

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6768633号  
(P6768633)

(45) 発行日 令和2年10月14日 (2020. 10. 14)

(24) 登録日 令和2年9月25日 (2020. 9. 25)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/55 (2006. 01)  
 C O 7 K 19/00 (2006. 01)  
 C 1 2 N 15/26 (2006. 01)  
 C 1 2 N 15/13 (2006. 01)  
 C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

C O 7 K 14/55 Z N A  
 C O 7 K 19/00  
 C 1 2 N 15/26  
 C 1 2 N 15/13  
 C 1 2 Q 1/02

請求項の数 21 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-504096 (P2017-504096)  
 (86) (22) 出願日 平成27年7月20日 (2015. 7. 20)  
 (65) 公表番号 特表2017-527272 (P2017-527272A)  
 (43) 公表日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/041177  
 (87) 国際公開番号 W02016/014428  
 (87) 国際公開日 平成28年1月28日 (2016. 1. 28)  
 審査請求日 平成30年6月22日 (2018. 6. 22)  
 (31) 優先権主張番号 61/999, 241  
 (32) 優先日 平成26年7月21日 (2014. 7. 21)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 517020724  
 デリニア, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2  
 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー  
 スクエア 4 0 0, 1 0 ティーエイチ  
 フロア  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100103182  
 弁理士 日野 真美  
 (74) 代理人 100181168  
 弁理士 丸山 智裕

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患を治療するために調節性T細胞を選択的に活性化する分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a . 配列番号 1 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有し、C 1 2 5 S の置換と N 8 8 R、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L および Q 1 2 6 F からなる群より選択される置換とを含むヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインと、

b . 5 から 2 0 アミノ酸残基のペプチドリンカードメインと、

c . I g G F c タンパク質ドメインと

を含む融合タンパク質であって、

各ドメインは、アミノ末端 (N 末端) およびカルボキシ末端 (C 末端) を有し、前記融合タンパク質は、前記ヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインの前記 C 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 N 末端に融合され、かつ前記 I g G F c タンパク質ドメインの前記 N 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 C 末端に融合されるように構成されている、融合タンパク質。

【請求項 2】

a . 前記ペプチドリンカードメインが、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8 および配列番号 1 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

b . 前記 I g G F c タンパク質ドメインが、配列番号 2 のヒト I g G 1 F c 改変体、および配列番号 3 のヒト I g G 2 F c からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、

請求項 1 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 3】

前記ヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインが、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 4】

前記 I g G F c タンパク質ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸配列と比べて N 2 9 7 A 変異を含む I g G 1 F c タンパク質を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 5】

前記融合タンパク質が、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 6】

a . 配列番号 1 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有し、C 1 2 5 S の置換と N 8 8 R、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L および Q 1 2 6 F からなる群より選択される置換とを含むヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインと、

b . 5 から 2 0 アミノ酸残基のペプチドリンカードメインと、

c . I g G F c タンパク質ドメインと

を含む融合タンパク質をコードする核酸であって、

各ドメインは、アミノ末端 ( N 末端 ) およびカルボキシ末端 ( C 末端 ) を有し、前記融合タンパク質は、前記ヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインの前記 C 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 N 末端に融合され、かつ前記 I g G F c タンパク質ドメインの前記 N 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 C 末端に融合されるように構成されている、核酸。

## 【請求項 7】

2 つの同一な鎖を含む二量体タンパク質であって、各鎖は、

a . 配列番号 1 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有し、C 1 2 5 S の置換と N 8 8 R、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L および Q 1 2 6 F からなる群より選択される置換とを含むヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインと、

b . 5 から 2 0 アミノ酸残基のペプチドリンカードメインと、

c . I g G F c タンパク質ドメインと

を含む融合タンパク質を含み、

各ドメインは、アミノ末端 ( N 末端 ) およびカルボキシ末端 ( C 末端 ) を有し、前記融合タンパク質は、前記ヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインの前記 C 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 N 末端に融合され、かつ前記 I g G F c タンパク質ドメインの前記 N 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 C 末端に融合されるように構成されている、二量体タンパク質。

## 【請求項 8】

i ) 前記 I g G F c タンパク質ドメインが、

a . 配列番号 2 のヒト I g G 1 F c 改変体、および配列番号 3 のヒト I g G 2 F c からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

b . システイン残基を含み、

i i ) 前記 2 つの同一な鎖が、前記 I g G F c タンパク質ドメインの前記システイン残基を介して互いに連結されている、請求項 7 に記載の二量体タンパク質。

## 【請求項 9】

各鎖が、配列番号 9 である、請求項 7 に記載の二量体タンパク質。

## 【請求項 10】

a . 配列番号 1 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有し、C 1 2 5 S の置換と N 8 8 R、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L および Q 1 2 6 F からなる群より選択される置換とを含むヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインと、

b . 5 から 2 0 アミノ酸残基のペプチドリンカードメインと、

c . I g G F c タンパク質ドメインと

10

20

30

40

50

を含む融合タンパク質を含む医薬組成物であって、

各ドメインは、アミノ末端（N末端）およびカルボキシ末端（C末端）を有し、前記融合タンパク質は、前記ヒトIL-2改変体タンパク質ドメインの前記C末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記N末端に融合され、かつ前記IgG Fcタンパク質ドメインの前記N末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記C末端に融合されるように構成されている、医薬組成物。

【請求項11】

a．前記ペプチドリンカードメインが、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18および配列番号19からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

b．前記IgG Fcタンパク質ドメインが、配列番号2のヒトIgG1 Fc改変体、および配列番号3のヒトIgG2 Fcからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、

請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記ヒトIL-2改変体タンパク質ドメインが、配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記IgG Fcタンパク質ドメインが、配列番号2のアミノ酸配列と比べてN297A変異を含むIgG1免疫グロブリンFcタンパク質を含む、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項14】

前記融合タンパク質が、配列番号9のアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項15】

自己免疫疾患を治療するための医薬組成物であって、前記組成物は、

a．配列番号1と少なくとも95%の配列同一性を有し、C125Sの置換とN88R、N88G、D20H、Q126LおよびQ126Fからなる群より選択される置換とを含むヒトIL-2改変体タンパク質ドメインと、

b．5から20アミノ酸残基のペプチドリンカードメインと、

c．IgG Fcタンパク質ドメインと

を含む融合タンパク質を含み、

各ドメインは、アミノ末端（N末端）およびカルボキシ末端（C末端）を有し、前記融合タンパク質は、前記ヒトIL-2改変体タンパク質ドメインの前記C末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記N末端に融合され、かつ前記IgG Fcタンパク質ドメインの前記N末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記C末端に融合されるように構成されている、医薬組成物。

【請求項16】

前記自己免疫疾患が、1型糖尿病、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病および自己免疫性血管炎からなる群から選択される、請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】

前記融合タンパク質が、配列番号9を含む、請求項15に記載の組成物。

【請求項18】

前記組成物が2つの同一な鎖を含む二量体タンパク質を含み、各鎖は、

a．配列番号1と少なくとも95%の配列同一性を有し、C125Sの置換とN88R、N88G、D20H、Q126LおよびQ126Fからなる群より選択される置換とを含むヒトIL-2改変体タンパク質ドメインと、

b．5から20アミノ酸残基のペプチドリンカードメインと、

c．IgG Fcタンパク質ドメインと

を含む融合タンパク質を含み、

各ドメインは、アミノ末端（N末端）およびカルボキシ末端（C末端）を有し、前記融

10

20

30

40

50

合タンパク質は、前記ヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインの前記 C 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 N 末端に融合され、かつ前記 I g G F c タンパク質ドメインの前記 N 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 C 末端に融合されるように構成されている、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 19】

各鎖が、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

調節性 T 細胞を選択的に活性化するための医薬組成物であって、前記組成物は、

a . 配列番号 1 と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、C 1 2 5 S の置換と N 8 8 R 、 N 8 8 G 、 D 2 0 H 、 Q 1 2 6 L および Q 1 2 6 F からなる群より選択される置換とを含むヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインと、

b . 5 から 20 アミノ酸残基のペプチドリンカードメインと、

c . I g G F c タンパク質ドメインと

を含む融合タンパク質を含み、

各ドメインは、アミノ末端 ( N 末端 ) およびカルボキシ末端 ( C 末端 ) を有し、前記融合タンパク質は、前記ヒト I L - 2 改変体タンパク質ドメインの前記 C 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 N 末端に融合され、かつ前記 I g G F c タンパク質ドメインの前記 N 末端がペプチド結合を介して前記ペプチドリンカードメインの前記 C 末端に融合されるように構成されており、

