4 0 8 】

【 表 1 0 】

表 1 0 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの E C <sub>50</sub>

細胞株	I L - 2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, P65R, D84S, C125S (INBRX-108)	0.003	28
HEK-Blue IL-2		0.3	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, K43E, C125S	0.005	286
HEK-Blue IL-2		0.004	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, K43E, Y45R, C125S	0.004	283
HEK-Blue IL-2		0.006	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, E61R, P65R, C125S	0.005	106
HEK-Blue IL-2		0.01	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, R38A, P65R, C125S	0.006	107
HEK-Blue IL-2		0.01	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, K43E, P65R, C125S	0.005	288
HEK-Blue IL-2		0.007	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, K43E, Y45R, P65R, C125S	0.005	289
HEK-Blue IL-2		0.009	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, P65R, I114F, C125S	0.007	287
HEK-Blue IL-2		0.01	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, E61R, C125S	0.006	284
HEK-Blue IL-2		0.004	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, I114F, C125S	0.02	285
HEK-Blue IL-2		>100	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, R38A, C125S	0.02	290
HEK-Blue IL-2		0.01	

20

30

40

【 0 4 0 9 】

表 1 0 及び図 2 2 A に示されるように、 I L - 2 - T 3 A - R 3 8 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドは、非標的化活性を示さず、試験した残りのポリペプチドは、 I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと比較して顕著に増加した非標的化活性を示した。図 2 2 B に示されるように、 I L - 2 - T 3 A - R 3 8 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドは、 I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと比較して顕著に低下した幾らかの P D - 1 標的化活性を示した。試験した残りのポリペプチドは、 I L - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと同等の P D - 1 標的化活性を示した。

50

## 【 0 4 1 0 】

実施例 23 : 修飾 IL - 2 を含むポリペプチドの活性

実施例 16 に記載の IL - 2 レポーター細胞を、PD - 1 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL - 2 を含むポリペプチドの相対活性を測定するために使用した。レポーター細胞をポリペプチドの希釈物で処理し、実施例 15 に記載のように Quant i - B l u e 分析の前に 20 時間インキュベートした。修飾 IL - 2 の同一性及び配列番号並びに試験したポリペプチドの EC<sub>50</sub> を下記表 11 に示し、用量応答曲線を図 23 A ( PD - 1 を欠く細胞 ) 及び図 23 B ( PD - 1 を発現する細胞 ) に示す。

## 【 0 4 1 1 】

## 【 表 1 1 】

表 11 : 修飾 IL - 2 を含むポリペプチドの EC<sub>50</sub>

細胞株	IL - 2 修飾	EC <sub>50</sub> (nM)	配列番号
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, P65R, D84S, C125S (INBRX-108)	0.003	28
HEK-Blue IL-2		0.3	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, M23A, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	0.017	129
HEK-Blue IL-2		38.46	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, C125S	0.044	130
HEK-Blue IL-2		37.98	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, M23A, R38A, P65R, D84S, C125S	0.015	131
HEK-Blue IL-2		43.33	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, R38A, P65R, D84S, E95Q C125S	0.019	132
HEK-Blue IL-2		60.14	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, R38A, P65R, D84S, C125S	0.007	133
HEK-Blue IL-2		13.81	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84S, C125S	0.006	134
HEK-Blue IL-2		17.23	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	0.022	135
HEK-Blue IL-2		40.08	
HEK-Blue IL-2 + PD-1	T3A, H16A, L19N, M23A, E61R, P65R, D84S, C125S	0.016	136
HEK-Blue IL-2		29.27	

10

20

30

40

## 【 0 4 1 2 】

表 11 及び図 23 A に示されるように、付加的な修飾を有する IL - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含む試験したポリペプチドは、IL - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと比較して顕著に低下した非標的化活性を示した。図 23 B に示されるように、付加的な修飾を有する IL - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含む試験したポリペプチドは、IL - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドと比較して僅かな低下から顕著な低下まで広範な PD - 1 標的化活性を示した。付加的な L 1 9 N 及び R 3 8 A 又は E 6 1 R 突然変異を有する IL - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含むポリペプチドは、付加的な修飾を有する IL - 2 - R A S - T 3 A - C 1 2 5 S を含む試験したポリペプチドの中で最高の PD - 1 標的化活性を示した。

## 【 0 4 1 3 】

50

#### 実施例 24 : 修飾 IL - 2 を含むポリペプチドによる CD 25 結合

PD - 1 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL - 2 を含むポリペプチド及びコントロールポリペプチドを、バイオレイヤー干渉法 (ForteBio) を用いて CD 25 への結合について試験した。ヒスチジンタグ付き CD 25 を固定化し、下記表に記載の 300 nM のポリペプチドを添加した。得られた結合結果を下記表 12 に示す。

【0414】

【表 12】

表 12 : CD 25 への結合について試験したポリペプチド

ポリペプチド	CD 25 への結合	配列番号
IL-2-T3A-RAS-C125S	あり	28
WT IL-2	あり	1
WT IL-15	なし	284
IL-2-T3A-H16A-Δ 42-P65R-D84S-C125S	なし	278
IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S	なし	108
IL-2-T3A-H16A-F42R-P65R-D84S-C125S	あり	282
IL-2-T3A-H16A-R38A-P65R-D84S-C125S	なし	109
IL-2-T3A-H16A-K43E-Y45R-P65R-D84S-C125S	なし	279
PD - 1 - IL - 2 v 融合	なし	2
IL-2-T3A-H16A-K43E-P65R-D84S-C125S	なし	280
IL-2-T3A-H16A-P65R-D84S-I114F-C125S	なし	281

10

20

【0415】

IL - 2 - RAS - T3A - C125S を含むポリペプチドは、CD 25 - IL - 2 界面を破壊するように設計された突然変異を含むにもかかわらず CD 25 に結合した。E61R 及び P65R 突然変異を含む IL - 2 を含むポリペプチドは、RAS - T3A - C125S 突然変異のみを含む IL - 2 を含むポリペプチドと比較して CD 25 結合の顕著な減少を示すか又は CD 25 結合を示さなかった。

【0416】

#### 実施例 25 : 修飾 IL - 2 を含むポリペプチドの活性

PD - 1 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL - 2 を含むポリペプチドの相対活性を、実施例 16 に記載のように HEK - Blue IL - 2 レポーター細胞 (InvivoGen) 又は PD - 1 を発現する修飾細胞クローンを用いて測定した。IL - 2 修飾及び修飾 IL - 2 の配列番号を表 13 に示す。

30

【0417】

NKp46 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL - 2 を含むポリペプチドの相対活性を、HEK - Blue IL - 2 レポーター細胞 (InvivoGen) 又は NKp46 を発現する修飾細胞クローン発現細胞を用いて測定した。IL - 2 修飾及び修飾 IL - 2 の配列番号を表 13 に示す。

【0418】

CD8a 結合 VHH の C 末端に融合された修飾 IL - 2 を含むポリペプチドの相対活性を、HEK - Blue IL - 2 レポーター細胞 (InvivoGen) 又は CD8a を発現する修飾細胞クローン発現細胞を用いて測定した。IL - 2 修飾及び修飾 IL - 2 の配列番号を表 14 に示す。

40

【0419】

PD - 1 を欠き、NKp46 を欠き、CD8a 発現を欠く細胞を用いて非標的化活性を測定した。

【0420】

結果を下記表 13 及び表 14 に示し、表 14 に対応する用量応答曲線を図 24A (CD8a を欠く細胞) 及び図 24B (CD8a を発現する細胞) に示す。低い活性及び非線形回帰計算への低い適合性のために算出することができなかった非標的化 EC<sub>50</sub> を含む非

50

標的化 EC<sub>50</sub> の項目には、50.000 nM の最大値を用いた。PD-1 標的化 EC<sub>50</sub> は、PD-1 結合 VHH を含むポリペプチド及び PD-1 を発現するレポーター細胞を用いて算出した。NKp46 標的化 EC<sub>50</sub> は、NKp46 結合 VHH を含むポリペプチド及び NKp46 を発現するレポーター細胞を用いて算出した。CD8a 標的化 EC<sub>50</sub> は、CD8a 結合 VHH を含むポリペプチド及び CD8a を発現するレポーター細胞を用いて算出した。「ウィンドウ」は、非標的化 EC<sub>50</sub> を標的化 EC<sub>50</sub> で除算したものであり、標的化 IL-2 活性の濃度差を表す。空白の項目は、対応する実験においてポリペプチドを試験しなかったことを示す。

【0421】

【表13】

表13：修飾 IL-2 を含むポリペプチドの EC<sub>50</sub>

IL-2 修飾	非標的化 EC <sub>50</sub> (nM)	PD-1 標的化 EC <sub>50</sub> (nM)	NKp46 標的化 EC <sub>50</sub> (nM)	PD-1 ウィンドウ	NKp46 ウィンドウ	配列番号
T3G, C125S	0.020	0.020		1.056		105
なし (IL-2 WT)	0.018	0.020		0.943		1
T3A, E61R, P65R, C125S	0.010	0.004		2.308		106
T3A, R38A, P65R, C125S	0.010	0.005		1.786		107
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S	3.178	0.002		1570.934		108
T3A, H16A, R38A, P65R, D84S, C125S	1.971	0.002		977.679		109
T3A, H16A, L19A, P65R, D84S, C125S	50.000	50.000		1.000		110
T3A, H16A, P65R, D84S, N88S, C125S	3.089	0.001		2214.337		111
T3A, H16A, P65R, D84S, E95Q, C125S	3.859	0.001		6093.479		112
T3A, H16A, M23A, P65R, D84S, C125S	3.125	0.001		2698.618		113
T3A, H16A, M23A, P65R, D84S, E95Q, C125S	8.695	0.002		5420.823		114
T3A, H16A, L19A, E61R, P65R, D84S, C125S	10.130	0.002	0.017	6481.126	581.850	115
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	39.420	0.003	0.020	11522.947	1976.931	116
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, N88S, C125S	50.000	0.022		2289.377		117
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, N88S, E95Q, C125S	50.000	0.020		2515.091		118
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, N88S, E95Q, C125S	50.000	0.592		84.517		119
T3A, H16A, L19A, R38A, P65R, D84S, C125S	3.552	0.002		1481.852		120
T3A, H16A, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, C125S	17.460	0.004	0.017	4100.517	1006.920	121
T3A, H16A, M23A, R38A, P65R, D84S, N88S, C125S	50.000	0.008	0.098	6344.373	509.892	122
T3A, H16A, R38A, P65R, D84S, N88S, E95Q, C125S	50.000	0.062		806.712		123
T3A, H16A, M23A, R38A, P65R, D84S, N88S, E95Q, C125S	50.000	0.050		992.654		124
T3A, H16A, L19N, P65R, D84S, C125S	20.090	0.001		21808.511		125
T3A, H16A, L19S, P65R, D84S, C125S	4.017	0.002		2376.923		126
T3A, H16A, L19T, P65R, D84S, C125S	4.372	0.005		858.939		127

10

20

30

40

50

T3A, H16A, L19V, P65R, D84S, C125S	3.716	0.002		1554.812		128
T3A, H16A, L19N, M23A, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	38.460	0.017	0.051	2293.381	748.686	129
T3A, H16A, L19N, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, C125S	37.980	0.044		854.059		130
T3A, H16A, L19N, M23A, R38A, P65R, D84S, C125S	43.330	0.015		2975.962		131
T3A, H16A, L19N, R38A, P65R, D84S, E95Q, C125S	50.000	0.019	0.102	2597.403	491.159	132
T3A, H16A, L19N, R38A, P65R, D84S, C125S	13.810	0.007		1943.155		133
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84S, C125S	17.230	0.006	0.053	2784.421	324.482	134
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	40.080	0.022	0.100	1852.982	400.000	135
T3A, H16A, L19N, M23A, E61R, P65R, D84S, C125S	29.270	0.016		1854.880		136
T3A, H16A, L19N, Q22A, E61R, P65R, D84S, C125S	50.000		0.021		2373.042	137
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84S, R120A, C125S	50.000		0.021		2394.636	138
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84S, C125S, Q126A	50.000		0.043		1170.412	139
T3A, H16S, L19N, E61R, P65R, D84S, C125S	0.211					140
T3A, H16T, L19N, E61R, P65R, D84S, C125S	7.801		0.486		16.048	141
T3A, H16V, L19N, E61R, P65R, D84S, C125S	7.606		0.803		9.478	142
T3A, H16N, L19N, E61R, P65R, D84S, C125S	16.260		0.071		228.467	143
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84T, C125S	3.944		0.019		210.684	144
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84V, C125S	5.757		0.032		178.567	145
T3A, H16A, D20S, E61R, P65R, D84S, C125S	7.658		4.445		1.723	146
T3A, H16A, D20T, E61R, P65R, D84S, C125S	6.151		3.657		1.682	147
T3A, H16A, D20N, E61R, P65R, D84S, C125S	5.554		5.952		0.933	148
T3A, H16A, D20A, E61R, P65R, D84S, C125S	2.994		2.638		1.135	149
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84N, C125S	17.260		0.019		930.458	150
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, N88T C125S	50.000		0.510		98.116	151

10

20

30

40

50

T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, N88A C125S	50.000		0.146		341.997	152
T3A, H16P, L19A, E61R, P65R, D84S, C125S	50.000		3.707		13.488	153
T3A, H16A, L19H, E61R, P65R, D84S, C125S	17.320		0.048		360.833	154
T3A, H16A, L19P, E61R, P65R, D84S, C125S	50.000		50.000		1.000	155
T3A, H16A, L19Q, E61R, P65R, D84S, C125S	17.870		0.042		423.560	156
T3A, H16A, L19Y, E61R, P65R, D84S, C125S	3.936		0.017		228.704	157
T3A, H16A, L19A, E61R, P65R, D84P, C125S	0.122		50.000		0.002	158
T3A, H16A, L19A, E61R, P65R, D84V, C125S	2.822		0.003		857.230	159
T3A, H16A, L19A, E61R, P65R, D84Y, C125S	3.185		0.001		4696.255	160
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95H, C125S	7.203		0.012		603.772	161
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95N, C125S	34.230		0.022		1583.989	162
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95P, C125S	4.867		0.002		2919.616	163
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95S, C125S	50.000		50.000		1.000	164
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95T, C125S	13.220		0.012		1111.859	165
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95V, C125S	13.850		0.064		216.711	166
T3A, H16A, M23A, E61R, P65R, D84S, E95Y, C125S	20.410		0.088		230.726	167
T3A, H16A, L19A, E61A, P65R, D84S, C125S	2.067		0.001		2145.304	168
T3A, H16A, L19A, E61G, P65R, D84S, C125S	3.263		0.000		12202.693	169
T3A, H16A, L19A, E61H, P65R, D84S, C125S	4.534		0.001		8458.955	170
T3A, H16A, L19A, E61N, P65R, D84S, C125S	1.997		0.000		12044.632	171
T3A, H16A, L19A, E61P, P65R, D84S, C125S	8.436		0.002		5137.637	172
T3A, H16A, L19A, E61Q, P65R, D84S, C125S	2.384		0.002		1129.323	173
T3A, H16A, L19A, E61S, P65R, D84S, C125S	3.269		0.001		2534.109	174
T3A, H16A, L19A, E61T, P65R, D84S, C125S	3.233		0.001		3725.942	175
T3A, H16A, L19A, E61V, P65R, D84S, C125S	0.643		0.003		195.797	176
T3A, H16A, L19A, E61Y, P65R, D84S, C125S	4.446		0.004		992.632	177