前記組成物は、ヒト調節性 T 細胞濃度が所望のレベルに達するまで、治療有効用量で投与される、  
医薬組成物。

【請求項 21】

ヒト血液細胞を 1 n M から 0 . 01 n M の間の濃度の請求項 1 に記載の融合タンパク質と i n v i t r o で接触させる工程と、次いで、前記タンパク質と結合する細胞をフローサイトメトリーによって検出する工程とを含む、ヒト血液試料中の調節性 T 細胞の数を測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

免疫系は、自己と非自己を識別することができなければならない。自己 / 非自己の識別が失敗すると、免疫系により体の細胞および組織が破壊され、その結果、自己免疫疾患が引き起こされる。調節性 T 細胞は、免疫系の活性化を能動的に抑制し、病的な自己反応性およびその結果としての自己免疫疾患を予防するものである。自己免疫疾患を治療するための、調節性 T 細胞を選択的に活性化する薬物および方法を開発することが熱心な研究の主題であり、本発明が開発されるまではほとんどが失敗してきた。

【0002】

調節性 T 細胞 ( T r e g ) は、他の免疫細胞の活性を抑制する C D 4 + C D 2 5 + T 細胞のクラスである。T r e g は、免疫系の恒常性の中核をなし、自己抗原に対する寛容性の維持および外来抗原に対する免疫応答の調節において主要な役割を果たす。1 型糖尿病 ( T 1 D ) 、全身性エリテマトーデス ( S L E ) 、および移植片対宿主病 ( G V H D ) を含めた多数の自己免疫疾患および炎症性疾患では T r e g 細胞数または T r e g の機能に欠損があることが示されている。したがって、T r e g 細胞の数および / または機能を増大させる療法の開発に大きな関心が寄せられている。

【0003】

研究されている自己免疫疾患に対する治療手法の 1 つは、自己由来の、e x v i v o で増大させた T r e g 細胞の移植である ( T a n g , Q . ら、2013 年、C o l d S p r i n g H a r b . P e r s p e c t . M e d . 、3 巻 : 1 ~ 15 頁 ) 。この手法は、疾患の動物モデルの治療およびいくつかの初期ヒト臨床試験において見込みがあ

10

20

30

40

50

ることが示されているが、患者自身のT細胞を用いた個人向けの治療が必要であり、浸潤性であり、また、技術的に複雑である。別の手法は、低用量のインターロイキン2 (IL-2) を用いた治療である。Treg細胞は、サブユニットIL2RA (CD25)、IL2RB (CD122)、およびIL2RG (CD132) で構成される高親和性IL-2受容体であるIL2R を高い構成的レベルで特徴的に発現し、Treg細胞の成長はIL-2に依存することが示されている (Malek, T. R. ら、2010年、Immunity、33巻: 153~65頁)。慢性GVHD患者 (Koreth, J. ら、2011年、N Engl J Med.、365巻: 2055~66頁) およびHCV関連自己免疫性血管炎患者 (Saadoun, D. ら、2011年、N Engl J Med.、365巻: 2067~77頁) に対する低用量のIL-2による治療に関する臨床試験により、Tregレベルの上昇および臨床的有効性の徴候が実証された。多数の他の自己免疫疾患および炎症性疾患におけるIL-2の有効性を調査する新しい臨床試験が開始されている。

10

#### 【0004】

これらの試験において使用されているIL-2の組換え形態であるプロロイキン (Prometheus Laboratories、San Diego、CAにより販売されている) には高い毒性が伴う。プロロイキンは、転移性黒色腫および転移性腎がんの治療に関して認可を受けているが、その副作用は集中治療が利用可能な病院環境でのみ推奨されるほど重篤なものである (<http://www.proleukin.com/assets/pdf/proleukin.pdf>)。Treg細胞がごく最近特徴付けられるまで、IL-2は、T細胞および他の免疫細胞を活性化してがん細胞を排除する免疫系刺激物質であると考えられていた。自己免疫疾患におけるIL-2についての臨床試験では、Treg細胞がIL2R を発現するので多くの他の免疫細胞型よりも低濃度のIL-2に反応することに起因して、Treg細胞を標的化するために低用量のIL-2が使用されてきた (Klatzmann D、2015年、Nat Rev Immunol.、15巻: 283~94頁)。しかし、これらの低用量でさえも、安全性および耐容性の問題が生じ、使用される治療では、長期にわたってまたは断続的な5日間の治療過程でのいずれかでの毎日の皮下注射が用いられている。したがって、Treg細胞の数および機能を強化する、IL-2よりも特異的にTreg細胞を標的化する、より安全であり、より耐容性が高く、より低頻度で投与される自己免疫疾患療法が必要とされている。

20

30

#### 【0005】

IL-2に基づく療法の治療指数を改善するための1つの手法は、他の免疫細胞と比べてTreg細胞に対して選択的であるIL-2の改変体を使用することである。IL-2受容体は、T細胞、NK細胞、好酸球、および単球を含めた種々の異なる免疫細胞型で発現し、この広範な発現パターンがその免疫系に対する多面的な影響および高い全身毒性に寄与する可能性がある。IL-2受容体は、3つの形態: (1) シグナル伝達を行わない低親和性受容体であるIL2RA; (2) 通常のT細胞 (Tcon)、NK細胞、好酸球、および単球で広範に発現する、IL2RBおよびIL2RGで構成される中親和性受容体 (IL2R); ならびに (3) 活性化T細胞で一過性に発現し、Treg細胞で構成的に発現する、IL2RA、IL2RB、およびIL2RGで構成される高親和性受容体 (IL2R) で存在する。IL2R と比べてIL2R に対して選択的であるIL-2改変体が開発されてきた (Shanafelt, A. B. ら、2000年、Nat Biotechnol.、18巻: 1197~202頁; Cassell, D. J. ら、2002年、Curr Pharm Des.、8巻: 2171~83頁)。これらの改変体は、IL2RBに対するそれらの親和性を低下させるアミノ酸置換を有する。IL-2はIL2RGに対しては検出不可能な親和性を有するので、したがって、これらの改変体は、IL2R 受容体複合体に対する親和性が低下しており、かつ、IL2R を発現する細胞を活性化する能力は低下しているが、IL2RAに結合する能力およびIL2R 受容体複合体に結合しそれを活性化する能力は保持する。こ

40

50

これらの改変体のうちの1つであるIL2/N88R (Bay 50-4798)は、IL2R を発現するNK細胞が毒性の主要な要因であるという仮説に基づいて、IL-2の免疫系刺激物質としての毒性が低いバージョンであるとして臨床的に試験された。Bay 50-4798は、NK細胞と比べて活性化T細胞の増殖を選択的に刺激することが示され、がん患者 (Margolin, K.ら、2007年、Clin Cancer Res., 13巻: 3312~9頁) およびHIV患者 (Davey, R. T.ら、2008年、J Interferon Cytokine Res., 28巻: 89~100頁) に関して第I/I相臨床試験において評価された。これらの試験から、Bay 50-4798がプロロイキンよりも相当に安全であり、耐容性があることが示され、また、Bay 50-4798により患者におけるCD4+T細胞およびCD4+CD25+T細胞のレベルが上昇することも示された。しかし、CD4+T細胞およびCD4+CD25+T細胞の増加ではTreg細胞の増加は示されない。なぜなら、Tregの同定にはCD4およびCD25に加えて追加のマーカーが必要であるからであり、かつTreg細胞はCD4+CD25+細胞のうちのわずかな割合であるからである。これらの試験の後で、当該分野における研究により、Treg細胞の正体がより十分に確立され、Treg細胞がIL2R を選択的に発現することが実証された (Malek, T. R.ら、2010年、Immunity, 33巻: 153~65頁に概説されている)。この新しい研究に基づいて、現在では、IL2R 選択的アゴニストがTreg細胞に対して選択的であるはずであることを理解することができる。

10

## 【0006】

20

IL-2に基づく療法の治療指数を改善するための第2の手法は、Treg細胞が最大限に刺激されるように分子の薬物動態を最適化することである。IL-2作用の初期の試験により、in vitroにおけるヒトT細胞増殖のIL-2による刺激には、有効濃度のIL-2に最低5~6時間曝露させることが必要であることが実証された (Cantrell, D. A.ら、1984年、Science, 224巻: 1312~1316頁)。IL-2をヒト患者に投与した際の血漿中半減期は、静脈内投与では85分および皮下投与では3.3時間と非常に短い (Kirchner, G. I.ら、1998年、Br J Clin Pharmacol, 46巻: 5~10頁)。半減期が短いので、循環IL-2を、T細胞増殖を刺激するために必要なレベルまたはそれ以上に必要な持続時間にわたって維持するには、Treg細胞に対するEC50を有意に超えるピークIL-2レベルがもたらされるような高用量が必要になる、または、頻繁な投与が必要になる (図1)。これらの高いIL-2ピークレベルにより、IL2R 受容体が活性化される可能性があり、また、他の意図されたものではないまたは有害な作用が生じる可能性がある。IL-2よりも循環半減期が長いIL-2類似体により、指定の期間にわたってIL-2よりも低用量かつ低いピークレベルで標的薬物濃度を達成することができる。したがって、そのようなIL-2類似体では、Treg細胞を有効に刺激するために、IL-2よりも低用量または低頻度の投与のいずれかが必要になる。実際に、循環半減期が14時間であるIgG-IL2融合タンパク質を投薬したカニクイザルでは、等モル用量のIL-2と比較してはるかに口バスタなTregの増加が刺激された (Bellら、2015年、J Autoimmun, 56巻: 66~80頁)。IL-2薬物のより低頻度の皮下投与はまた、患者にとってより耐容性が高くなる。これらの特性を有する治療薬は、臨床的には、薬理学的有効性の改善、毒性の低下、および患者の療法に対するコンプライアンスの改善に変換される。

30

40

## 【0007】

治療用タンパク質の半減期を延長するための1つの手法は、循環半減期を増大させるために、分子の治療的に活性な部分をIgGのFc領域などの別のタンパク質と融合することである。治療用タンパク質とIgG Fcの融合は、タンパク質の流体力学的半径を増大させ、それにより、腎クリアランスを低下させ、かつ融合タンパク質の新生児Fc受容体 (FcRn) 媒介性再利用を通じ、それにより循環半減期を延長することによって、このことを達成する。治療用タンパク質とアルブミン (Sleep, D.ら、2013年

50

、Biochem Biophys Acta.、1830巻：5526～34頁）および非免疫原性アミノ酸ポリマータンパク質（Schlapschy, M.ら、2007年、Protein Eng Des Sel. 20巻：273～84頁；Schellenberger, V.ら、2009年、Nat Biotechnol. 27巻：1186～90頁）の融合も循環半減期を増大させるために使用されている。しかし、IL2選択的アゴニスト融合パートナーのロバストな生物学的活性が確実になる様式でのそのような融合タンパク質の構築は、特に、受容体サブユニットのうちの1つとの結合に欠陥のある小さなタンパク質であり、受容体を活性化するために3つの受容体サブユニットの複合体を集合させなければならないIL-2選択的アゴニストの場合では、予測不可能であり得る（Wang, X.ら、2005年、Science 310巻：1159～63頁）。

10

#### 【0008】

他の研究者により、安定性を促進するために野生型IL-2またはC125S置換を伴うIL-2を使用した種々のIL-2融合タンパク質が創出されている。Morrissonおよび共同研究者（Penichet, M. L.ら、1997年、Hum Antibodies. 8巻：106～18頁）は、IL-2の循環半減期を増大させるため、および抗原に対する免疫応答を強化する目的でIL-2を特定の抗原に標的化させるために、IgGと野生型IL-2を融合した融合タンパク質を創出した。この融合タンパク質は、重（H）鎖および軽（L）鎖で構成されるインタクトな抗体分子からなり、N末端H鎖部分とC末端IL-2タンパク質部分が融合したものであった。このIgG-IL-2融合タンパク質はFcエフェクター機能を有するものであった。IgG-Fcタンパク質の重要なエフェクター機能は、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞傷害（ADCC）である。IgG-IL-2融合タンパク質は、IL-2バイオアッセイにおいて高度に活性であり、CDC活性を有することが示された。このように、Penichetらにより、抗原に対する体液性免疫応答および細胞性免疫応答を強化する目的で、IL-2活性を抗体によって認識される抗原にターゲティングするための抗体-IL2融合タンパク質の使用が教示された。同様に、Gilliesおよび共同研究者により、融合タンパク質の抗体部分を腫瘍抗原の標的化のために利用し、IL-2部分を腫瘍細胞に対する免疫応答の刺激のために利用した、がん免疫療法のためのいくつかのIgG-IL-2融合タンパク質が構築された（Sondel, P. M.ら、2012年、Antibodies. 1巻：149～71頁に概説されている）。これらの教示は、全身曝露を増加させる目的で、免疫抑制性Treg細胞の成長および活性を促進するIL-2選択的アゴニストをエフェクター機能欠損Fcタンパク質部分と融合した本発明の技術とは全く異なる。

20

30

Stromおよび共同研究者により、高親和性IL-2受容体を発現するT細胞の活性化を排除する目的で、IL-2とFcタンパク質のN末端を融合した融合タンパク質が構築された（Zheng, X. X.ら、1999年、J Immunol. 1999年、163巻：4041～8頁）。この融合タンパク質は、T1DのT細胞移入マウスモデルにおける自己免疫性糖尿病の発生を阻害することが示された。IL2-Fc融合タンパク質は、T1Dにかかりやすい雌NODマウス由来の疾患促進性T細胞の機能を、疾患にかかりにくい雄NODマウスに移植に移植した場合に阻害することが示された。Stromおよび共同研究者は、IL-2-Fc融合タンパク質により、in vitroにおいて高親和性IL-2受容体を発現する細胞を死滅させることができることも実証した。当該研究者らは、さらに、エフェクター機能コンピテントIgG2b-Fcに由来するFcから構築したIL2-Fc融合タンパク質と変異したエフェクター機能欠損IgG2b-Fcから構築したIL2-Fc融合タンパク質とを比較した。エフェクター機能コンピテントFcを含有するIL2-Fc融合タンパク質のみが疾患の発症の予防に効果的であった。したがって、当該研究者らにより、エフェクター機能を有するIL2-Fc融合タンパク質により、疾患を引き起こす活性化T細胞を排除できること、およびFcエフェクター機能がIL2-Fc融合タンパク質の治療活性に必要であることが教示された。これらの

40

50

教示は、全身曝露を増加させ、T r e g 増大を最適化する目的で、免疫抑制性T r e g 細胞の成長および活性を促進するI L - 2 選択的アゴニストをエフェクター機能欠損F c タンパク質部分と融合した本発明の技術とは全く異なる。S t r o m および共同研究者による他の研究により、移植耐性の促進におけるI L 2 - F c 融合タンパク質の使用が教示されている (Z h e n g , X . X . ら、2003年、Immunity、19巻：503～14頁)。この研究では、I L 2 - F c 融合タンパク質を、それとI L 15 - F c 受容体アンタゴニストおよびラパマイシンを組み合わせる「三重療法」において使用する。再度、当該研究者らにより、I L 2 - F c 融合タンパク質が効果的なものになるにはF c エフェクター機能を有さなければならないことが教示され、さらに、このI L - 2 - F c 融合タンパク質が効果的なものになるには2種の他の分子と組み合わせなければならないことが教示されている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】P e n i c h e t , M . L . ら、Hum Antibodies . (1997年) 8巻：106～18頁