10

20

30

40

50

T3A, H16A, M23D, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	50.000		0.217		230.627	178
T3A, H16A, M23E, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	24.940		0.020		1275.703	179
T3A, H16A, M23G, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	19.120		0.063		301.958	180
T3A, H16A, M23I, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	17.790		0.011		1648.749	181
T3A, H16A, M23K, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	50.000		0.015		3405.995	182
T3A, H16A, M23L, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	5.657		0.004		1589.045	183
T3A, H16A, M23N, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	50.000		0.013		3808.073	184
T3A, H16A, M23P, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	50.000		50.000		1.000	185
T3A, H16A, M23Q, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	18.060		0.024		740.771	186
T3A, H16A, M23R, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	50.000		0.031		1627.604	187
T3A, H16A, M23T, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	22.720		0.030		746.632	188
T3A, H16A, M23V, E61R, P65R, D84S, E95Q, C125S	8.393		0.019		449.545	189
T3A, H16A, Q22A, E61R, P65R, D84S, C125S	6.656		0.052		128.222	190
T3A, H16A, Q22D, E61R, P65R, D84S, C125S	8.855		0.065		136.042	191
T3A, H16A, Q22E, E61R, P65R, D84S, C125S	50.000		14.320		3.492	192
T3A, H16A, Q22G, E61R, P65R, D84S, C125S	8.201		0.083		98.310	193
T3A, H16A, Q22H, E61R, P65R, D84S, C125S	6.329		0.064		98.721	194
T3A, H16A, Q22K, E61R, P65R, D84S, C125S	2.178		0.020		110.111	195
T3A, H16A, Q22N, E61R, P65R, D84S, C125S	3.134		0.022		140.854	196
T3A, H16A, Q22P, E61R, P65R, D84S, C125S	50.000		45.710		1.094	197
T3A, H16A, Q22R, E61R, P65R, D84S, C125S	2.745		0.017		159.315	198
T3A, H16A, Q22S, E61R, P65R, D84S, C125S	3.131		0.024		129.273	199
T3A, H16A, Q22T, E61R, P65R, D84S, C125S	3.338		0.031		108.061	200
T3A, H16A, Q22V, E61R, P65R, D84S, C125S	4.837		0.050		96.759	201
T3A, H16A, Q22Y, E61R, P65R, D84S, C125S	5.823		0.090		65.061	202
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120A, C125S	1.628		0.011		153.440	203

10

20

30

40

50

T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120D, C125S	3.164		0.049		65.210	204
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120E, C125S	1.115		0.014		82.531	205
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120F, C125S	2.017		0.018		114.278	206
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120G, C125S	1.829		0.013		141.345	207
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120H, C125S	1.512		0.012		130.570	208
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120K, C125S	2.594		0.023		114.323	209
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120N, C125S	3.724		0.040		92.522	210
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120P, C125S	50.000		50.000		1.000	211
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120Q, C125S	2.308		0.026		90.227	212
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120S, C125S	3.528		0.032		110.250	213
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120T, C125S	50.000		50.000		1.000	214
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120V, C125S	4.939		0.062		80.231	215
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, R120Y, C125S	2.385		0.021		116.341	216
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, T123D, C125S	13.010		0.041		320.364	217
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, T123E, C125S	2.191		0.019		115.865	218
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, T123H, C125S	18.790		0.053		352.798	219
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, T123K, C125S	11.010		0.050		219.279	220
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, T123N, C125S	18.150		0.094		192.389	221
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, T123Q, C125S	2.337		0.036		64.665	222
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, T123R, C125S	1.934		0.043		44.634	223
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S130D	50.000		50.000		1.000	224
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S130E	50.000		0.064		784.437	225
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S130K	11.950		0.033		361.683	226
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S130N	10.390		0.028		374.549	227
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S130Q	7.463		0.022		340.776	228
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S130R	8.598		0.029		291.853	229

10

20

30

40

50

T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S127D	50.000		0.085		591.296	230
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S127E	5.134		0.015		351.403	231
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S127H	7.078		0.020		349.531	232
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S127P	50.000		0.017		2915.452	233
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S127Q	50.000		50.000		1.000	234
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, S127R	4.921		50.000		0.098	235
T3A, H16A, L19A, Q22A, R38A, P65R, D84S, C125S	5.448		0.017		315.278	236
T3A, H16A, L19A, R38A, P65R, D84S, R120A, C125S	5.476		0.035		154.340	237
T3A, H16A, L19A, Q22A, R38A, P65R, D84S, R120A, C125S	7.176		0.045		158.691	238
T3A, H16A, Q22A, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, C125S	50.000		0.184		272.331	239
T3A, H16A, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, R120A, C125S	21.330		0.057		372.707	240
T3A, H16A, Q22A, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, R120A, C125S	50.000		0.274		182.216	241
T3A, H16A, L19N, Q22A, R38A, P65R, D84S, C125S	50.000		0.524		95.511	242
T3A, H16A, L19N, R38A, P65R, D84S, R120A, C125S	41.050		0.064		643.720	243
T3A, H16A, L19N, Q22A, R38A, P65R, D84S, R120A, C125S	50.000		0.197		253.936	244
A1G, P2G, T3S, S4G, S5G, H16A, L19A, R38A, P65R, D84S, C125S	4.674		0.018		256.531	245
Δ 1-5, H16A, L19A, R38A, P65R, D84S, C125S	5.030		0.015		328.758	246
Δ 1-5, H16A, L19A, R38A, P65R, D84S, C125V	5.170		0.015		349.561	247
T3A, L19N, R38A, P65R, D84S, C125S	10.300		0.021		499.515	248
T3A, H16A, L19N, R38A, P65R, C125S	2.102		0.008		276.216	249
T3A, L19N, Q22A, R38A, P65R, D84S, C125S	15.060		0.048		314.208	250
T3A, H16A, L19N, Q22A, R38A, P65R, C125S	3.184		0.017		189.186	251

10

20

30

40

50

T3A, L19N, Q22A, R38A, P65R, D84S, R120A, C125S	13.730		0.073		188.910	252
T3A, H16A, L19N, Q22A, R38A, P65R, R120A, C125S	2.064		0.021		98.993	253
T3A, Q22A, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, C125S	10.370		0.140		73.966	254
T3A, Q22A, M23A, R38A, P65R, E95Q, C125S	2.063		0.028		73.364	255
T3A, Q22A, M23A, R38A, P65R, D84S, E95Q, R120A, C125S	10.600		0.148		71.767	256
T3A, H16A, Q22A, M23A, R38A, P65R, E95Q, R120A, C125S	4.556		0.126		36.187	257
T3A, L19A, Q22A, R38A, P65R, D84S, C125S	2.091		0.054		38.946	258
T3A, H16A, L19A, Q22A, R38A, P65R, C125S	0.503		0.024		21.148	259
T3A, L19A, Q22A, R38A, P65R, D84S, R120A, C125S	1.796		0.054		33.265	260
T3A, H16A, L19A, Q22A, R38A, P65R, R120A, C125S	0.327		0.013		24.837	261
T3A, H16A, L19A, E61R, P65R, D84S, C125S	6.083		0.023		264.134	115
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, I129A	2.062		0.0422		49	262
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, I129H	1.435		0.0697		21	263
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, I129R	26.220		0.0648		405	264
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125S, I129S	16.170		0.0561		288	265
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125C, Q126N	2.062		0.042		49	266
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125C, Q126Y	1.435		0.070		21	267
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125C, S127N	26.220		0.065		405	268
T3A, H16A, E61R, P65R, D84S, C125C, S130P	16.170		0.056		288	269

10

20

30

40

【 0 4 2 2 】

50

## 【表 1 4】

表 1 4 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの E C <sub>50</sub>

I L - 2 修飾	非標的化 E C <sub>50</sub> (nM)	C D 8 a 標 的化 E C <sub>50</sub> (nM)	C D 8 a ウ ィンドウ	配列 番号
T3A, H16A, E61R, P65R, D84Y, C125S	4.515	0.011	400	270
T3A, H16A, M23T, E61R, P65R, D84Y, E95Q, C125S	50.000	0.057	871	271
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84Y, C125S	50.000	0.074	673	272
T3A, H16A, L19N, M23T, E61R, P65R, D84Y, E95Q, C125S	50.000	50.000	1	273
T3A, H16A, E61R, P65R, D84Y, C125S, S127D	50.000	0.088	568	274
T3A, H16A, M23T, E61R, P65R, D84Y, E95Q, C125S, S127D	50.000	50.000	1	275
T3A, H16A, L19N, E61R, P65R, D84Y, C125S, S127D	50.000	50.000	1	276
T3A, H16A, L19N, M23T, E61R, P65R, D84Y, E95Q, C125S, S127D	50.000	50.000	1	277

10

20

## 【 0 4 2 3】

実施例 2 6 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの非標的化活性対標的化活性

本明細書に記載のポリペプチドの非標的化 I L - 2 レポーター活性及び標的化 I L - 2 レポーター活性を、上記の I L - 2 レポーターアッセイにおいて決定された非標的化 E C <sub>50</sub> 及び標的化 E C <sub>50</sub> をプロットすることによって分析し、比較した。図 2 6 A は、分析に含まれる I L - 2 突然変異体の非標的化活性を示す。このグラフは、三量体 I L - 2 受容体に対する I L - 2 突然変異体の親和性の低下を示す。図 2 6 B 及び図 2 6 C は、非標的化 E C <sub>50</sub> に対する P D - 1 及び N K p 4 6 の標的化 E C <sub>50</sub> のプロットをそれぞれ示す。これらの比較から、高親和性 V H H によって P D - 1 又は N K p 4 6 に標的化される場合に低親和性 I L - 2 突然変異体のシグナル伝達の高まることが示される。図 2 6 D 及び図 2 6 E は、実施例 2 5 に記載のように算出される P D - 1 及び N K p 4 6 標的化ウィンドウをそれぞれ示す。これらのグラフは、非標的化 I L - 2 活性を回避した上で標的化活性が達成される濃度範囲を示す。

30

## 【 0 4 2 4】

実施例 2 7 : 修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの活性

T C R 結合 V H H の C 末端に融合された修飾 I L - 2 を含むポリペプチドの相対活性を、フローサイトメトリーにより P B M C の p S T A T 5 レベルを測定することによって決定した。このポリペプチドは、一価 T C R 結合ポリペプチド又は二価 T C R 結合ポリペプチドを形成するように選択された F c 領域を含む。ポリペプチドの構造を下記表に示す。

40

## 【 0 4 2 5】

50

## 【表 15】

表 15 : 修飾 IL-2 を含む  $\gamma\delta$  TCR 標的化ポリペプチド

ポリペプチド	価数	配列番号
$\gamma\delta$ TCR 5C8 VHH-xELL ホール T366 S、L368A、Y407V、H435R Fc ; xELL ノブ Fc-IL-2-T3G-P65R-H16A-D84S-C125S ; 図 27A、図 27B	一価	294, 295
$\gamma\delta$ TCR 5C8 VHH-xELL ホール T366 S、L368A、Y407V、H435R Fc ; $\gamma\delta$ TCR 5C8 VHH-xELL ノブ Fc-IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S ; 図 27C、図 27D	二価	295, 296
$\gamma\delta$ TCR 6C4 VHH-xELL ホール T366 S、L368A、Y407V、H435R Fc ; $\gamma\delta$ TCR 6C4 VHH-xELL ノブ Fc-IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S ; 図 27E、図 27F	二価	298, 299
410A9v1 (非標的化) VHH-xELL ホール T366 S、L368A、Y407V H435R Fc ; $\gamma\delta$ TCR 6C4 VHH-xELL ノブ Fc-IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S ; 図 27G、図 27H	一価	298, 300

10

20

## 【0426】

PBMC を健常ドナーの leukopak から lymphoprep 密度勾配遠心分離によって単離した。細胞を以下の蛍光結合抗体により室温で 20 分間標識した：非競合抗 TCR-FITC、抗 CD3-BV785、及び抗 CD56-BV421。洗浄後に 1 ウェル当たり 200000 個の PBMC を 96 ウェルプレートに播種した。細胞を上記表に記載の融合タンパク質の力価測定で処理し、100 nM の初期濃度から開始し、プレート全体を 1 : 5 で二連にて力価測定した。プレートを 37 / 5% CO<sub>2</sub> で 20 分間インキュベートした。細胞を BD Cytotfix / Cytoperm (商標) (BD Biosciences) で固定し、90% 氷冷メタノール中で透過処理し、リン酸化部位特異的抗 pSTAT5-PE 抗体 (1 : 70) を用いるフローサイトメトリーを用いて T 細胞上のリン酸化 STAT5 (「pSTAT5」) のレベルを測定した。

30

## 【0427】

図 27A ~ 図 27H に示されるように、様々な二価 TCR 標的化修飾 IL-2 ポリペプチド又は一価 TCR 標的化修飾 IL-2 ポリペプチドによる処理は、T 細胞で特異的に pSTAT5 + T 細胞の割合及び pSTAT5 中央蛍光強度を用量依存的に増加させた。対照的に、100 nM 未満で NK 細胞又は T 細胞上の pSTAT5 活性化は殆ど見られなかった。

40

## 【0428】

実施例 28 : 修飾 IL-2 を含むポリペプチドの活性

TCR 結合 VHH 又は非標的化 VHH の C 末端に融合された修飾 IL-2 を含むポリペプチドの相対活性を、T 細胞、並びに T 細胞の増殖及び蓄積を測定することによって決定した。ポリペプチドは、一価ポリペプチド又は二価ポリペプチドを形成するように選択された Fc 領域を含む。ポリペプチドの構造を下記表に示す。

## 【0429】

50

## 【表 16】

表 16：修飾 IL-2 を含む  $\gamma\delta$  TCR 標的化及び非標的化ポリペプチド

ポリペプチド	価数	配列番号
$\gamma\delta$ TCR 5C8 VHH-x ELLノブFc-IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S; x ELLホールFc H435R、T366S、L368A、Y407V	一価	64, 296
非標的化VHH-x ELLホールT366S、L368A、Y407V H435R Fc; 非標的化VHH-x ELLノブFc-IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S	N/A	300, 301

10

## 【0430】

IL-2 は、T細胞集団の活性化及び増殖を促進する。T細胞増殖に対する TCR 標的化修飾 IL-2 の影響を評価するために、PBMC を健常ドナーの leukopak から lymphoprep 密度勾配培地を用いて単離した。細胞を CellTrace Violet 増殖色素により 37 で 10 分間標識した。洗浄後に細胞を RPMI + 10% FBS に再懸濁し、1 ウェル当たり 300000 個の細胞を 96 ウェルプレートに添加した。細胞を上記表に記載の融合タンパク質の力価測定で処理し、100 nM の初期濃度から開始し、プレート全体を 1 : 5 で二連にて力価測定した。プレートを 37 / 5% CO<sub>2</sub> で 7 日間インキュベートした。細胞を以下の蛍光結合抗体：CD3-BV785、TCR-FITC、及び生存性色素ヨウ化プロピジウムにより 4 で 30 分間標識した。細胞を洗浄し、フローサイトメトリーによって分析した。

20

## 【0431】

図 28A ~ 図 28D に示されるように、TCR 標的化修飾 IL-2 による処理は、T細胞の増殖及び蓄積を用量依存的に増加させた(図 28A 及び図 28B)。付随する T細胞の減少とともに、全 CD3<sup>+</sup> 集団中の T細胞の割合も TCR 標的化修飾 IL-2 処理によって増加した。T細胞集団が TCR 標的化修飾 IL-2 による処理に応答して増殖又は蓄積しなかったため、この影響は T細胞に特異的であった(図 28C 及び図 28D)。修飾 IL-2 に融合された非標的化 VHH は、試験した用量で T細胞又は T細胞のいずれの増殖も促進せず、標的化修飾 IL-2 ポリペプチドの標的特異性が実証された。

30

## 【0432】

実施例 29：修飾 IL-2 を含むポリペプチドの活性

修飾 IL-2 を含むポリペプチドの相対活性を、フローサイトメトリーにより PBMC の pSTAT5 レベルを測定することによって決定した。ポリペプチドの構造を下記表に示す。

## 【0433】

## 【表 17】

表 17：修飾 IL-2 を含むポリペプチド

ポリペプチド	配列番号
野生型 IL-2	1
非標的化VHH-x ELLホールT366S、L368A、Y407V H435R Fc; 410A9v1 非標的化VHH-x ELLノブFc-IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S	300, 301

40

## 【0434】

pSTAT5 のレベルを、IL-2 受容体連結及びシグナル伝達の近接読み出し値として細胞内フローサイトメトリーによって測定した。ヒト PBMC を 96 ウェルプレートに