【非特許文献2】S o n d e l , P . M . ら、Antibodies (2012年) 1巻：149～71頁

【非特許文献3】Z h e n g , X . X . ら、Immunity (2003年) 19巻：503～14頁

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、T r e g 細胞に対するI L 2 選択的アゴニストの高い細胞選択性と長い循環半減期を組み合わせたI L 2 選択的アゴニスト - F c 融合タンパク質である、新規の治療剤を提供する。この分子の開発の過程で、生物活性に不可欠なタンパク質の構造要素および設計の特徴を明らかにし、また、所望の治療特性を満たすいくつかの新規のタンパク質の発見を導く、驚くべき予想外の発見があった。

【課題を解決するための手段】

【0011】

30

本発明は、I L 2 選択的アゴニストタンパク質 (I L 2 選択的アゴニスト) とI g G F c タンパク質の融合タンパク質を提供する。I L 2 選択的アゴニスト部分は、I L 2 型の受容体を選択的に活性化し、それにより、T r e g を選択的に刺激することによって治療活性をもたらす。F c 部分は、I L - 2 またはI L 2 選択的アゴニストタンパク質の循環半減期と比較して延長された循環半減期をもたらす。F c 部分は、融合タンパク質の分子サイズを腎臓による巨大分子の糸球体濾過のおおよそのカットオフである60,000ダルトン超まで増大させ、I g G に結合しそれを再利用する受容体である新生児F c 受容体 (F c R n ) タンパク質を通じて融合タンパク質を再利用し、それにより、融合タンパク質の循環半減期を延長することによって、循環半減期を増大させる。F c 部分のF c エフェクター機能、例えば補体依存性細胞傷害 (C D C ) および抗体依存性細胞傷害 (A D C C ) なども欠損させ、それにより、融合タンパク質によりT r e g を選択的に活性化させてT r e g の機能を強化し、かつT r e g の数を増加させることが可能になる。2つのタンパク質部分は、I L 2 選択的アゴニスト部分のロバストな生物活性が維持されるように融合し、F c 部分によって循環半減期の延長を促進し、それにより、T r e g の機能および数を効率的に強化することを可能にする。このT r e g の強化により、過剰増殖性自己免疫反応または炎症反応が抑制され、自己免疫疾患および炎症性疾患の治療に利益がもたらされる。本発明のタンパク質は、単量体であってもよく、F c 部分またはドメインのシステイン残基を通じて二量体を形成する二量体性のものであってもよい。

40

【0012】

より詳細には、本発明は、N末端ヒトI L - 2 改変体タンパク質部分とC末端I g G

50



F c タンパク質部分を含む融合タンパク質であって、前記 I L - 2 融合タンパク質が、高親和性 I L - 2 受容体を選択的に活性化し、それにより、ヒト調節性 T 細胞を選択的に活性化する能力を有する融合タンパク質を提供する。I L - 2 の改変体は、ヒト I L 2 タンパク質（配列番号 1）と比べて N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、および Q 1 2 6 F からなる群より選択される置換を伴うものを含む。さらに、I L - 2 改変体タンパク質は、任意選択で、置換 C 1 2 5 S を伴うヒト I L - 2 を含む。本発明のタンパク質は融合しており、ここで、I L - 2 改変体タンパク質と I g G F c タンパク質の両方が N 末端と C 末端とを有し、前記ヒト I L - 2 改変体タンパク質がその C 末端で I g G F c タンパク質の N 末端と融合していることが好ましい。I L - 2 改変体ドメインと F c ドメインは、I L - 2 改変体タンパク質と I g G F c タンパク質部分の間に位置するリンカーペプチドを通じて接合または融合していることがさらに好ましい。I g G F c タンパク質部分またはドメインは、F c エフェクター機能が欠損しているまたは融合タンパク質の F c 部分のエフェクター機能を低下させる 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含有することが好ましい。

#### 【0013】

本発明の例は、ヒト I L - 2（配列番号 1）と比べてアミノ酸置換 N 8 8 R および C 1 2 5 S を有する I L - 2 改変体タンパク質、配列番号 15 に記載のリンカーペプチド、および配列番号 2 に記載のヒト I g G 1 F c タンパク質を含むタンパク質であって、高親和性 I L - 2 受容体を選択的に活性化し、それにより、ヒト調節性 T 細胞を選択的に活性化する能力を有する融合タンパク質である。本発明の代替タンパク質は、ヒト I L - 2（配列番号 1）と比べてアミノ酸置換 N 8 8 R および C 1 2 5 S を有する I L - 2 改変体タンパク質、配列番号 15 に記載のリンカーペプチド、および配列番号 3 に記載のヒト I g G 2 F c タンパク質を含む。

#### 【0014】

本発明のその他の特定の実施形態は、2 つの同一の鎖を含み、各鎖が N 末端ヒト I L - 2 改変体タンパク質部分と C 末端 I g G F c タンパク質部分とを含む二量体タンパク質であって、N 末端ヒト I L - 2 改変体タンパク質部分が、N 末端と C 末端とを有し、N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、および Q 1 2 6 F からなる群より選択される置換の少なくとも 1 つによって配列番号 1 のヒト I L - 2 野生型と異なり、配列番号 1 に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性を有し、T r e g 細胞上の I L 2 R に結合することによって T r e g 細胞を活性化する能力を有し；N 末端ヒト I L - 2 改変体タンパク質がその C 末端でアミノ酸残基 6 ~ 2 0 個のアミノ酸リンカーの N 末端と接合しており、前記リンカーも C 末端を有し；アミノ酸リンカーの C 末端が、例えば配列番号 3（I g G 2）または配列番号 2（I g G 1 N 2 9 7 A）に対して 9 7 % の配列同一性を有しかつシステイン残基を含有する I g G F c タンパク質部分の N 末端と接合しており；2 つの鎖が、I g G F c タンパク質部分の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基を通じて互いと連結している、二量体タンパク質である。本発明の二量体は、さらに I L - 2 部分の C 1 2 5 S の置換がなされていてよい。本発明のタンパク質は、グリシン残基、セリン残基、およびグリシン残基とセリン残基のミックスの群からなるアミノ酸リンカーを含むことが好ましい。リンカーは、1 2 個から 1 7 個の間のセリン残基とグリシン残基のミックスを含んでよく、グリシン残基とセリン残基の比率は 3 : 1 ~ 5 : 1 の範囲、例えば 4 : 1 の比率であることが好ましい。

#### 【0015】

本発明は、さらに、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物中の上記の組成物を提供する。

#### 【0016】

本発明は、さらに、本明細書に記載のタンパク質をコードする核酸を提供する。核酸は、宿主細胞のゲノムとの組換えのために設計するか、または独立に複製するプラスミドまたは染色体外核酸に導入することができる発現カセットに作動可能に連結していることが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 7 】

本発明は、さらに、それを必要とする患者においてヒト調節性T細胞を選択的に活性化する方法であって、記載されている組成物を含む医薬組成物を、ヒト調節性T細胞濃度が所望のレベルに達するまで、治療有効用量で投与するステップを含む方法を提供する。

## 【 0 0 1 8 】

ヒト血液細胞を1 n Mから0 . 0 1 n Mの間の濃度の請求項1に記載の融合タンパク質と接触させ、次いで、タンパク質と結合する細胞をフローサイトメトリーによって検出することによって、ヒト血液試料中のT r e g細胞の数を測定する方法。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

## (項目1)

a . N末端ヒトI L - 2 改変体タンパク質部分と、

b . C末端I g G F c タンパク質部分と

を含む融合タンパク質であって、

前記I L - 2 融合タンパク質が、高親和性I L - 2 受容体を選択的に活性化し、それにより、ヒト調節性T細胞を選択的に活性化する能力を有する、融合タンパク質。

## (項目2)

前記I L - 2 改変体タンパク質が、ヒトI L 2 タンパク質（配列番号1）と比べてN 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、Q 1 2 6 F、D 8 4 G、またはD 8 4 I からなる群より選択される置換を伴うヒトI L - 2 を含む、項目1に記載の融合タンパク質。