50

て1ウェル当たり1000000個の細胞で完全増殖培地(RPMI、10%FBS、1%抗生物質-抗真菌剤)中にプレATINGした。次いで、試験ポリペプチドを希釈し、5倍段階希釈を行った。段階希釈物を細胞に添加し、37℃で15分間インキュベートした。次いで、細胞を100μLのCytotfix固定バッファー(BD)中にて4℃で30分間固定した。次いで、細胞を200μLのFACSバッファー中で1回洗浄し、Permbuffer III(BD Phosflow)中にて4℃で30分間透過処理した。透過処理した細胞をPermeabilization Buffer(eBioscience)中で合計3回洗浄した後、CD4(OKT4、1:100)、CD3(SP34-2、1:50)、CD16(3G8、1:1000)、pSTAT5(SRBCZX、1:70)、CD56(NCAM16.2、1:500)、及びCD8(RPA-T8、1:4000)に対する蛍光標識抗体を含有するPermeabilization Buffer中にて4℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞を150μLのFACSバッファーで洗浄し、ACEA Biosciences Novocyte-Quantonフローサイトメーターを用いて分析した。IL-2シグナル伝達を、NK細胞(CD3-CD56brightCD16-)上のpSTAT5を検出する蛍光標識抗体の頻度及び中央蛍光強度レベルの増加によって定量化した。GraphPad Prism分析ソフトウェアを用いてデータをプロットし、分析した。

10

## 【0435】

図29A及び図29Bに示されるように、野生型IL-2は、細胞を用量依存的に活性化し、野生型組換えIL-2のEC<sub>50</sub>は、およそ0.06nMであった。T3A、H16A、E61R、P65R、D84Y、及びC125S突然変異を含むIL-2変異体を含むポリペプチドは、野生型IL-2と比較して顕著に弱まった活性を示した。

20

## 【0436】

本開示は、本発明の趣旨又は本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化され得る。したがって、上述の実施形態は、全ての点で例示としてみなされるべきであって、本開示を限定するものとはみなされない。したがって、本開示の範囲は、上述の詳細な説明ではなく、添付の特許請求の範囲によって示されるため、特許請求の範囲の意味及び均等の範囲内にある全ての変更は、本明細書に含まれることが意図される。

## 【0437】

30

40

50

【表 18】

或る特定の配列の表

配列番号	説明	配列
1	野生型ヒトIL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	IL-2v	AP[A]SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT[A]KFA[AMP]KKATE LKHLQCLEEBELKPLEEVLN[A]QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE EYADETATIVEFLNRWITFA[Q]SIIISTLT
3	IL-2-P65R	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK[R]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
4	IL-2-H16A	APTSSSTKKTQLQLE[A]LLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
5	IL-2-D84S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR[S]LISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
6	IL-2-E15S	APTSSSTKKTQLQLE[S]HLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
7	IL-2-M23A	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[A]I LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
8	IL-2-E95Q	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL[Q]LKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
9	IL-2-P65E	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK[E]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
10	IL-2-F42K	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT[K]KFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
11	IL-2-H16A-F42K	APTSSSTKKTQLQLE[A]LLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT[K]KFYMPKKATE LKHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
12	IL-2-D84S-F42K	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT[K]KFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR[S]LISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
13	IL-2-E15S-F42K	APTSSSTKKTQLQLE[S]HLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT[K]KFYMPKKATE LKHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
14	IL-2-M23A-F42K	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ[A]I LNGINNYKNPKLTRMLT[K]KFYMPKKATE LKHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
15	IL-2-E95Q-F42K	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT[K]KFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL[Q]LKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
16	IL-2-P65R-H16A	APTSSSTKKTQLQLE[A]LLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK[R]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
17	IL-2-P65R-D84S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK[R]LEEVLNLAQSKNFHLRPR[S]LISNINVIVLELKGSETTFMCE EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
18	IL-2-P65R-E15S	APTSSSTKKTQLQLE[S]HLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK[R]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

10

20

30

40

50

19	IL-2-P65R-M23A	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
20	IL-2-P65R-E95Q	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> L <sup>Q</sup> LKGSETTFMC YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
21	IL-2-P65R-H16A-D84S (IL-2-RAS)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPR <sup>S</sup> LISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
22	IL-2-T3A-C125S	AP <sup>A</sup> SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
23	IL-2-T3A-P65R-C125S	AP <sup>A</sup> SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
24	IL-2-T3A-H16A-C125S	AP <sup>A</sup> SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMC YADETATIVEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
25	IL-2-T3A-D84S-C125S	AP <sup>A</sup> SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPR <sup>S</sup> LISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
26	IL-2-T3A-H16A-P65R-C125S	AP <sup>A</sup> SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMC YADETATIVEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
27	IL-2-T3A-P65R-D84S-C125S	AP <sup>A</sup> SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPR <sup>S</sup> LISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMC YADETATIVEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
28	IL-2-T3A-H16A-P65R-D84S-C125S	AP <sup>A</sup> SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPR <sup>S</sup> LISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
29	IL-2-なし 9-H16A-P65R-C125S	TQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEBE LK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
30	IL-2-なし 9-P65R-D84S-C125S	TQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEBE LK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPR <sup>S</sup> LISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
31	IL-2-なし 9-H16A-P65R-D84S-C125S	TQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEBE LK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPR <sup>S</sup> LISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITF <sup>S</sup> QSIISTLT
32	野生型IL-2-xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKHTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMI <sup>S</sup> RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI <sup>S</sup> SKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK <sup>T</sup> TPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV <sup>F</sup> SCSV <sup>M</sup> HEALHNHYTQKSLSLSPGK
33	IL-2-F42K-xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTKKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKHTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMI <sup>S</sup> RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI <sup>S</sup> SKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK <sup>T</sup> TPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV <sup>F</sup> SCSV <sup>M</sup> HEALHNHYTQKSLSLSPGK
34	IL-2-P65E-xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI <sup>A</sup> ILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELK <sup>R</sup> LLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI <sup>V</sup> LELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKHTHTCPPCPAPGGPSVFLFP

10

20

30

40

50

		PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
35	IL-2-P65R-xELL 「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
36	IL-2-F42K-D84S -xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTKKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
37	IL-2-F42K-E95Q -xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTKKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
38	IL-2-F42K-M23A -xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTKKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
85	IL-2-F42K-E15S -xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTKKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
39	IL-2-H16A-F42K -xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTKKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLF PPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
40	IL-2-H16A-xELL 「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
41	IL-2-P65R-H16A -xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFP

10

20

30

40

50

		PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	IL-2-P65R-D84S -xELL「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFK F YMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSI I STLT PGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	IL-2-RAS-xELL 「ノブ」Fc	APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFK F YMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSI I STLT PGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	リンカー-EVN xELL「ホール」Fc	KPGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	xELL「ノブ」Fc-IL -2-T3G-C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGSAPGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFK F YMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSI I STLT
46	xELL「ノブ」Fc-IL -2-RAS-T3G -C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGSAPGSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFK F YMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSI I STLT
47	Fc領域1 (ヒト野生型IgG1)	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
48	Fc領域2 (ヒトIgG1 xELL「ノブ」)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
49	Fc領域3(ヒトIgG1 EVN xELL 「ホール」I253R)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
50	Fc領域	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
51	Fc領域xELL	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

		SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG
52	Fc領域xELL H435R	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG
53	Fc領域xELL M252Y及び M428V(YV)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG
54	Fc領域xELL M252Y及び M428L(YL)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNNH YTQKSLSLSPG
55	Fc領域xELL M252Y、M428L、 H435R(YLR)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNNH YTQKSLSLSPG
56	Fc領域xELL M252Y、M428V、 H435R(YVR)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG
57	Fc領域xELL S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG
58	Fc領域xELL H435R S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG
59	Fc領域xELL M252Y及び M428V(YV) S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG
60	Fc領域xELL M252Y及び M428L(YL) S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNNH YTQKSLSLSPG
61	Fc領域xELL M252Y、M428L、 H435R(YLR) S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNNH YTQKSLSLSPG
62	Fc領域xELL M252Y、M428V、 H435R(YVR)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE

10

20

30

40

50

	S354C T366Wノブ	SNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	
63	Fc領域xELL T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	
64	Fc領域xELL H435R、T366S、 L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	
65	Fc領域xELL M252Y及び M428V(YV) T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	10
66	Fc領域xELL M252Y及び M428L(YL) T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	
67	Fc領域xELL M252Y、M428L、 H435R(YLR) T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	20
68	Fc領域xELL M252Y、M428V、 H435R(YVR) T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	
69	Fc領域H435R	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG	
70	Fc領域M252Y 及びM428V(YV)	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNHYTQKSLSLSPG	30
71	Fc領域M252Y 及びM428L(YL)	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNHYTQKSLSLSPG	
72	Fc領域M252Y、 M428L、 H435R(YLR)	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG	
73	Fc領域M252Y、 M428V、	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTP EVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV	40

10

20

30

40

50

	H435R(YVR)	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
74	Fc領域S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
75	Fc領域H435R S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
76	Fc領域M252Y 及びM428L(YL) S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
77	Fc領域M252Y、 M428L、 H435R(YLR) S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
78	Fc領域M252Y、 M428V、 H435R(YVR) S354C T366Wノブ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
79	Fc領域T366S、 L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
80	Fc領域H435R、 T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
81	Fc領域M252Y 及びM428V(YV) T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
82	Fc領域M252Y 及びM428L(YL) T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG
83	Fc領域M252Y、 M428L、 H435R(YLR) T366S、L368A、 Y407Vホール	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

84	切断された野生型ヒトIL-2	QLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I	
86	xELL-ノブFc-IL-2-T3A, C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I	
87	xELL-ノブFc-IL-2-RAS-T3A, C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I	10
88	ペンブロリズマブ類縁体ノブFc-IL-2-RAS-T3A, C125S	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCSKASGYFTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGINP SNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I	20
89	ペンブロリズマブ類縁体ホールFc	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCSKASGYFTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGINP SNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
90	ペンブロリズマブ軽鎖類縁体	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30
91	ペンブロリズマブ類縁体IL-2-RAS-T3G, C125S	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCSKASGYFTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGINP SNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI I	
92	NKp46-scFv xELL-ノブFc-IL-2-RAS-T3A,	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTFTDYVINWVKQRSGQGLEWIGETYPGGSTNYNEKFKAKATLTADKSNIAVMQLSSLTSEDSAVYFCARRGRYGLYAMDYWGQGTSTVTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDIQTMTTSSLSASLGDRTVISCRAQDQISNYLWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT	40

10

20

30

40

50

	C125S	INNLEQEDDIATYFCQQGNTRPWTFFGGGKLEIKP[GGGG]DKHTCPCPPAPGGP SVFLFPPKPKDTLMI[S]RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPP[C]RDELTKNQVSL[Q]CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY[D]TTPP VLDSGDSFFLYS[D]LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN[RY]TQKLSLSLSP[GGG] [GGG]AP[AS]SSSTKKTQLQLE[A]LLLDLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTFKFKYMPKK ATELKHLCLEBEELK[R]LEEVNLAQSKNFHLRPR[SL]ISNINVIIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITF[S]QSIISTLT
93	NKp46-scFv xELL-ホールFc	QVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGGLEWIGETIYP GSGTNYINEKFKAKATLTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGRYGLYA MDYWGQGTSTVTVSS[VEGGSGGSGGSGGSGGV]DIQMTQTSSLSASLGDRTI SCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT INNLEQEDDIATYFCQQGNTRPWTFFGGGKLEIKP[GGGG]DKHTCPCPPAPGGP SVFLFPPKPKDTLMI[S]RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQV[C]TLPPSRD[K]LTKNQVSL[S]C[A]VKGFYPSDIAVEW[K]SNGQPENNYKTTTPP VLDS[K]GDSFFL[V]SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
94	NKp46-scFv xELL-Fc	QVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGGLEWIGETIYP GSGTNYINEKFKAKATLTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGRYGLYA MDYWGQGTSTVTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQMTQTSSLSASLGDRTI SCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT INNLEQEDDIATYFCQQGNTRPWTFFGGGKLEIKP[GGGG]DKHTCPCPPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI[S]RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
95	LAG3-MAb xELL-ノブFc-IL-2 -RAS-TGCS	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAPGGLEWIMGWINA NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDIYDSSDQ LNVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKEVPEKSCDKHTCPCPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI[S]RTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP[C]RDELTKNQVSL[Q]C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSP[GGSGG]AP[AS]SSSTKKTQLQLE[A]LLLDL QMLNNGINNYKNPKLTRMLTFKFKYMPKATELKHLCLEBEELK[R]LEEVNLAQ SKNFHLRPR[SL]ISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF[S]Q SIISTLT
96	LAG3-MAb xELL-ホールFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAPGGLEWIMGWINA NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDIYDSSDQ LNVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKEVPEKSCDKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMI[R]SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV[C]TLPPSRDELTKNQVSL[S]C[A]VK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL[V]SKLTVDKSRWQQGNV FCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
97	LAG3-MAb軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQASIWPLTFGGGKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
98	LAG3-MAb IgG1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAPGGLEWIMGWINA NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDIYDSSDQ LNVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKEVPEKSCDKHTCPCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI[S]RTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

10

20

30

40

50

99	LAG3-VHH xELL-ノブFc-IL -2-RAS-TGCS	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGRTFSQYVMGWFRRQAPGKEREFVAAISES GGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLLWWTSEY APIKANDYDYWGQGLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQ LQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELK RLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
100	LAG3-VHH xELL-ホール T366S, L368A, Y407V, H435R Fc	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGRTFSQYVMGWFRRQAPGKEREFVAAISES GGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLLWWTSEY APIKANDYDYWGQGLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
101	LAG3-VHH xELL-ノブFc	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGRTFSQYVMGWFRRQAPGKEREFVAAISES GGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLLWWTSEY APIKANDYDYWGQGLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
102	xELL-ノブFc-IL -2-RAS-M23A -T3A, C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKLSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKL TRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELK RLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
103	xELL-ノブFc-IL -2-RAS-E95Q -T3A, C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKLSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKL TRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELK RLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
104	xELL-ノブFc-IL -2-RAS-M23A -E95Q-T3A, C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKLSLSLSPGGSGGSAFSSSTKKTQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKL TRMLTFKGYMPKKA TELKHLQCLEEELK RLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
105	IL-2-T3G-C125S	APGSSSTKKTQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKA TEL KHLQCLEEELKPLLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
106	IL-2-T3A-E61R- P65R-C125S	APASSSTKKTQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKA TEL KHLQCLERELKRLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
107	IL-2-T3A-R38A- P65R-C125S	APASSSTKKTQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKA TEL KHLQCLEEELKRLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
108	IL-2-T3A-H16A- E61R-P65R-D84S- C125S	APASSSTKKTQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKA TEL KHLQCLERELKRLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
109	IL-2-T3A-H16A- R38A-P65R-D84S- C125S	APASSSTKKTQLEALLLDLQMI LINGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKA TEL KHLQCLEEELKRLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

50

110	IL-2-T3A-H16A-L19A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLALQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
111	IL-2-T3A-H16A-P65R-D84S-N88S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISSINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
112	IL-2-T3A-H16A-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
113	IL-2-T3A-H16A-M23A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
114	IL-2-T3A-H16A-M23A-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
115	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
116	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
117	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-N88S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISSINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
118	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-N88S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISSINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
119	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-N88S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISSINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
120	IL-2-T3A-H16A-L19A-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
121	IL-2-T3A-H16A-M23A-R38A-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
122	IL-2-T3A-H16A-M23A-R38A-P65R-D84S-N88S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISSINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
123	IL-2-T3A-H16A-R38A-P65R-D84S-N88S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISSINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
124	IL-2-T3A-H16A-M23A-R38A-P65R-IL-2-D84S-N88S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQAILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISSINVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
125	IL-2-T3A-H16A-L19N-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
126	IL-2-T3A-H16A-L19S-P65R-D84S-	APASSSTKKTQLQLEALLSDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