## (項目3)

前記I L - 2 改変体タンパク質が、置換C 1 2 5 Sを伴うヒトI L - 2 を含む、項目1に記載の融合タンパク質。

## (項目4)

前記I L - 2 改変体タンパク質と前記I g G F c タンパク質の両方がN末端とC末端とを有し、前記ヒトI L - 2 改変体タンパク質がそのC末端で前記I g G F c タンパク質のN末端と融合している、項目1に記載の融合タンパク質。

## (項目5)

前記I L - 2 改変体タンパク質部分と前記I g G F c タンパク質部分の間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目1に記載の融合タンパク質。

## (項目6)

前記I g G F c タンパク質が、前記融合タンパク質のF c 部分のエフェクター機能を低下させる1つまたは複数のアミノ酸置換を含有する、項目1に記載の融合タンパク質。

## (項目7)

a . ヒトI L - 2 （配列番号1）と比べてアミノ酸置換N 8 8 RおよびC 1 2 5 Sを有するI L - 2 改変体タンパク質と、

b . 配列番号15に記載のリンカーペプチドと、

c . 配列番号2に記載のヒトI g G 1 F c タンパク質と

を含む融合タンパク質であって、

高親和性I L - 2 受容体を選択的に活性化し、それにより、ヒト調節性T細胞を選択的に活性化する能力を有する、融合タンパク質。

## (項目8)

a . ヒトI L - 2 （配列番号1）と比べてアミノ酸置換N 8 8 RおよびC 1 2 5 Sを有するI L - 2 改変体タンパク質と、

b . 配列番号2に記載のリンカーペプチドと、

c . 配列番号3に記載のヒトI g G 2 F c タンパク質と

を含む融合タンパク質。

## (項目9)

項目1に記載の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

## (項目10)

10

20

30

40

50

ヒト調節性T細胞を選択的に活性化する方法であって、ヒトIL-2（配列番号1）と比べてアミノ酸置換N88RおよびC125Sを有するIL-2改変体タンパク質と、配列番号15に記載のリンカーペプチドと、配列番号3に記載のヒトIgG1Fcタンパク質とを含む医薬組成物を投与するステップを含み、ここで前記医薬組成物は、ヒト調節性T細胞濃度が所望のレベルに達するまで、治療有効用量で投与される、方法。

（項目11）

ヒト調節性T細胞を選択的に活性化する方法であって、項目2に記載のIL-2改変体タンパク質と、

a．配列番号2に記載のヒトIgG1Fcタンパク質または

b．配列番号3に記載のヒトIgG2Fcタンパク質

のいずれかから選択されるヒトIgGFcタンパク質とを含む医薬組成物を投与するステップを含み、ここで前記医薬組成物は、ヒト調節性T細胞濃度が所望のレベルに達するまで、治療有効用量で投与される、方法。

（項目12）

ヒト血液細胞を1nMから0.01nMの間の濃度の項目1に記載の融合タンパク質と接触させ、次いで、前記タンパク質と結合する細胞をフローサイトメトリーによって検出することによって、ヒト血液試料中のTreg細胞の数を測定する方法。

（項目13）

2つの同一の鎖を含む二量体タンパク質であって、ここで各鎖がN末端ヒトIL-2改変体タンパク質部分とC末端IgGFcタンパク質部分とを含み、

前記N末端ヒトIL-2改変体タンパク質部分が、

a．N末端とC末端とを有し、

b．N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、およびQ126Fからなる群より選択される少なくとも1つの置換によって配列番号1のヒトIL-2野生型と異なり、

c．配列番号1に対して少なくとも97%の配列同一性を有し、そして

d．Treg細胞上のIL2Rに結合することによってTreg細胞を活性化する能力を有し、

前記N末端ヒトIL-2改変体タンパク質がそのC末端でアミノ酸残基6～20個のアミノ酸リンカーのN末端と接合しており、前記リンカーもC末端を有し、そして

前記アミノ酸リンカーのC末端が、配列番号3に対して97%の配列同一性を有しかつシステイン残基を含むIgGFcタンパク質部分のN末端と接合しており、前記2つの鎖が、前記IgGFcタンパク質部分のシステイン残基を通じて互いと連結している、二量体タンパク質。

（項目14）

前記IL-2改変体タンパク質が、置換C125Sを伴うヒトIL-2をさらに含む、項目13に記載の二量体タンパク質。

（項目15）

前記アミノ酸リンカーが、グリシン残基、セリン残基、およびグリシン残基とセリン残基のミックスの群より選択されるリンカーからなる、項目13に記載のタンパク質。

（項目16）

前記IL-2改変体タンパク質部分が、置換N88Rを有する、項目13に記載のタンパク質。

（項目17）

前記リンカーが、12個から17個の間のセリン残基とグリシン残基のミックスを含む、項目13に記載のタンパク質。

（項目18）

前記リンカーが、4：1の比率のグリシン残基とセリン残基を含む、項目13に記載の融合タンパク質。

（項目19）

10

20

30

40

50

項目 1 に記載の融合タンパク質をコードする核酸。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、IL-2または半減期が増大したIL2-Fc融合タンパク質の単回用量後の、循環半減期、ピーク薬物レベル、生物学的有効濃度、およびTreg細胞増殖の刺激に必要な持続時間の関係を示す図である。破線は皮下注射後のIL-2の時間をわたっての血中レベルを表し、実線はIL2-Fc融合タンパク質の時間をわたっての血中レベルを表す。水平な点線は、それぞれIL2RおよびIL2Rを発現する細胞を活性化するために必要な濃度（EC50値）を示す。両端矢印は、細胞増殖を刺激するために必要なEC50でのIL-2への曝露の持続時間（5～6時間）を示す。

10

【0020】

【図2】図2は、Fc融合タンパク質についての設計構成を示す。融合パートナー（X）をFcタンパク質のN末端（X-Fc）またはC末端（Fc-X）において融合することができる。XとFcの間にリンカーペプチドを挿入することができる。

【0021】

【図3A】図3は、フローサイトメトリーによって測定される、CD4+T細胞におけるIL-2によって刺激されるSTAT5リン酸化およびN88RL9AG1によって刺激されるSTAT5リン酸化の用量反応を示す。実施例3に記載の通り、細胞を、IL-2またはN88RFcを上に表示されている濃度で用いて37℃で10分にわたって処理し、固定し、透過処理し、抗体を用いて染色し、次いで、フローサイトメトリー分析に供した。CD4+としてゲートをかけた（gated）細胞が示されており、また、4つの象限のそれぞれに示されている通り、細胞に、CD25およびpSTAT5に関してさらにゲートをかけた。各象限内の数字は、各ゲートにおけるCD4+細胞の百分率を示す。上の象限内の細胞は、Treg細胞が富化された集団である、最も高い1～2%のCD25を発現する細胞を表し、右側の象限内の細胞は、pSTAT5+である。A・N88RL9AG1は、CD25<sup>high</sup>細胞のみを高い選択性で刺激するが、IL-2は、CD25<sup>low</sup>細胞とCD25<sup>high</sup>細胞の両方をピコモル濃度に至るまで大規模に刺激する。B・D20HLOG2はpSTAT5刺激活性を有さない。2つの独立した実験においてpSTAT5活性化は観察されなかった。C・D20H/IL2はCD25<sup>high</sup>細胞におけるpSTAT5を刺激するが、D20HLOG2は刺激しないことを示す対照。プロットは疑似カラー方式で示されている。どちらのタンパク質も10<sup>-8</sup>Mの濃度で試験した。

20

30

【図3B】図3は、フローサイトメトリーによって測定される、CD4+T細胞におけるIL-2によって刺激されるSTAT5リン酸化およびN88RL9AG1によって刺激されるSTAT5リン酸化の用量反応を示す。実施例3に記載の通り、細胞を、IL-2またはN88RFcを上に表示されている濃度で用いて37℃で10分にわたって処理し、固定し、透過処理し、抗体を用いて染色し、次いで、フローサイトメトリー分析に供した。CD4+としてゲートをかけた（gated）細胞が示されており、また、4つの象限のそれぞれに示されている通り、細胞に、CD25およびpSTAT5に関してさらにゲートをかけた。各象限内の数字は、各ゲートにおけるCD4+細胞の百分率を示す。上の象限内の細胞は、Treg細胞が富化された集団である、最も高い1～2%のCD25を発現する細胞を表し、右側の象限内の細胞は、pSTAT5+である。A・N88RL9AG1は、CD25<sup>high</sup>細胞のみを高い選択性で刺激するが、IL-2は、CD25<sup>low</sup>細胞とCD25<sup>high</sup>細胞の両方をピコモル濃度に至るまで大規模に刺激する。B・D20HLOG2はpSTAT5刺激活性を有さない。2つの独立した実験においてpSTAT5活性化は観察されなかった。C・D20H/IL2はCD25<sup>high</sup>細胞におけるpSTAT5を刺激するが、D20HLOG2は刺激しないことを示す対照。プロットは疑似カラー方式で示されている。どちらのタンパク質も10<sup>-8</sup>Mの濃度で試験した。

40

【図3C】図3は、フローサイトメトリーによって測定される、CD4+T細胞における

50

IL-2によって刺激されるSTAT5リン酸化およびN88RL9AG1によって刺激されるSTAT5リン酸化の用量反応を示す。実施例3に記載の通り、細胞を、IL-2またはN88RFcを上に表示されている濃度で用いて37℃で10分にわたって処理し、固定し、透過処理し、抗体を用いて染色し、次いで、フローサイトメトリー分析に供した。CD4+としてゲートをかけた(gated)細胞が示されており、また、4つの象限のそれぞれに示されている通り、細胞に、CD25およびpSTAT5に関してさらにゲートをかけた。各象限内の数字は、各ゲートにおけるCD4+細胞の百分率を示す。上の象限内の細胞は、Treg細胞が富化された集団である、最も高い1~2%のCD25を発現する細胞を表し、右側の象限内の細胞は、pSTAT5+である。A.N88RL9AG1は、CD25<sup>high</sup>細胞のみを高い選択性で刺激するが、IL-2は、CD25<sup>low</sup>細胞とCD25<sup>high</sup>細胞の両方をピコモル濃度に至るまで大規模に刺激する。B.D20HLOG2はpSTAT5刺激活性を有さない。2つの独立した実験においてpSTAT5活性化は観察されなかった。C.D20H/IL2はCD25<sup>high</sup>細胞におけるpSTAT5を刺激するが、D20HLOG2は刺激しないことを示す対照。プロットは疑似カラー方式で示されている。どちらのタンパク質も10<sup>-8</sup>Mの濃度で試験した。

#### 【0022】

【図4】図4は、N88RL9AG1を用いて処理したCD4+T細胞では、高レベルのFOX P3を発現する細胞におけるpSTAT5レベルの刺激が示されたことを示す。実施例3に記載の通り、細胞を4×10<sup>-9</sup>MのIL-2またはN88RL9AG1を用いて処理し、次いで、分析した。N88RL9AG1を用いて処理したpSTAT5+細胞は大多数が同様にFOX P3+であったが、IL-2を用いて処理したpSTAT5+細胞はFOX P3-とFOX P3+の両方であり、大多数がFOX P3-であった。

#### 【0023】

【図5A】図5は、HEK293細胞において産生される異なるFc融合構築物のタンパク質収量を示す。実施例1に記載の通り、タンパク質を最適化された一過性発現系において並行して発現させ、精製した。結果は、培養物30mlからの精製タンパク質の最終的な収量として表されている。A.N88R/IL2-Fc融合タンパク質のタンパク質収量は、ペプチドリンカーの長さが増すにしたがって増加する。B.wt IL2-Fc融合タンパク質の収量は、15残基のペプチドリンカーを用いるとほんのわずかだけ増強した。D20H/IL2-Fc融合タンパク質の高収量は、Fc-X構成ではなくX-Fc構成で得られた。

【図5B】図5は、HEK293細胞において産生される異なるFc融合構築物のタンパク質収量を示す。実施例1に記載の通り、タンパク質を最適化された一過性発現系において並行して発現させ、精製した。結果は、培養物30mlからの精製タンパク質の最終的な収量として表されている。A.N88R/IL2-Fc融合タンパク質のタンパク質収量は、ペプチドリンカーの長さが増すにしたがって増加する。B.wt IL2-Fc融合タンパク質の収量は、15残基のペプチドリンカーを用いるとほんのわずかだけ増強した。D20H/IL2-Fc融合タンパク質の高収量は、Fc-X構成ではなくX-Fc構成で得られた。

#### 【0024】

【図6A】図6は、N88R/IL2-Fc融合タンパク質における、IL-2生物活性のペプチドリンカーの長さに対する依存性を示す。(A)CD25<sup>high</sup>CD4+T細胞(Treg)におけるpSTAT5シグナルはペプチドリンカーの長さが増すにしたがって増加する。(B)CD25<sup>low</sup>細胞では、いずれのN88R/IL2-Fcタンパク質を用いても有意なpSTAT5シグナルは観察されなかった。10<sup>-8</sup>MのIL-2内部対照のpSTAT5シグナルが両方のパネルに黒色の三角形によって示されている。

【図6B】図6は、N88R/IL2-Fc融合タンパク質における、IL-2生物活性のペプチドリンカーの長さに対する依存性を示す。(A)CD25<sup>high</sup>CD4+T細胞

10

20

30

40

50

胞 (T r e g) における p S T A T 5 シグナルはペプチドリナーの長さが増すにしたがって増加する。(B) C D 2 5 - / <sup>1</sup> 〇 <sup>w</sup> 細胞では、いずれの N 8 8 R / I L 2 - F c タンパク質を用いても有意な p S T A T 5 シグナルは観察されなかった。1 0 <sup>- 8</sup> M の I L - 2 内部対照の p S T A T 5 シグナルが両方のパネルに黒色の三角形によって示されている。

#### 【 0 0 2 5 】

【図 7】図 7 は、ヒト T r e g における D 2 0 H / I L 2 - F c 融合タンパク質の生物活性を示す。D 2 0 H L 1 5 A G 1 の効力は N 8 8 R L 1 5 A G 1 の効力よりも実質的に低く、また、D 2 0 H L 1 5 A G 1 (X - F c 構成) および A G 1 L 1 5 D 2 0 H (F c - X 構成) は同様の効力を有する。3 種のタンパク質は全て 1 5 残基のペプチドリナーを有する。

10

#### 【 0 0 2 6 】

【図 8 A】図 8 は、1 5 残基のペプチドリナーを有する、および有さない w t I L - 2 - F c p S T A T 5 活性の生物活性を示すグラフである。T r e g 細胞 (A) および C D 2 5 - / <sup>1</sup> 〇 <sup>w</sup> 細胞 (B) のどちらにおいても、1 5 残基のペプチドリナーによる I L - 2 生物活性の増強はわずかであった。

【図 8 B】図 8 は、1 5 残基のペプチドリナーを有する、および有さない w t I L - 2 - F c p S T A T 5 活性の生物活性を示すグラフである。T r e g 細胞 (A) および C D 2 5 - / <sup>1</sup> 〇 <sup>w</sup> 細胞 (B) のどちらにおいても、1 5 残基のペプチドリナーによる I L - 2 生物活性の増強はわずかであった。

20

#### 【 0 0 2 7 】

【図 9 - 1】図 9。ヒト P B M C における 7 種の異なる免疫細胞型に対する I L - 2 および I L - 2 選択的アゴニストタンパク質の選択性。N 8 8 R L 1 5 A G 1 は、w t I L - 2 および W T L 1 5 A G 1 と比較して T r e g に対して高度に選択的であり、多数の細胞型において N 8 8 R / I L 2 よりも高い選択性を示す。

【図 9 - 2】図 9。ヒト P B M C における 7 種の異なる免疫細胞型に対する I L - 2 および I L - 2 選択的アゴニストタンパク質の選択性。N 8 8 R L 1 5 A G 1 は、w t I L - 2 および W T L 1 5 A G 1 と比較して T r e g に対して高度に選択的であり、多数の細胞型において N 8 8 R / I L 2 よりも高い選択性を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