	C125S	
127	IL-2-T3A-H16A-L19T-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLTDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
128	IL-2-T3A-H16A-L19V-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLVDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
129	IL-2-T3A-H16A-L19N-M23A-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
130	IL-2-T3A-H16A-L19N-M23A-R38A-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQAILNGINNYKNPKLTAMLTTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
131	IL-2-T3A-H16A-L19N-M23A-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQAILNGINNYKNPKLTAMLTTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
132	IL-2-T3A-H16A-L19N-R38A-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTAMLTTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
133	IL-2-T3A-H16A-L19N-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTAMLTTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
134	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
135	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
136	IL-2-T3A-H16A-L19N-M23A-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
137	IL-2-T3A-H16A-L19N-Q22A-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLAMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
138	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84S-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
139	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84S-C125S-Q126A	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSASIIISTLT
140	IL-2-T3A-H16S-L19N-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLESLLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
141	IL-2-T3A-H16T-L19N-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLETLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
142	IL-2-T3A-H16V-L19N-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEVLLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

50

143	IL-2-T3A-H16N-L19N-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEENLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
144	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84T-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
145	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84V-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRVLSININVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
146	IL-2-T3A-H16A-D20S-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLSLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
147	IL-2-T3A-H16A-D20T-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLTLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
148	IL-2-T3A-H16A-D20N-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
149	IL-2-T3A-H16A-D20A-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLALQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
150	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84N-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRNLSININVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
151	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-N88T-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISTININVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
152	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-N88A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISA INVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
153	IL-2-T3A-H16P-L19A-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEPLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
154	IL-2-T3A-H16A-L19H-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLHDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
155	IL-2-T3A-H16A-L19P-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLPDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
156	IL-2-T3A-H16A-L19Q-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLQDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
157	IL-2-T3A-H16A-L19Y-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLYDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
158	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61R-P65R-D84P-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRPLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
159	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61R-P65R-D84V-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRVLSININVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
160	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61R-P65R-D84Y-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRYLSININVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

50

161	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95H-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLHLLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
162	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95N-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLNLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
163	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95P-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLPLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
164	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLSLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
165	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95T-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLTLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
166	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95V-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLVLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
167	IL-2-T3A-H16A-M23A-E61R-P65R-D84S-E95Y-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLYLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
168	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEAELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
169	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61G-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEGELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
170	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61H-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEHELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
171	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61N-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLENELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
172	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61P-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEPELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
173	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61Q-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEQELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
174	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61S-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLESELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
175	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61T-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLETELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
176	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61V-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEVELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

50

177	IL-2-T3A-H16A-L19A-E61Y-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEYELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
178	IL-2-T3A-H16A-M23D-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQDILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
179	IL-2-T3A-H16A-M23E-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQEI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
180	IL-2-T3A-H16A-M23G-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQGI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
181	IL-2-T3A-H16A-M23I-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
182	IL-2-T3A-H16A-M23K-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQKI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
183	IL-2-T3A-H16A-M23L-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQL LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
184	IL-2-T3A-H16A-M23N-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQNI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
185	IL-2-T3A-H16A-M23P-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQPI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
186	IL-2-T3A-H16A-M23Q-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQQI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
187	IL-2-T3A-H16A-M23R-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQRI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
188	IL-2-T3A-H16A-M23T-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQTI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
189	IL-2-T3A-H16A-M23V-E61R-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQVI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
190	IL-2-T3A-H16A-Q22A-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLAMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
191	IL-2-T3A-H16A-Q22D-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLDMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
192	IL-2-T3A-H16A-Q22E-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLEMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

50

193	IL-2-T3A-HI6A-Q22G-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLGMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
194	IL-2-T3A-HI6A-Q22H-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLHMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
195	IL-2-T3A-HI6A-Q22K-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLKMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
196	IL-2-T3A-HI6A-Q22N-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLNMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
197	IL-2-T3A-HI6A-Q22P-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLPMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
198	IL-2-T3A-HI6A-Q22R-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLRMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
199	IL-2-T3A-HI6A-Q22S-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLSMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
200	IL-2-T3A-HI6A-Q22T-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLTMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
201	IL-2-T3A-HI6A-Q22V-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLVMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
202	IL-2-T3A-HI6A-Q22Y-E61R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLYMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
203	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
204	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120D-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNDWITFSQSIISTLT
205	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120E-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNEWITFSQSIISTLT
206	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120F-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNFWITFSQSIISTLT
207	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120G-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNGWITFSQSIISTLT
208	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120H-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNHWITFSQSIISTLT
209	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120K-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNKWITFSQSIISTLT
210	IL-2-T3A-HI6A-E61R-P65R-D84S-R120N-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNNWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

50

211	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-R120P-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNPWITFSQSIISTLT
212	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-R120Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNQWITFSQSIISTLT
213	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-R120S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNSWITFSQSIISTLT
214	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-R120T-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNTWITFSQSIISTLT
215	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-R120V-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNVWITFSQSIISTLT
216	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-R120Y-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNYWITFSQSIISTLT
217	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-T123D-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWIDFSQSIISTLT
218	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-T123E-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWIEFSQSIISTLT
219	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-T123H-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWIHFSQSIISTLT
220	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-T123K-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWIKFSQSIISTLT
221	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-T123N-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWINFSQSIISTLT
222	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-T123Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWIQFSQSIISTLT
223	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-T123R-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWIRFSQSIISTLT
224	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S130D	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIIDTLT
225	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S130E	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI IETLT
226	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S130K	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI IKTLT
227	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S130N	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI INTLT
228	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S130Q	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI IOTLT

10

20

30

40

229	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S130R	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
230	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S127D	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQDIISTLT
231	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S127E	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQEIISTLT
232	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S127H	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQHIISTLT
233	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S127P	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQPIISTLT
234	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S127Q	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQQIISTLT
235	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-S127R	APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLERELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQRIISTLT
236	IL-2-T3A-H16A-L19A-Q22A-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLAMI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
237	IL-2-T3A-H16A-L19A-R38A-P65R-D84S-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLAMI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
238	IL-2-T3A-H16A-L19A-Q22A-R38A-P65R-D84S-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLAMI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
239	IL-2-T3A-H16A-Q22A-M23A-R38A-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLAAI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
240	IL-2-T3A-H16A-M23A-R38A-P65R-D84S-E95Q-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQAI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
241	IL-2-T3A-H16A-Q22A-M23A-R38A-P65R-D84S-E95Q-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLAAI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLQLKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
242	IL-2-T3A-H16A-L19N-Q22A-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLAMI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
243	IL-2-T3A-H16A-L19N-R38A-P65R-D84S-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLAMI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
244	IL-2-T3A-H16A-L19N-Q22A-	APASSSTKKTQLQLEALLNDLAMI LNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEEBELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLISNINIVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

50

	R38A-P65R-D84S-R120A-C125S	
245	IL-2-A1G-P2G-T3S-S4G-S5G-H16A-L19A-R38A-P65R-D84S-C125S	GGSGGSTKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
246	IL-2-del1-5-H16A-L19A-R38A-P65R-D84S-C125S	STKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
247	IL-2-del1-5-H16A-L19A-R38A-P65R-D84S-C125V	STKKTQLQLEALLADLQMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
248	IL-2-T3A-L19N-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLNDLQMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
249	IL-2-T3A-H16A-L19N-R38A-P65R-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
250	IL-2-T3A-L19N-Q22A-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLNDLAMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
251	IL-2-T3A-H16A-L19N-Q22A-R38A-P65R-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLAMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
252	IL-2-T3A-L19N-Q22A-R38A-P65R-D84S-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLNDLAMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSI ISTLT
253	IL-2-T3A-H16A-L19N-Q22A-R38A-P65R-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLAMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSI ISTLT
254	IL-2-T3A-Q22A-M23A-R38A-P65R-D84S-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLAAI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
255	IL-2-T3A-Q22A-M23A-R38A-P65R-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLAAI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
256	IL-2-T3A-Q22A-M23A-R38A-P65R-D84S-E95Q-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLAAI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSI ISTLT
257	IL-2-T3A-H16A-Q22A-M23A-R38A-P65R-E95Q-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLAAI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSI ISTLT
258	IL-2-T3A-L19A-Q22A-R38A-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLADLAMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
259	IL-2-T3A-H16A-L19A-Q22A-R38A-P65R-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLAMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
260	IL-2-T3A-L19A-Q22A-R38A-	APASSSTKKTQLQLEHLLADLAMI LNGINNYKNPKLTAMLT FKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLNAQSKNFHLRPRSLI SNINVI VLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSI ISTLT

10

20

30

40

50

	P65R-D84S-R120A-C125S	
261	IL-2-T3A-H16A-L19A-Q22A-R38A-P65R-R120A-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLADLAMILNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEBEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNAWITFSQSIISTLT
262	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-II29A	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIASLT
263	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-II29H	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIHSTLT
264	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-II29R	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI RSTLT
265	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125S-II29S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI SSTLT
266	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125C-Q126N	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
267	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125C-Q126Y	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
268	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125C-S127N	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQNI ISTLT
269	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84S-C125C-S130P	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI IPTLT
270	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
271	IL-2-T3A-H16A-M23T-E61R-P65R-D84Y-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQTI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
272	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84Y-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
273	IL-2-T3A-H16A-L19N-M23T-E61R-P65R-D84Y-E95Q-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQTI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSI ISTLT
274	IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S-S127D	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQDI ISTLT
275	IL-2-T3A-H16A-M23T-E61R-P65R-D84Y-E95Q-C125S-S127D	APASSSTKKTQLQLEALLDLQTI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQDI ISTLT
276	IL-2-T3A-H16A-L19N-E61R-P65R-D84Y-C125S-S127D	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFKFYMPKKATEL KHLQCLEERELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQDI ISTLT

10

20

30

40

50

277	IL-2-T3A-H16A-L19N-M23T-E61R-P65R-D84Y-E95Q-C125S-S127D	APASSSTKKTQLQLEALLNDLQTI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRYLISNINIVLQKLGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
278	IL-2-T3A-H16A-ΔF42-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT- KFYMPKKATELKHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
279	IL-2-T3A-H16A-K43E-Y45R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFEFRMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
280	IL-2-T3A-H16A-K43E-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
281	IL-2-T3A-H16A-P65R-D84S-I114F-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATFVEFLNRWITFSQSIISTLT
282	IL-2-T3A-H16A-F42R-P65R-D84S-C125S	APASSSTKKTQLQLEALLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTRKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRSLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
283	IL-2-T3A-K43E-Y45R-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFEFRMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
284	IL-2-T3A-E61R-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
285	IL-2-T3A-I114F-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATFVEFLNRWITFSQSIISTLT
286	IL-2-T3A-K43E-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
287	IL-2-T3A-P65R-I114F-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATFVEFLNRWITFSQSIISTLT
288	IL-2-T3A-K43E-P65R-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
289	IL-2-T3A-K43E-Y45R-P65R-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFEFRMPKKATEL KHLQCLEEELKRLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
290	IL-2-T3A-R38A-C125S	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
291	IL-15 WT	MNWNVVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVVISL ESGDASIHDTVENLILANNSLSNNGNVTBGSCKECEELEEKNIKEFLOQSFVH IVQMFINTS
292	F <sub>c</sub> 領域xELL P329Gノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNN YTQKLSLSLSPG
293	F <sub>c</sub> 領域xELL P329G、H435Rホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNR YTQKLSLSLSPG

10

20

30

40

50

294	xELL- <u>ノブFc</u> -IL-2-RAS-T3G、C125S	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKLSLSLSPGGSGGSAPASSSTKKTQLQLEALLLDLQMLNGLNINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKATELKHLCLEELKRLLEEVLNLAQSKNFHLRPRSLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLT
295	$\gamma$ $\delta$ TCR 5C8VHH-xELL- <u>ホールT366S</u> 、L368A、Y407V、H435R Fc	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRPFSSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISW SGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSPKPEDTAIYYCAAQFSGADYG FGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYRYTQKLSLSLSPGK
296	$\gamma$ $\delta$ TCR 5C8VHH-xELL- <u>ノブFc</u> -IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRPFSSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISW SGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSPKPEDTAIYYCAAQFSGADYG FGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKLSLSLSPGGSGGSAPASSSTKKTQLQLEALLLDLQMLNGLNINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKATELKHLCLEELKRLLEEVLNLAQSKNFHLRPRYLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLT
298	$\gamma$ $\delta$ TCR 6C4VHH-xELL- <u>ノブFc</u> -IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAVSVRTFSDYRMGWFRQAPGKEREFVSTISW SGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGGYAGGTYYHPEEWGQGTQVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKLSLSLSPGGSGGSAPASSSTKKTQLQLEALLLDLQMLNGLNINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKATELKHLCLEELKRLLEEVLNLAQSKNFHLRPRYLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLT
299	$\gamma$ $\delta$ TCR 6C4VHH-xELL- <u>ホールT366S</u> 、L368A、Y407V、H435R Fc	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAVSVRTFSDYRMGWFRQAPGKEREFVSTISW SGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGGYAGGTYYHPEEWGQGTQVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYRYTQKLSLSLSPGK
300	非標的化VHH-xELL- <u>ホールT366S</u> 、Y407V、H435R Fc	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLSCAASGSINSINVMWYRQAPGKERDLVAGITS DGDTNYAESVKGRTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCRARDWGSGLTDYWGQGTLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYRYTQKLSLSLSPGK
301	非標的化VHH-xELL- <u>ノブFc</u> -IL-2-T3A-H16A-E61R-P65R-D84Y-C125S	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLSCAASGSINSINVMWYRQAPGKERDLVAGITS DGDTNYAESVKGRTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCRARDWGSGLTDYWGQGTLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKLSLSLSPGGSGGSAPASSSTKKTQLQLEALLLDLQMLNGLNINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKATELKHLCLEELKRLLEEVLNLAQSKNFHLRPRYLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLT

10

20

30

40

【 0 4 3 8 】

囲み又は下線を有する配列では、個々の文字の周りの囲みは、対応する野生型又は親配列に対するアミノ酸置換を示し、文字の群の周りの囲みは、リンカー配列を示す。下線付きの文字は、リンカー配列を示す。囲み又は下線を有しない配列は、アミノ酸置換及び/又はリンカー配列を含む場合もある。