30

#### 【 0 0 2 8 】

##### 緒言

本発明は、3 つの重要なタンパク質要素：(1) T r e g 細胞に対して高度に選択的になるように改変された、工学的に操作された I L - 2 サイトカイン、(2) タンパク質の循環半減期を増大させるエフェクター機能欠損 F c タンパク質、および(3) 融合タンパク質の高い生物学的活性のために必要である、2 つの部分の間のリンカーペプチドを含む新規の治療用融合タンパク質である。本発明を構成する融合タンパク質は、I L - 2 融合タンパク質に関する先行技術の教示に反する最初の予期しない知見によって発見され、これらの分子を導いた研究により、それらの生物学的なおよび治療活性にとって重要である、鍵となる構造と活性の関連性が定義された。本発明によって定義される分子により、自己免疫性病理および炎症性病理を抑制する T 細胞の小さな亜集団の産生を刺激する新規の機構によって自己免疫疾患を安全かつ有効に治療することが可能になる。このパラダイムを破壊する治療薬により、いくつかの異なる自己免疫疾患が治療される可能性があり得る。

40

#### 【 0 0 2 9 】

##### 定義

「配列番号 1 に対する少なくともあるパーセント (例えば、9 7 %) の配列同一性」とは、本明細書で使用される場合、2 つまたはそれ超の核酸またはポリペプチドの配列が同じである程度を指す。評価のウィンドウにわたる、例えば、目的の配列の長さにわたる、目的の配列と第 2 の配列の間のパーセント同一性は、配列をアラインメントし、同一性を

50

最大にするためにギャップを導入し、評価のウィンドウ内の、同一の残基と対向する残基（ヌクレオチドまたはアミノ酸）の数を決定し、ウィンドウ内に入る目的の配列または第2の配列の残基の総数（どちらか大きい方）で割り、100を掛けることによって計算することができる。特定のパーセント同一性を達成するために必要な同一の残基の数を計算する場合、分数を丸めて最も近い整数にする。パーセント同一性は、種々のコンピュータプログラムを使用して算出することができる。例えば、BLAST2、BLASTN、BLASTP、Gapped BLASTなどのコンピュータプログラムにより、目的の配列間でアラインメントが生成され、パーセント同一性がもたらされる。KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻：5873～5877頁、1993年と同様に改変したKarlinおよびAltschulのアルゴリズム（KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻：22264～2268頁、1990年）をAltschulら（Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～410頁、1990年）のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み入れる。比較する目的でギャップが挿入されたアラインメントを得るために、Altschulら（Altschulら、Nucleic Acids Res. 25巻：3389～3402頁、1997年）に記載の通りGapped BLASTを利用する。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムの初期パラメータを使用することができる。PAM250またはBLOSUM62マトリックスを使用することができる。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information（NCBI）を通じて公的に入手可能である。これらのプログラムに関してはURL ワールドワイドウェブアドレス：「ncbi.nlm.nih.gov」のウェブサイトを参照されたい。特定の実施形態では、パーセント同一性を、BLAST2を使用し、NCBIによって提供される初期パラメータを用いて算出する。

#### 【0030】

「N末端」とは、カルボキシル酸基を有するカルボキシル末端とは対照的に、アミノ基を有するペプチドまたはポリペプチドの末端を指す。

#### 【0031】

「C末端」とは、アミノ基を有するアミノ末端とは対照的に、カルボン酸基を有するペプチドまたはポリペプチドの末端を指す。

#### 【0032】

「C末端IgG Fcタンパク質部分」とは、それぞれがIgG分子の2つの重鎖のヒンジ領域、第2の定常ドメイン、および第3の定常ドメインを有し、ヒンジ領域を通じて互いとジスルフィド結合したカルボキシ末端重鎖からなる、2つの同一のタンパク質断片に由来する融合タンパク質の一部を指す。これは、補体タンパク質C1qおよびIgG-Fc受容体（FcR）と相互作用し、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞傷害（ADCC）エフェクター機能を媒介するIgG分子の一部であると機能的に定義される。エフェクター機能が低下するように、循環半減期が増大するように、およびグリコシル化部位が排除されるように、配列を改変することができる。

#### 【0033】

##### IL2改変体

本発明のIL-2改変体タンパク質は、IL-2 選択的アゴニストである。これらは、機能的に、IL2R 受容体複合体と比べてIL2R 受容体複合体を選択的に活性化する。これは、配列番号1の野生型IL-2に対して少なくとも95%の配列同一性を有するとして構造的に定義され、Treg細胞を優先的に活性化する能力によって機能的に定義される野生型IL-2タンパク質に由来する。タンパク質は、CD4+CD25-low T細胞またはNK細胞と比較したTreg細胞におけるリン酸化STAT5タンパク質のレベルによって、または、NK細胞に対する、フィトヘマグルチニンにより刺激したT細胞の選択的活性化によって測定される、TregにおけるIL-2受

容体シグナル伝達を選択的に活性化する能力によって機能的に定義することもできる。

【0034】

「N末端ヒトIL-2改変体タンパク質部分」とは、上記の通り構造的におよび機能的に定義される野生型IL-2タンパク質に由来する融合タンパク質のN末端ドメインを指す。

【0035】

「C末端」とは、アミノ基を有するアミノ末端とは対照的に、カルボン酸基を有するペプチドまたはポリペプチドの末端を指す。

【0036】

Treg

10

「Treg」または「Treg細胞」とは、調節性T細胞を指す。調節性T細胞は、他の免疫細胞の活性を抑制するT細胞のクラスであり、フローサイトメトリーを使用し、細胞マーカー表現型CD4+CD25+FOXP3+によって定義される。FOXP3は細胞内タンパク質であり、染色には細胞の固定および透過処理が必要であるので、生存Tregを定義するためには、細胞表面表現型CD4+CD25+CD127-を使用することができる。Tregは、tTreg（胸腺由来）およびpTreg（末梢由来、末梢中のナイーブなT細胞から分化する）などの種々のTregサブクラスも包含する。Tregは全てIL2R受容体を発現し、それら自体のIL-2は産生せず、成長に関してIL-2に依存し、どちらのクラスも、IL2R選択的アゴニストによって選択的に活性化されることが当業者には理解されよう。

20

【0037】

ペプチドリンカー

「ペプチドリンカー」とは、融合タンパク質を構成する2つのタンパク質の間に位置するアミノ酸配列と定義され、したがって、リンカーペプチド配列は、パートナータンパク質のいずれにも由来しない。ペプチドリンカーは、構成成分タンパク質部分の適切なタンパク質フォールディングおよび安定性を促進するため、タンパク質の発現を改善するため、または2つの融合パートナーのより良好な生物活性を可能にするために、融合タンパク質にスペーサーとして組み入れられる（Chenら、2013年、Adv Drug Deliv Rev. 65巻（10号）：1357～69頁）。ペプチドリンカーは、構造化されていない柔軟なペプチドまたは剛性の構造化されたペプチドのカテゴリーに分けることができる。

30

【0038】

Fc融合タンパク質

「Fc融合タンパク質」は、哺乳動物IgGタンパク質のFcドメインの翻訳リーディングフレームを別のタンパク質（「Fc融合パートナー」）のものと融合して新規の単一の組換えポリペプチドを生じさせる組換えDNA技術によって作出されたタンパク質である。Fc融合タンパク質は、一般には、ヒンジ領域に位置するジスルフィド結合によって一緒に接合した、ジスルフィド連結二量体として作製される。

【0039】

機能的活性化

40

「生物活性」とは、定量的な細胞に基づくin vitroアッセイにおける生物学的活性の測定値を指す。

【0040】

「Treg細胞の機能的活性化」は、TregにおけるIL-2媒介性応答と定義される。Treg細胞の機能的活性化についてのアッセイ読み取りは、pSTAT5の刺激、Treg細胞増殖、およびTregエフェクタータンパク質のレベルの刺激を含む。

【0041】

設計および構築

Fc融合タンパク質の設計および構築には多数の選択肢があり、所望の生物学的活性および薬学的特性を有する分子の生成を可能にするために、これらの設計選択肢の中での選

50



択を以下に示す。重要な設計選択肢は、(1) IL2 選択的アゴニストの性質、(2) Fc タンパク質部分の選択、(3) 融合タンパク質における融合パートナーの構成、(4) Fc と融合パートナータンパク質の間の接合部のアミノ酸配列である。