【 図 面 】

【 図 1 A 】

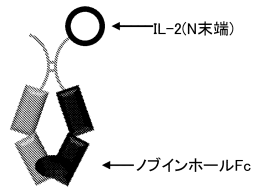


FIG. 1A

【 図 1 B 】

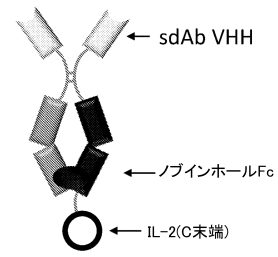


FIG. 1B

10

【 図 1 C 】

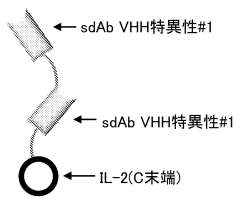


FIG. 1C

【 図 1 D 】

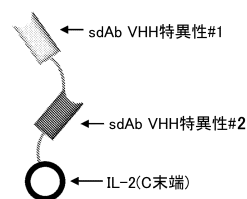


FIG. 1D

20

【 図 1 E 】

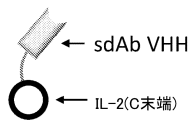


FIG. 1E

【 図 1 F 】

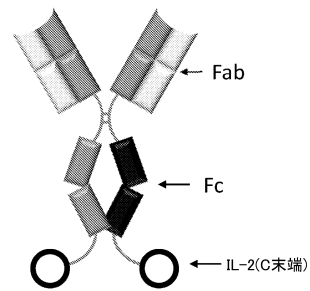


FIG. 1F

30

40

50

【 図 1 G 】

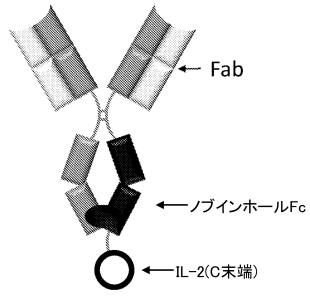


FIG. 1G

【 図 1 H 】

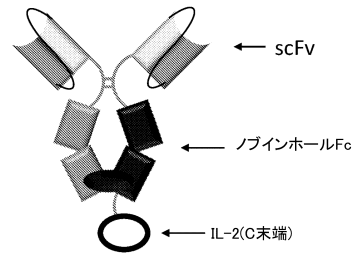


FIG. 1H

10

【 図 2 A 】

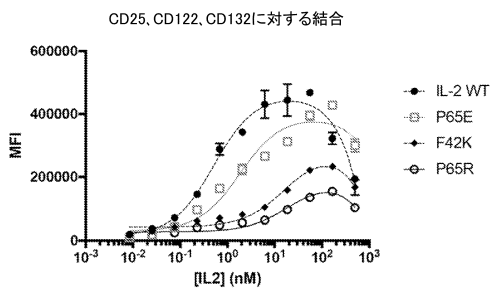


FIG. 2A

【 図 2 B 】

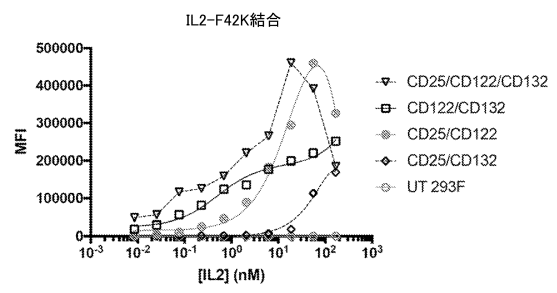


FIG. 2B

20

【 図 2 C 】

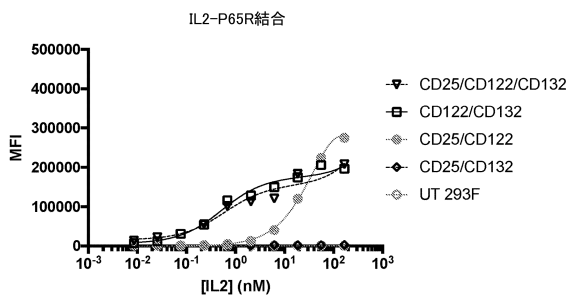


FIG. 2C

【 図 3 A 】

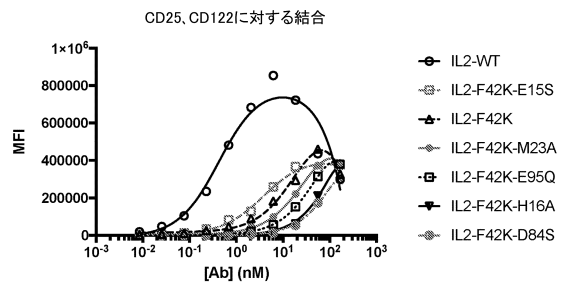


FIG. 3A

30

40

50

【 図 3 B 】

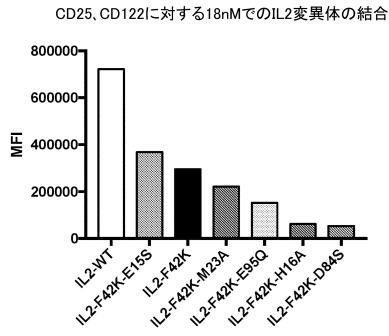


FIG. 3B

【 図 4 A 】

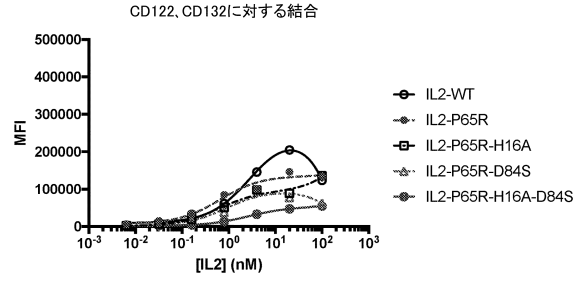


FIG. 4A

10

【 図 4 B 】

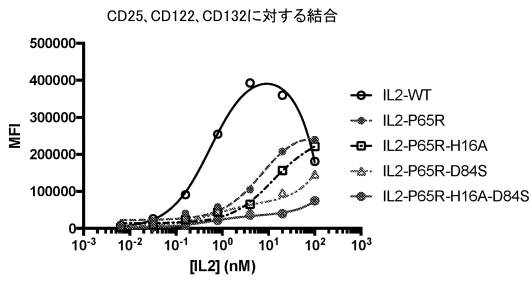


FIG. 4B

【 図 5 A 】

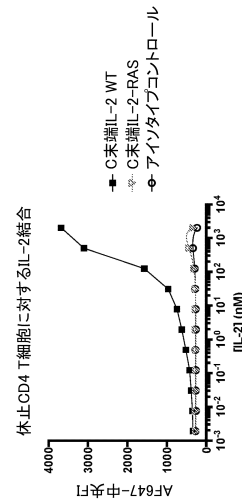


FIG. 5A

20

30

40

50

【 図 5 B 】

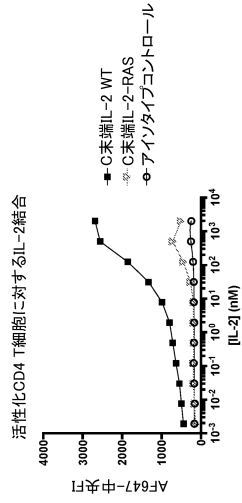


FIG. 5B

【 図 6 A 】

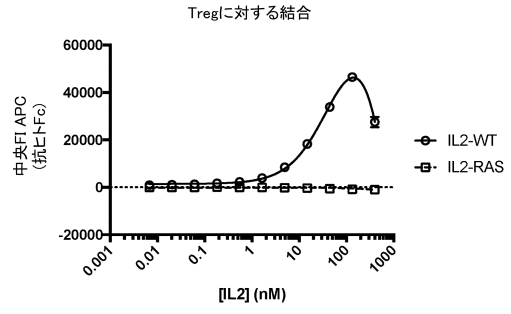


FIG. 6A

10

【 図 6 B 】

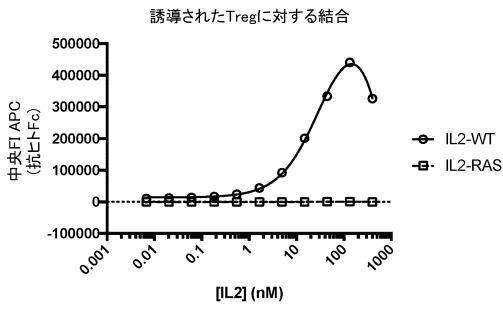


FIG. 6B

【 図 6 C 】

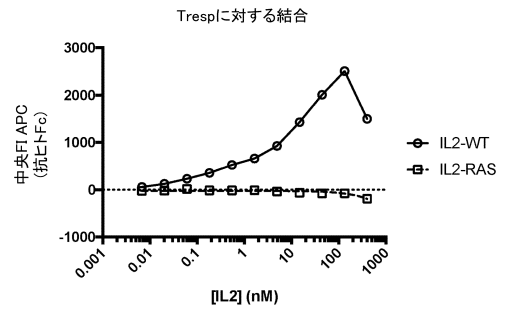


FIG. 6C

20

30

40

50

【 図 7 A 】

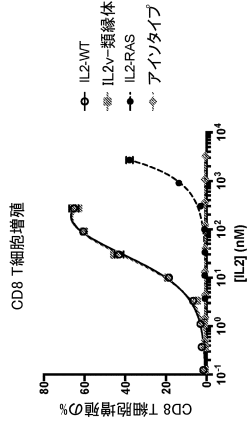


FIG. 7A

【 図 7 B 】

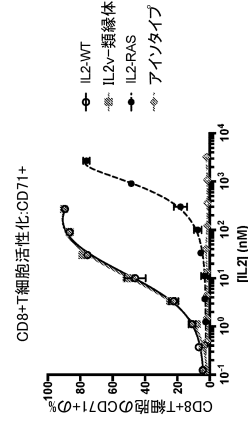


FIG. 7B

10

【 図 7 C 】

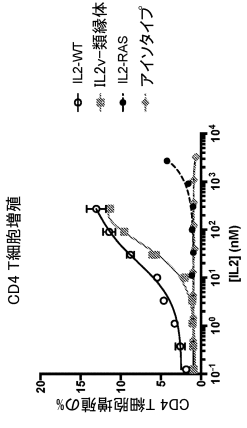


FIG. 7C

【 図 7 D 】

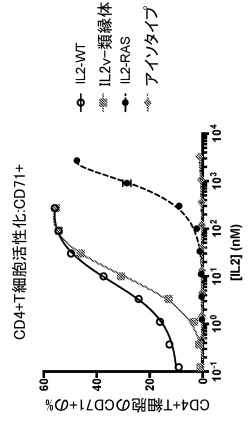


FIG. 7D

20

30

40

50

【 図 7 E 】

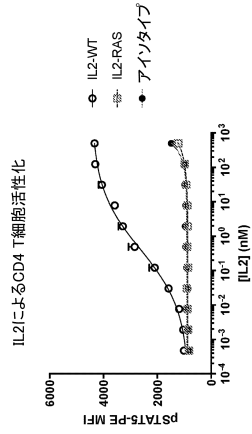


FIG. 7E

【 図 7 F 】

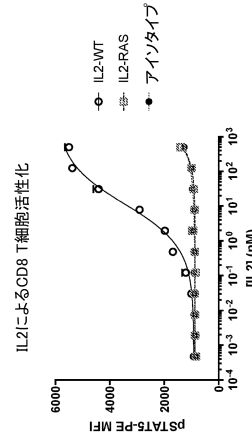


FIG. 7F

10

【 図 8 A 】

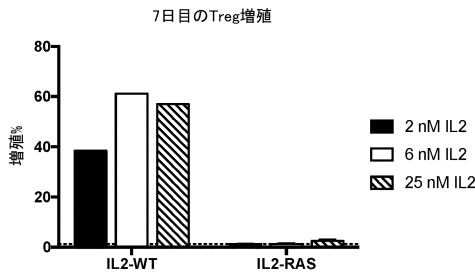


FIG. 8A

【 図 8 B 】

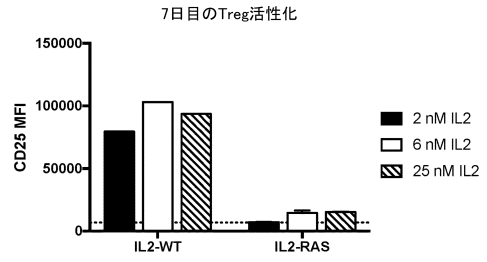


FIG. 8B

20

【 図 9 A 】

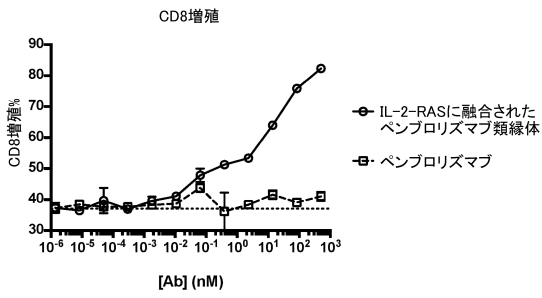


FIG. 9A

【 図 9 B 】

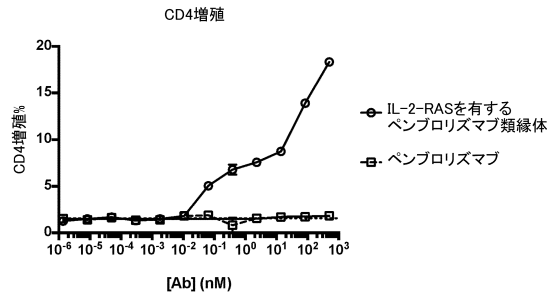


FIG. 9B

30

40

50

【 図 9 C 】

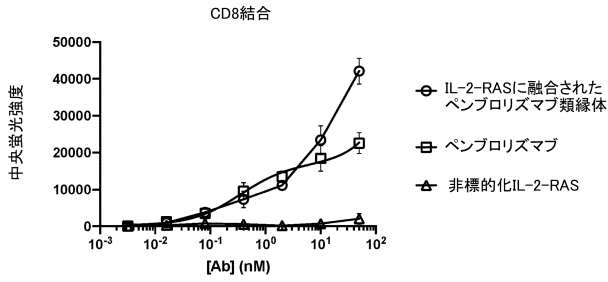


FIG. 9C

【 図 9 D 】

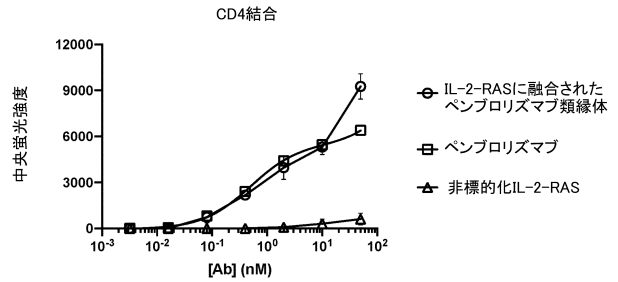


FIG. 9D

10

【 図 10 A 】

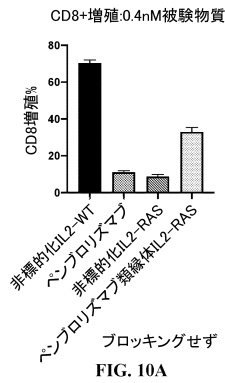


FIG. 10A

【 図 10 B 】

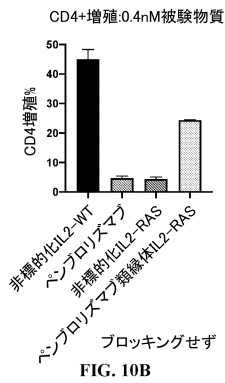


FIG. 10B

20

【 図 10 C 】

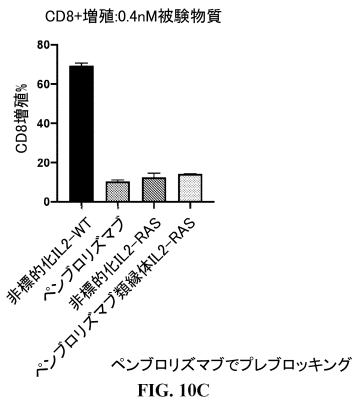


FIG. 10C

【 図 10 D 】

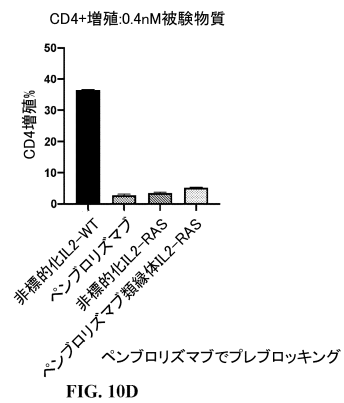


FIG. 10D

30

40

50

【 図 1 1 】

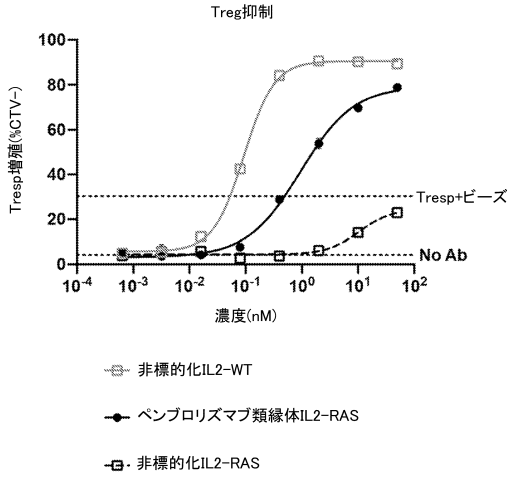


FIG. 11

【 図 1 2 A 】

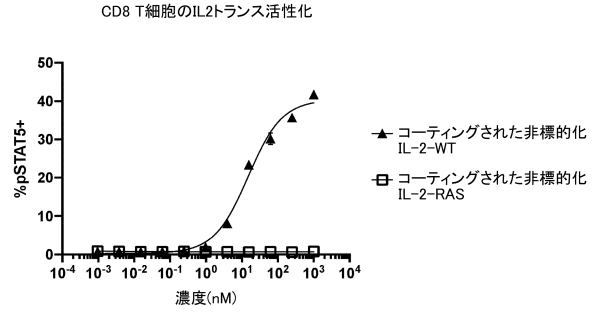


FIG. 12A

10

【 図 1 2 B 】

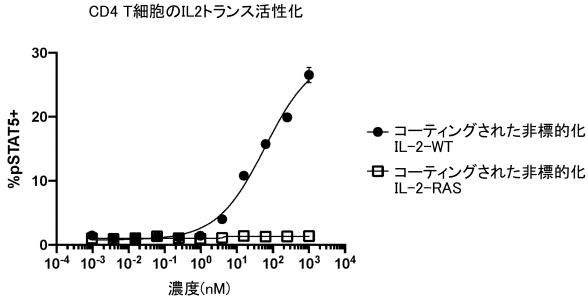


FIG. 12B

【 図 1 3 A 】

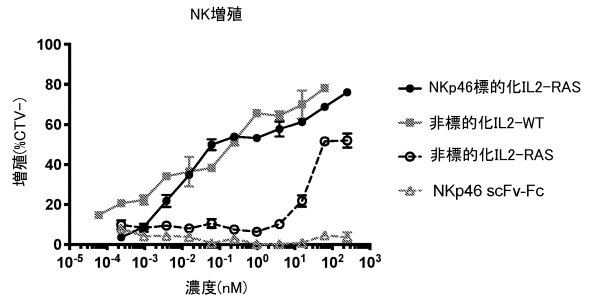


FIG. 13A

20

30

40

50

【 図 1 3 B 】

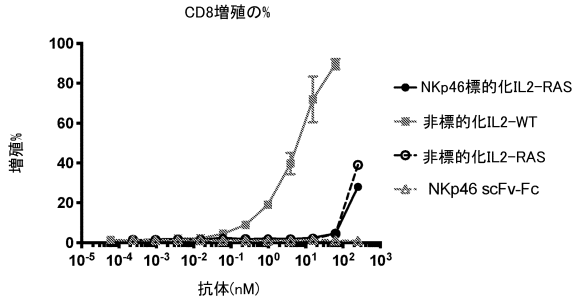


FIG. 13B

【 図 1 3 C 】

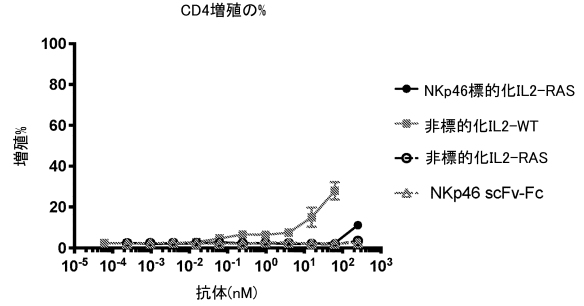


FIG. 13C

10

【 図 1 3 D 】

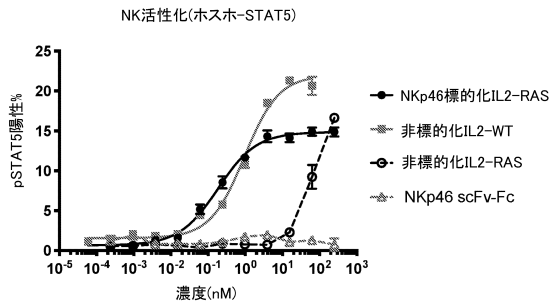


FIG. 13D

【 図 1 3 E 】

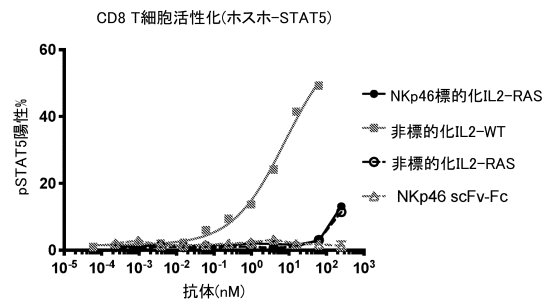


FIG. 13E

20

【 図 1 3 F 】

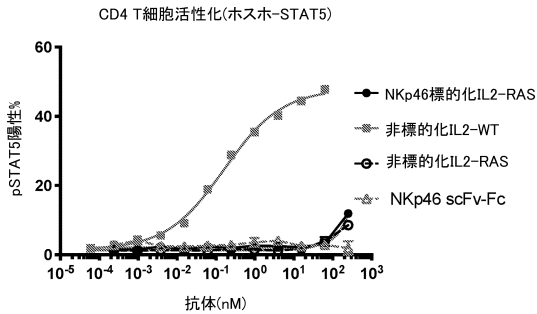


FIG. 13F

【 図 1 3 G 】

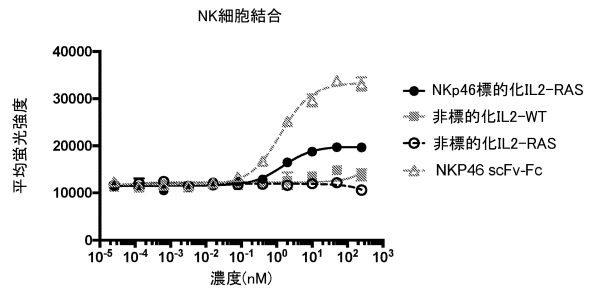


FIG. 13G

30

40

50

【 圖 1 3 H 】

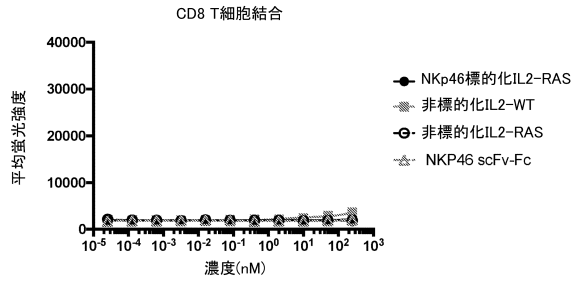


FIG. 13H

【 圖 1 3 I 】

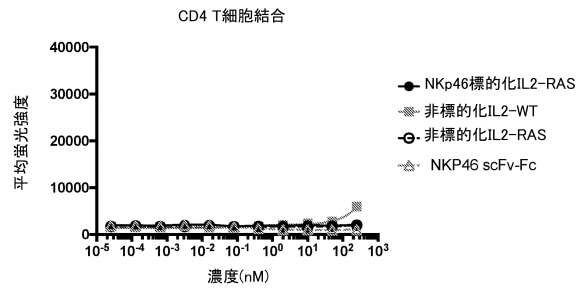


FIG. 13I

10

【 圖 1 4 A 】

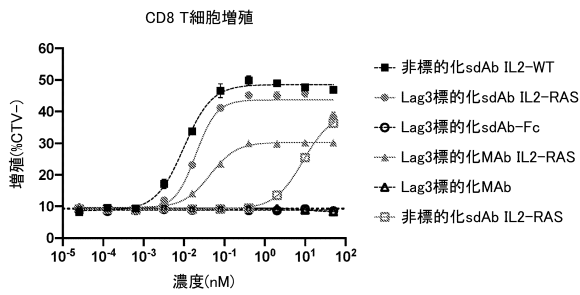


FIG. 14A

【 圖 1 4 B 】

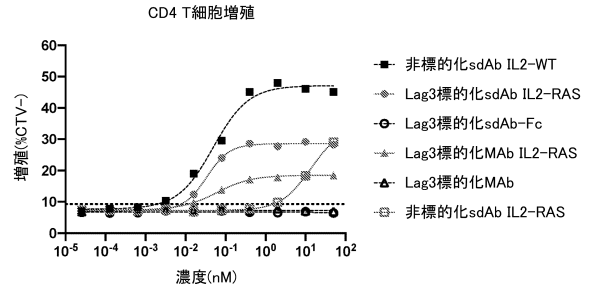


FIG. 14B

20

【 圖 1 4 C 】

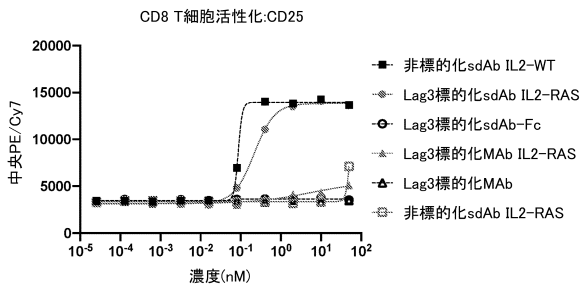


FIG. 14C

【 圖 1 4 D 】

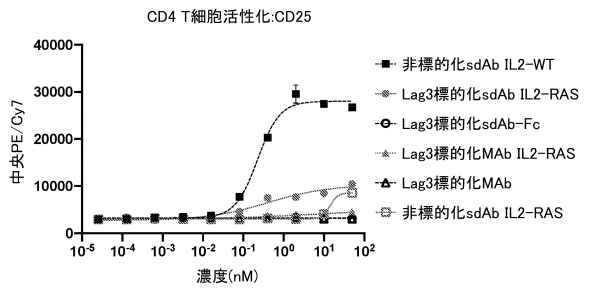


FIG. 14D

30

40

50

【 図 1 4 E 】

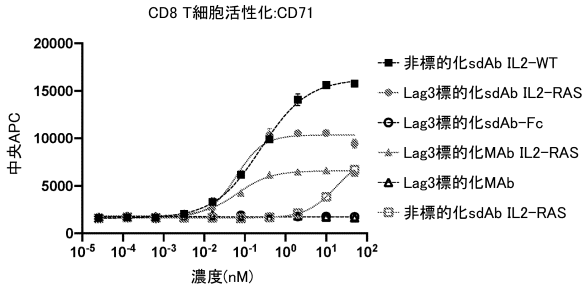


FIG. 14E

【 図 1 4 F 】

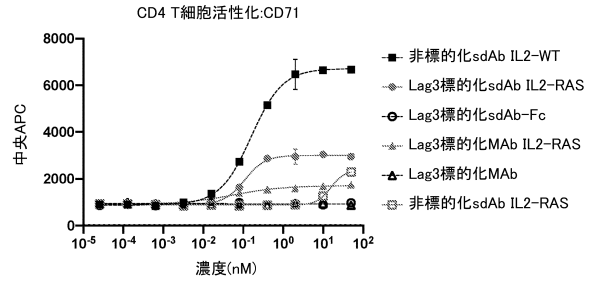


FIG. 14F

10

【 図 1 4 G 】

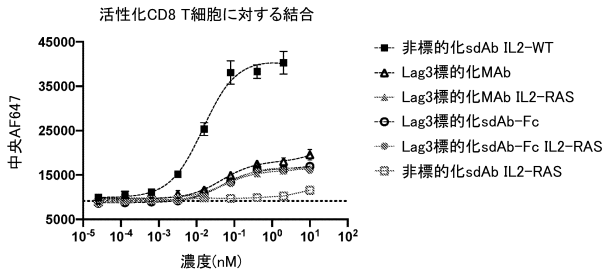


FIG. 14G

【 図 1 4 H 】

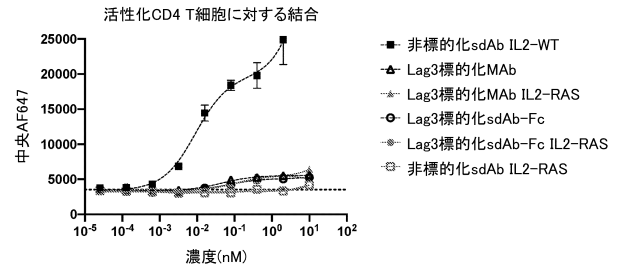


FIG. 14H

20

【 図 1 5 】

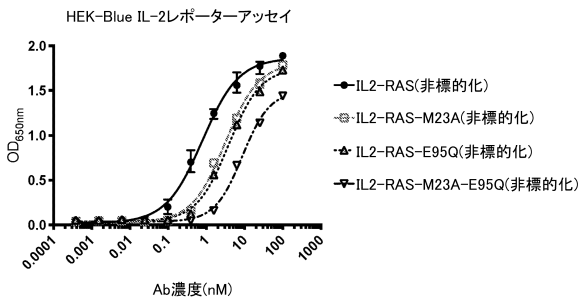


FIG. 15

【 図 1 6 A 】

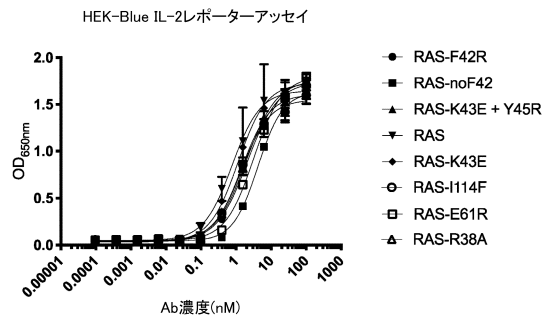


FIG. 16A

30

40

50

【 図 1 6 B 】

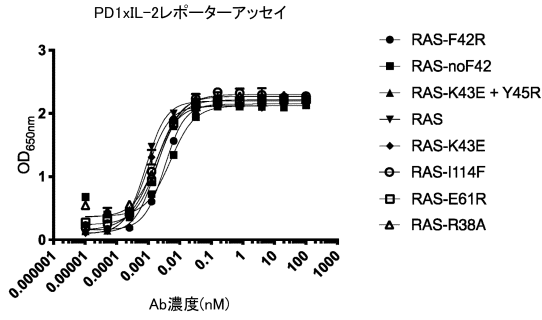


FIG. 16B

【 図 1 7 A 】

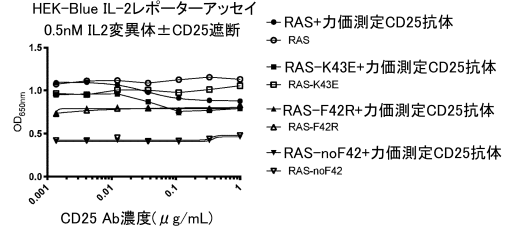


FIG. 17A

10

【 図 1 7 B 】

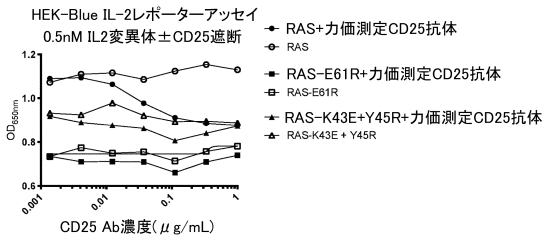


FIG. 17B

【 図 1 7 C 】

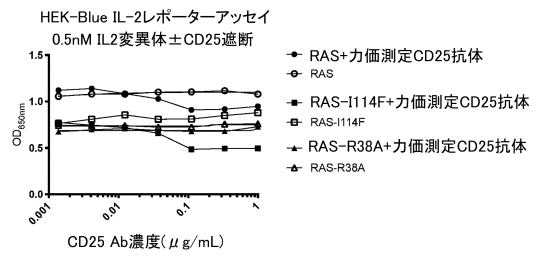


FIG. 17C

20

【 図 1 8 A 】

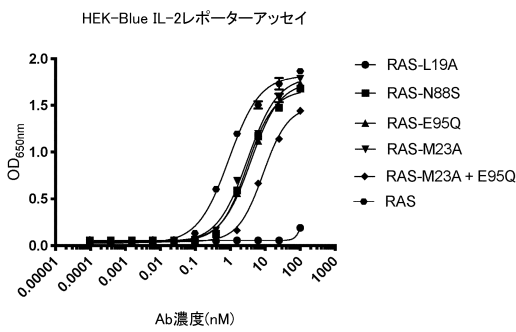


FIG. 18A

【 図 1 8 B 】

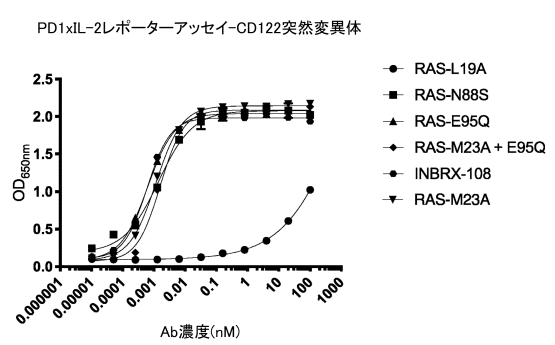


FIG. 18B

30

40

50

【 19 A 】

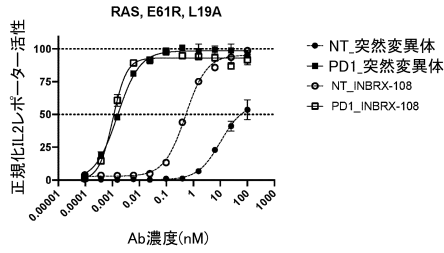


FIG. 19A

【 19 B 】

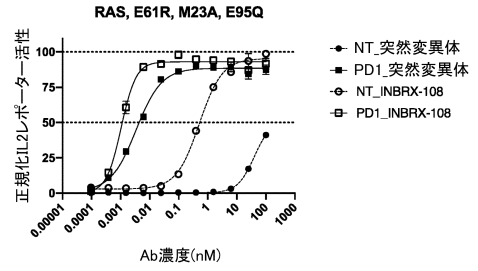


FIG. 19B

10

【 19 C 】

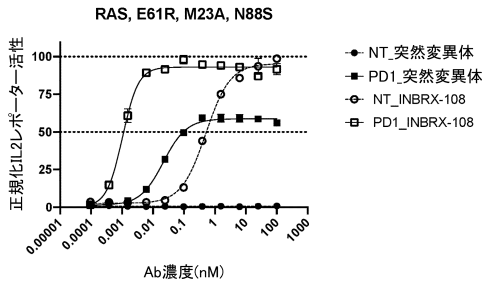


FIG. 19C

【 19 D 】

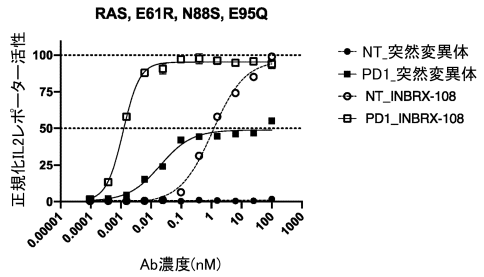


FIG. 19D

20

【 19 E 】

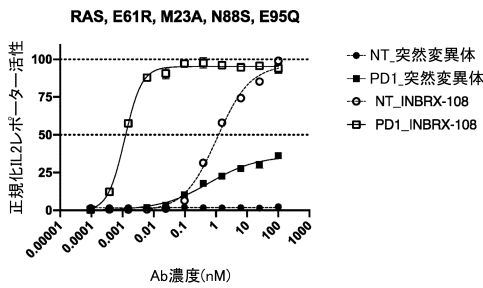


FIG. 19E

【 20 A 】

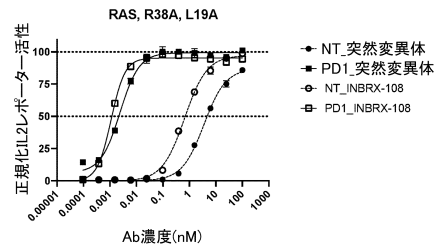


FIG. 20A

30

40

50

【 図 2 0 B 】

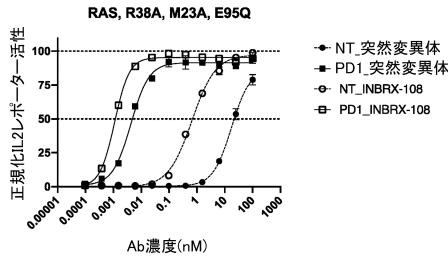


FIG. 20B

【 図 2 0 C 】

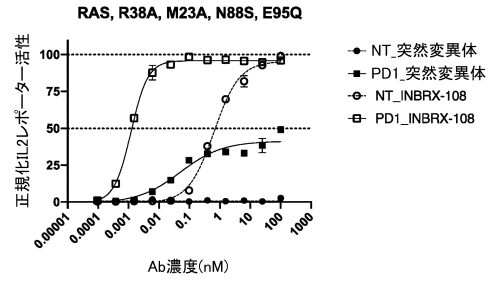


FIG. 20C

10

【 図 2 0 D 】

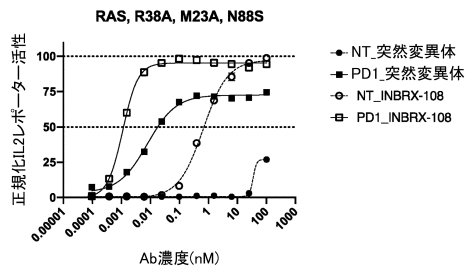


FIG. 20D

【 図 2 0 E 】

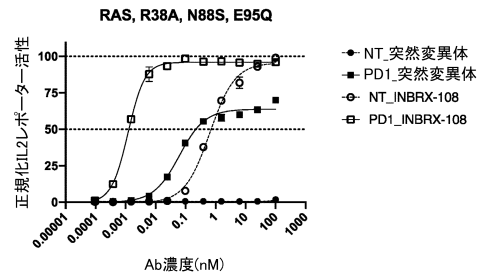


FIG. 20E

20

【 図 2 1 A 】

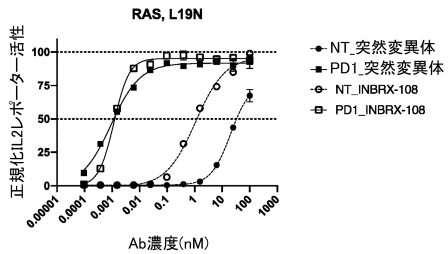


FIG. 21A

【 図 2 1 B 】

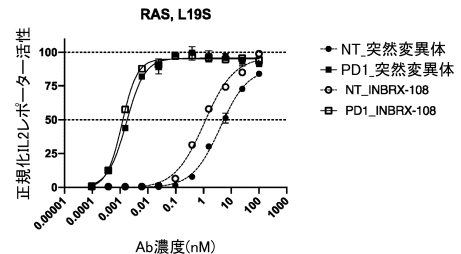


FIG. 21B

30

40

50

【 図 2 1 C 】

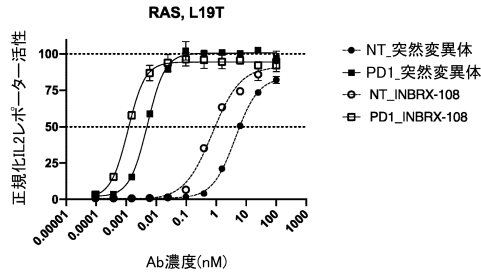


FIG. 21C

【 図 2 1 D 】

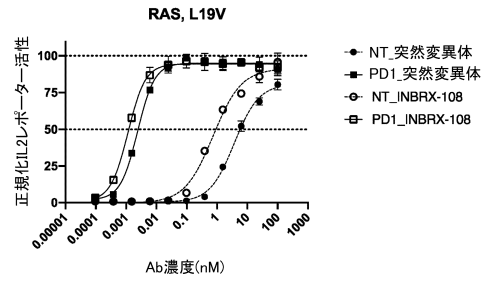


FIG. 21D

10

【 図 2 2 A 】

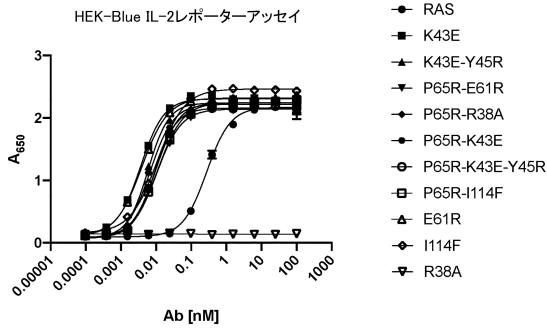


FIG. 22A

【 図 2 2 B 】

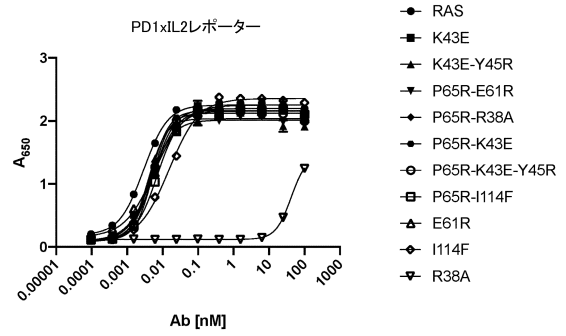


FIG. 22B

20

【 図 2 3 A 】

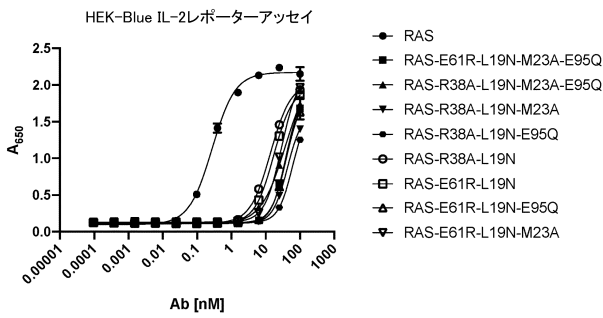


FIG. 23A

【 図 2 3 B 】

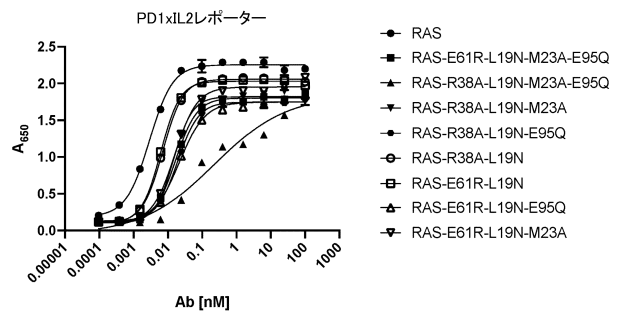


FIG. 23B

30

40

50

【 図 2 4 A 】

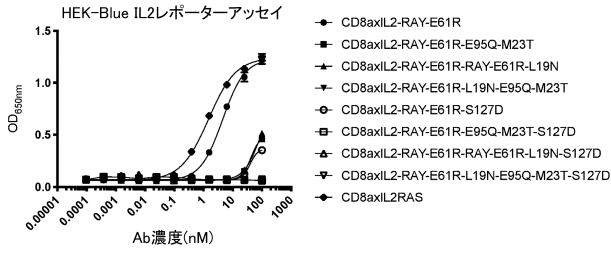


FIG. 24A

【 図 2 4 B 】

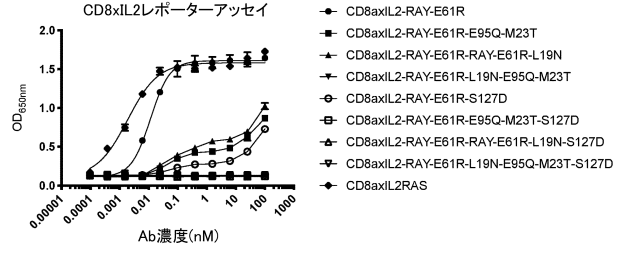


FIG. 24B

10

【 図 2 5 A 】

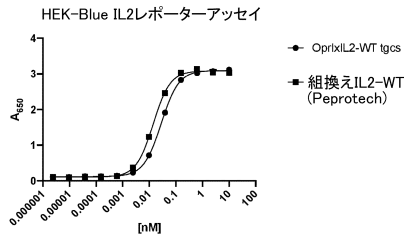


FIG. 25A

【 図 2 5 B 】

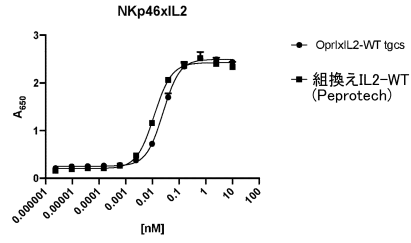


FIG. 25B

20

【 図 2 5 C 】

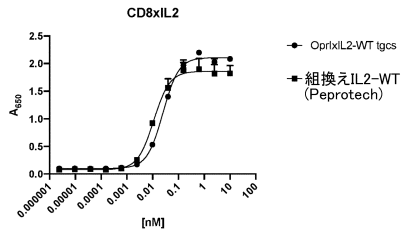


FIG. 25C

【 図 2 6 A 】

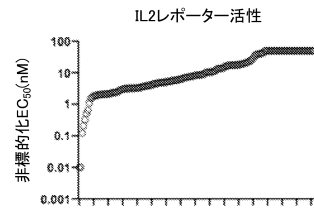


FIG. 26A

30

40

50

【 図 2 6 B 】

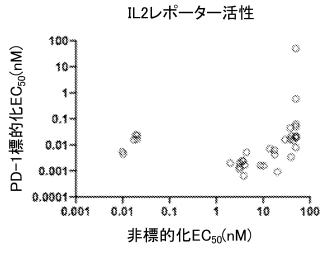


FIG. 26B

【 図 2 6 C 】

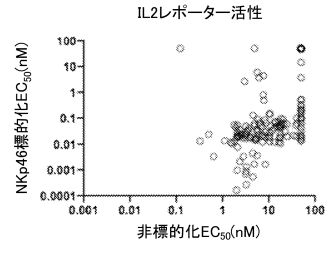


FIG. 26C

10

【 図 2 6 D 】

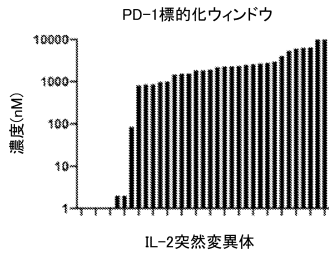


FIG. 26D

【 図 2 6 E 】

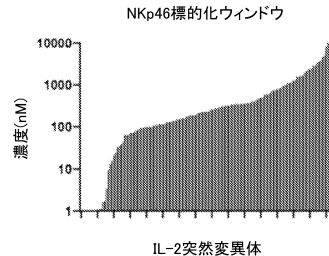


FIG. 26E

20

【 図 2 7 A 】

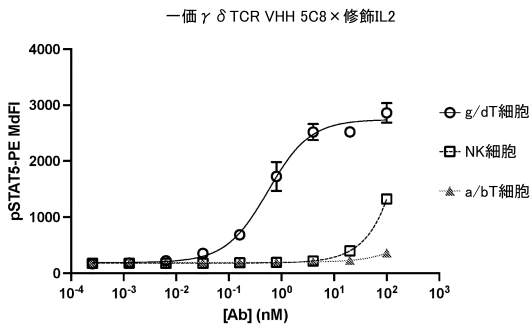


FIG. 27A

【 図 2 7 B 】

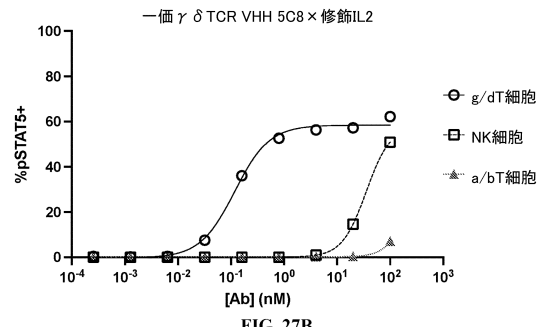


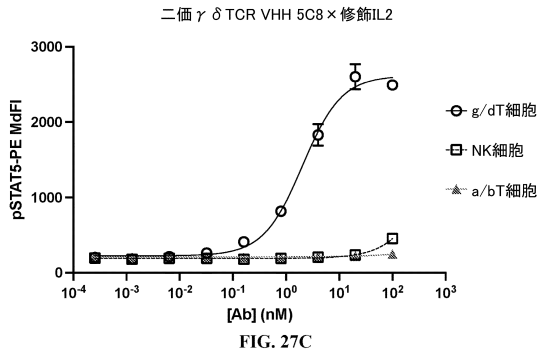
FIG. 27B

30

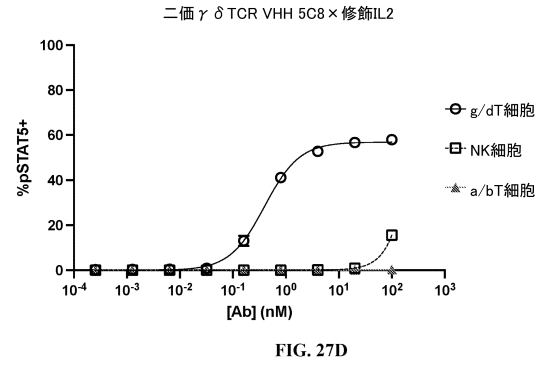
40

50

【 27C 】

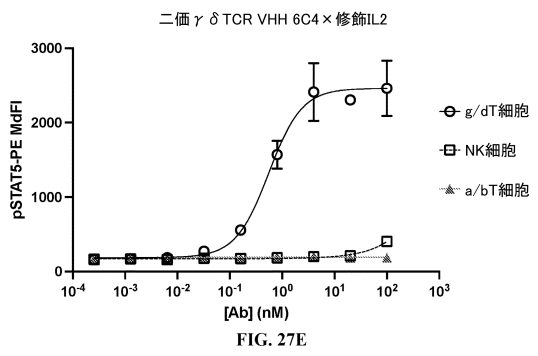


【 27D 】

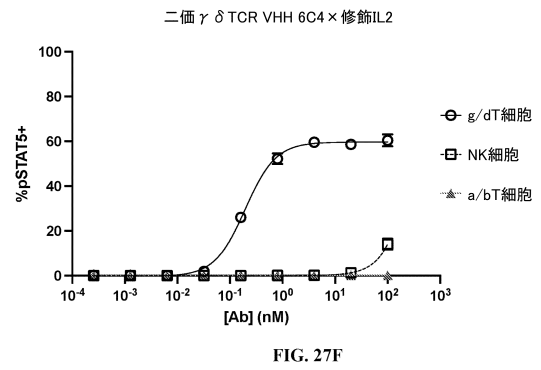


10

【 27E 】

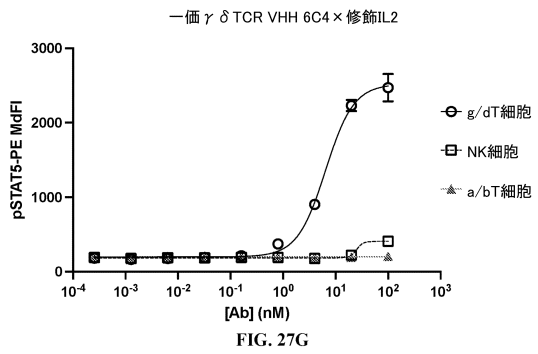


【 27F 】

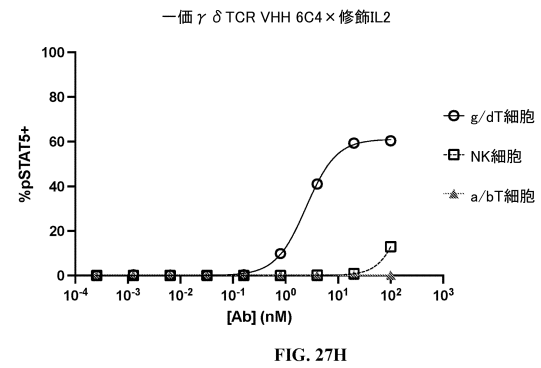


20

【 27G 】



【 27H 】



30

40

50

【 図 2 8 A 】

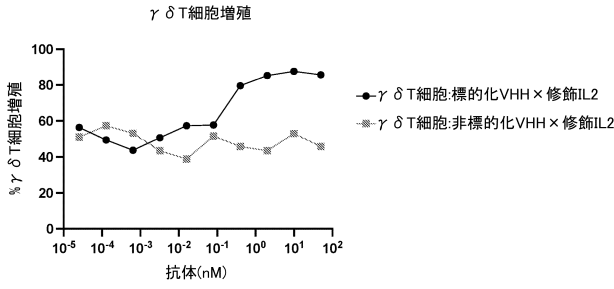


FIG. 28A

【 図 2 8 B 】

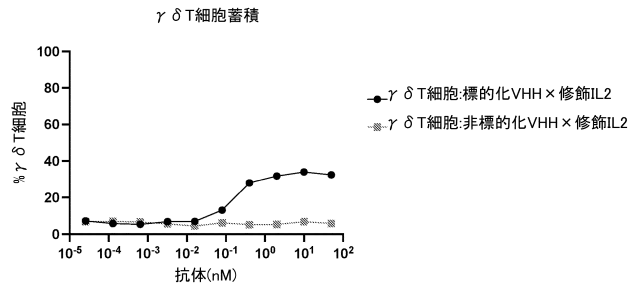


FIG. 28B

10

【 図 2 8 C 】

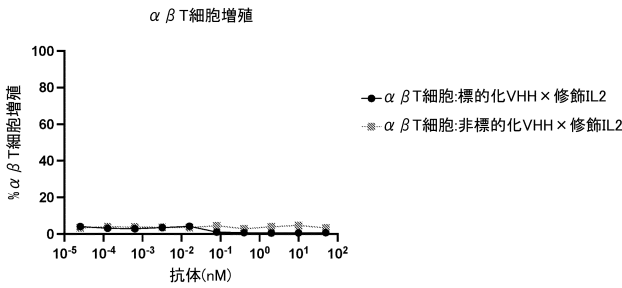


FIG. 28C

【 図 2 8 D 】

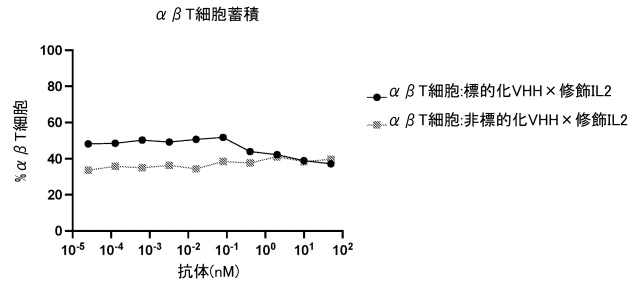


FIG. 28D

20

【 図 2 9 A 】

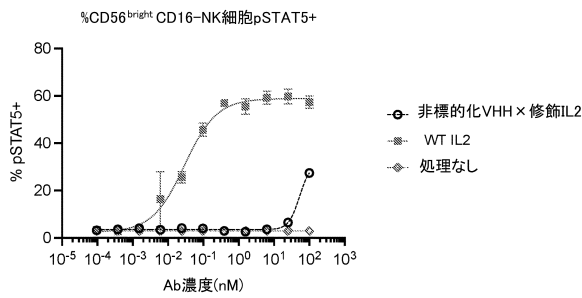


FIG. 29A

【 図 2 9 B 】

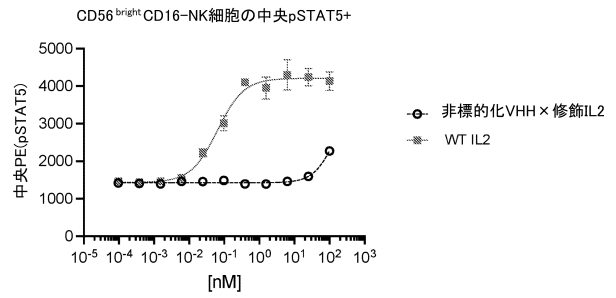


FIG. 29B

30

【 配 列 表 】

[2023532904000001.app](#)

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/040061

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>INV. C07K14/55</b> <b>ADD.</b>  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C07K</b>  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>EPO-Internal, CHEM ABS Data</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<b>WO 2019/246404 A1 (CUGENE INC [US])</b> <b>26 December 2019 (2019-12-26)</b> <b>abstract; claims 1-33; sequences 13,34</b> <b>42,101,104,204</b> -----	<b>1, 2, 6, 7</b>
A	<b>WO 2015/164815 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; US HEALTH [US])</b> <b>29 October 2015 (2015-10-29)</b> <b>abstract</b> <b>paragraph [0084] - paragraph [0110];</b> <b>claims 1-15; sequences 20,24,28,32</b> -----	<b>1, 15-17,</b> <b>28, 29</b>
A	<b>WO 2005/086798 A2 (CHIRON CORP [US]; AUKERMAN LEA [US] ET AL.)</b> <b>22 September 2005 (2005-09-22)</b> <b>abstract; claim 5; tables 1,3,7,11,17;</b> <b>sequence 272</b> ----- -/--	<b>1, 20, 21,</b> <b>174, 175</b>
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  <b>12 November 2021</b>		Date of mailing of the international search report  <b>25/01/2022</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <b>Gurdjian, Didier</b>

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

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/040061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2018/119114 A1 (CUE BIOPHARMA INC [US]) 28 June 2018 (2018-06-28) abstract; claims 1-5; sequences 69,72,75,84</p> <p>-----</p>	1, 2, 4, 5
A	<p>DAVID V. LIU ET AL: "Engineered Interleukin-2 Antagonists for the Inhibition of Regulatory T Cells :", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 32, no. 9, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 887-894, XP055432436, US ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181b528da abstract</p> <p>-----</p>	1, 2, 14
A	<p>ZURAWSKI S M AND ZURAWSKI G: "Receptor antagonist and selective agonist derivatives of mouse interleukin-2", THE EMBO JOURNAL / EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION, IRL PRESS, OXFORD, vol. 11, no. 11, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 3905-3910, XP002113939, ISSN: 0261-4189 abstract</p> <p>-----</p>	1, 2, 14
T	<p>WO 2020/146221 A1 (INHIBRX INC [US]) 16 July 2020 (2020-07-16) abstract; claims 1-9,46,125; sequences 5,12,17,21,25,27,28,30,87,102-104</p> <p>-----</p>	1-29, 56-188

10

20

30

40

International application No.

PCT/US2021/040061

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

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

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

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/US2021/040061**

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

**see additional sheet**

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:  
**1-29 (completely); 56-188 (partially)**

30

40

**Remark on Protest**

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

- 1. claims: 1-29(completely); 56-188(partially)

A polypeptide comprising a modified IL-2, wherein the modified IL-2 comprises a D84Y substitution, wherein the modified IL-2 has reduced affinity for CD122 compared to wild-type IL-2, corresponding complexes, host cells, method of producing the polypeptide, method of increasing a CD4+/CD8+ T cell or NK cell proliferation, and method of treating a cancer..

---

10

- 2. claims: 32, 33(completely); 30, 31, 42-188(partially)

A polypeptide comprising a modified IL-2, wherein the modified IL-2 comprises a Q22 substitution, wherein the modified IL-2 has reduced affinity for CD132 compared to wild-type IL-2, corresponding complexes, host cells, method of producing the polypeptide, method of increasing a CD4+/CD8+ T cell or NK cell proliferation, and method of treating a cancer, as far as not provided in the previous invention.

---

20

- 3. claims: 34, 35(completely); 30, 31, 42-188(partially)

A polypeptide comprising a modified IL-2, wherein the modified IL-2 comprises a R120 substitution, wherein the modified IL-2 has reduced affinity for CD132 compared to wild-type IL-2, corresponding complexes, host cells, method of producing the polypeptide, method of increasing a CD4+/CD8+ T cell or NK cell proliferation, and method of treating a cancer, as far as not provided in the previous inventions.

---

30

- 4. claims: 36, 37(completely); 30, 31, 42-188(partially)

A polypeptide comprising a modified IL-2, wherein the modified IL-2 comprises a T123 substitution, wherein the modified IL-2 has reduced affinity for CD132 compared to wild-type IL-2, corresponding complexes, host cells, method of producing the polypeptide, method of increasing a CD4+/CD8+ T cell or NK cell proliferation, and method of treating a cancer, as far as not provided in the previous inventions.

---

40

- 5. claims: 38, 39(completely); 30, 31, 42-188(partially)

A polypeptide comprising a modified IL-2, wherein the modified IL-2 comprises a S127 substitution, wherein the modified IL-2 has reduced affinity for CD132 compared to

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

wild-type IL-2, corresponding complexes, host cells, method of producing the polypeptide, method of increasing a CD4+/CD8+ T cell or NK cell proliferation, and method of treating a cancer, as far as not provided in the previous inventions.

10

---

6. claims: 40, 41(completely); 30, 31, 42-188(partially)

A polypeptide comprising a modified IL-2, wherein the modified IL-2 comprises a S130 substitution, wherein the modified IL-2 has reduced affinity for CD132 compared to wild-type IL-2, corresponding complexes, host cells, method of producing the polypeptide, method of increasing a CD4+/CD8+ T cell or NK cell proliferation, and method of treating a cancer, as far as not provided in the previous inventions.

20

---

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/040061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019246404 A1	26-12-2019	AU 2019288496 A1	14-01-2021
		CA 3102829 A1	26-12-2019
		CN 112638406 A	09-04-2021
		EP 3810185 A1	28-04-2021
		JP 2021528105 A	21-10-2021
		KR 20210033995 A	29-03-2021
		US 2021269497 A1	02-09-2021
		WO 2019246404 A1	26-12-2019
		-----	-----
WO 2015164815 A1	29-10-2015	CA 2946398 A1	29-10-2015
		CN 106659757 A	10-05-2017
		EP 3134102 A1	01-03-2017
		JP 6592505 B2	16-10-2019
		JP 2017518361 A	06-07-2017
		JP 2020023506 A	13-02-2020
		US 2017044229 A1	16-02-2017
		US 2019119346 A1	25-04-2019
		US 2021079055 A1	18-03-2021
		WO 2015164815 A1	29-10-2015
		-----	-----
WO 2005086798 A2	22-09-2005	AU 2005220822 A1	22-09-2005
		AU 2005220872 A1	22-09-2005
		AU 2005227263 A1	06-10-2005
		BR PI0508424 A	24-07-2007
		BR PI0508455 A	24-07-2007
		BR PI0508470 A	31-07-2007
		CA 2557677 A1	06-10-2005
		CA 2558632 A1	22-09-2005
		CA 2564614 A1	22-09-2005
		EP 1723251 A2	22-11-2006
		EP 1730184 A2	13-12-2006
		EP 1817332 A2	15-08-2007
		JP 2007527242 A	27-09-2007
		JP 2007528728 A	18-10-2007
		JP 2008509651 A	03-04-2008
		KR 20070003934 A	05-01-2007
		RU 2006135112 A	10-04-2008
		RU 2006135129 A	10-04-2008
		RU 2006135131 A	10-04-2008
		US 2006160187 A1	20-07-2006
		US 2006234205 A1	19-10-2006
		US 2006269515 A1	30-11-2006
		WO 2005086751 A2	22-09-2005
WO 2005086798 A2	22-09-2005		
WO 2005091956 A2	06-10-2005		
-----	-----	-----	-----
WO 2018119114 A1	28-06-2018	AU 2017379900 A1	13-06-2019
		BR 112019012964 A2	08-10-2019
		CA 3043630 A1	28-06-2018
		CN 110325205 A	11-10-2019
		EP 3558339 A1	30-10-2019
		JP 2020511949 A	23-04-2020
		KR 20190111022 A	01-10-2019
		PH 12019501413 A1	16-03-2020
		TW 201829451 A	16-08-2018
		US 2019352363 A1	21-11-2019
		US 2020199181 A1	25-06-2020
		US 2020207824 A1	02-07-2020

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

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

**PCT/US2021/040061**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2021107962 A1	15-04-2021
		US 2021198337 A1	01-07-2021
		WO 2018119114 A1	28-06-2018
-----			
WO 2020146221 A1	16-07-2020	AR 117770 A1	25-08-2021
		AU 2020206672 A1	15-07-2021
		CA 3125529 A1	16-07-2020
		CN 113924311 A	11-01-2022
		EP 3908596 A1	17-11-2021
		KR 20210113265 A	15-09-2021
		SG 11202106700W A	29-07-2021
		TW 202043259 A	01-12-2020
		WO 2020146221 A1	16-07-2020
-----			

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 14/55 (2006.01)	C 0 7 K 14/55	
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	K
	C 1 2 P 21/02	C

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

(72)発明者 ウィリス ケイトリン エム .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1 0  
2 5 スイート 2 0 0

(72)発明者 ベックランド ブライアン

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1 0  
2 5 スイート 2 0 0

(72)発明者 エッケルマン プレンダン ピー .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1 0  
2 5 スイート 2 0 0

F ターム (参考) 4B064 AG05 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA94X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272  
ZC751

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA04 DA76 EA28

FA74