#### 【0042】

##### 一般的な方法

一般に、本発明の融合タンパク質の調製は、本明細書に開示されている手順、および認められている関連する組換えDNA技法、例えば、ポリメラーゼ連鎖増幅反応(PCR)、プラスミドDNAの調製、制限酵素を用いたDNAの切断、オリゴヌクレオチドの調製、DNAのライゲーション、mRNAの単離、適切な細胞へのDNAの導入、宿主の形質転換またはトランスフェクション、宿主の培養によって達成することができる。さらに、融合分子を、カオトロピック剤および周知の電気泳動方法、遠心分離方法およびクロマトグラフィー方法を使用して単離し、精製することができる。これらの方法に関する開示に関しては、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版(1989年)); およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York (1989年)を参照されたい。

10

#### 【0043】

本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子は、所望の融合物をコードするDNAを得るために使用する基本的なステップとして制限酵素消化およびライゲーションを必要とする。ライゲーション前にDNA断片の末端を修飾することが必要になる場合があり、これは、突出部を埋めること、ヌクレアーゼ(例えば、ExoIII)を用いて断片(複数可)の末端部分を欠失させること、部位特異的変異誘発、または、PCRにより新しい塩基対を添加することによって達成することができる。選択された断片の接合を容易にするために、ポリリンカーおよびアダプターを使用することができる。発現構築物は、一般には、複数ラウンドの制限、ライゲーション、およびE. coliの形質転換を使用する複数段階で組み立てる。発現構築物の構築に適した多数のクローニングベクターが当技術分野で公知であり(ZAPおよびpBLUESCRIPT SK-1、Stratagene、LaJolla、Calif.、pET、Novagen Inc.、Madison、Wis. - Ausubelら、1999年に記載)、本発明には特定の選択は重大ではない。クローニングベクターの選択は、発現構築物を宿主細胞に導入するために選択する遺伝子移入系の影響を受ける。各段階の最後に、得られた構築物を制限、DNA配列、ハイブリダイゼーションおよびPCR分析によって分析することができる。

20

30

#### 【0044】

一般には、当技術分野で公知の方法によって本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子に特定の変異を導入するために、部位特異的変異誘発を使用する。例えば、米国特許出願公開第2004/0171154号; Storiciら、2001年、Nature Biotechnology 19巻: 773~776頁; Krenら、1998年、Nat. Med. 4巻: 285~290頁; およびCalissanoおよびMacino、1996年、Fungal Genet. Newslett. 43巻: 15~16頁を参照されたい。任意の部位特異的変異誘発手順を本発明において使用することができる。本発明の改変体を調製するために使用することができる、入手可能な市販のキットが多く存在する。

40

#### 【0045】

種々のプロモーター(転写開始調節領域)を本発明に従って使用することができる。適切なプロモーターの選択は、提案される発現宿主に依存する。選択された宿主において機能的である限りは、異種供給源由来のプロモーターを使用することができる。

#### 【0046】

本明細書に記載のタンパク質の発現を容易にするために、種々のシグナル配列を使用することができる。発現宿主における効率的な分泌およびプロセッシングのために選択または

50

設計されたシグナル配列も使用することができる。TCRコード配列またはマウスIL-2コード配列と相同なシグナル配列を哺乳動物細胞に使用することができる。他の適切なシグナル配列/宿主細胞対としては、*B. subtilis*における分泌のための*B. subtilis sacB*シグナル配列、および*P. pastoris*での分泌のための*Saccharomyces cerevisiae* - 接合因子または*P. pastoris* 酸性ホスファターゼ*phoI*シグナル配列が挙げられる。シグナル配列は、シグナルペプチダーゼ切断部位をコードする配列を通じて直接タンパク質コード配列と接合することもでき、短いヌクレオチド橋を通じて接合することもできる。

#### 【0047】

真核生物のタンパク質の発現系について、転写および翻訳を増強するための要素が同定されている。例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)プロモーター1000bpを異種プロモーターのどちらかの側に位置づけることにより、植物細胞における転写レベルが10~400倍上昇し得る。発現構築物は、適切な翻訳開始配列を含むべきである。適切な翻訳開始のためにKozakコンセンサス配列を含むように発現構築物を改変することにより、翻訳のレベルが10倍上昇し得る。

#### 【0048】

発現カセットを、使用する宿主に適合する適切なベクターに接合する。ベクターは、発現させる融合タンパク質をコードするDNA配列に適応させることができるものでなければならない。適切な宿主細胞としては、真核細胞および原核細胞、好ましくは、容易に形質転換することができ、培養培地中で迅速な成長を示す細胞が挙げられる。具体的に好ましい宿主細胞としては、例えば*E. coli*、*Bacillus subtilis*などの原核生物、ならびに動物細胞および酵母株、例えば、*S. cerevisiae*などの真核生物が挙げられる。一般に、哺乳動物細胞、特にHEK、J558、NSO、SP2-OまたはCHOが好ましい。他の適切な宿主としては、例えば、Sf9などの昆虫細胞が挙げられる。従来の培養条件を使用する。Sambrook、上記を参照されたい。次いで、安定に形質転換またはトランスフェクトされた細胞株を選択することができる。*in vitro* 転写 - 翻訳系も発現系として使用することができる。

#### 【0049】

所望の融合タンパク質をコードする核酸は、細胞をトランスフェクトするための標準の技法によって宿主細胞に導入することができる。「トランスフェクトすること(*transfecting*)」または「トランスフェクション(*transfection*)」という用語は、リン酸カルシウム共沈澱、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、微量注射、ウイルスによる形質導入および/または組み込みを含めた、核酸を宿主細胞に導入するための従来の技法の全てを包含するものとする。宿主細胞をトランスフェクトするために適した方法は、Sambrookら、上記、および他の研究室教本において見いだすことができる。

#### 【0050】

あるいは、本明細書に記載のタンパク質の構築の全部または一部に関して合成遺伝子構築を使用することができる。これは、目的のポリペプチド分子をコードするように設計されたポリヌクレオチド分子の*in vitro*合成を伴う。遺伝子合成は、Tianら(*Nature* 432巻: 1050~1054頁)に記載されているマルチプレックスマイクロチップに基づく技術およびオリゴヌクレオチドを合成し、光プログラム可能なマイクロ流体チップ上に集合させる同様の技術などの、いくつかの技法を利用して実施することができる。

#### 【0051】

本発明の融合タンパク質は、収集した宿主細胞から、または培養培地から単離する。標準のタンパク質の精製技法を使用して、目的のタンパク質を培地から、または収集した細胞から単離する。特に、精製技法を使用して、ローラーボトル、スピナーフラスコ、組織培養プレート、バイオリアクター、または発酵槽を含めた種々の手法から所望の融合タンパク質を大規模に(すなわち、少なくともミリグラム分量で)発現させ、精製することが

10

20

30

40

50

できる。

【0052】

IL2選択的アゴニスト部分

置換N88Rを伴うIL-2は、IL2R 受容体に対するIL2選択的アゴニストの代表例である(Shanafelt, A. B.ら、2000年、Nat Biotechnol. 18巻: 1197~202頁)。IL2/N88Rは、IL2R 受容体サブユニットおよびIL2R 受容体複合体への結合を欠損しているが、IL2R

受容体複合体には結合し、IL2R を発現するPHA活性化T細胞の増殖をwt IL-2と同様に有効に刺激することができ、一方、IL2R を発現するNK細胞の増殖を刺激する能力は3,000分の1に低下する。同様の活性プロファイルを有する他のIL2R 選択的アゴニストとしては、置換N88I、N88G、およびD20Hを伴うIL-2が挙げられ、また、置換Q126LおよびQ126F(IL2RGサブユニットとの接触残基)を伴う他のIL2改変体もIL2R 選択的アゴニスト活性を有する(Cassel, D. J.ら、2002年、Curr Pharm Des., 8巻: 2171~83頁)。これらのIL2選択的アゴニスト分子のいずれかをIL2/N88R部分の代わりに使用することができ、Fc融合タンパク質が同様の活性を有することが予測されることが当業者には理解されよう。上述の変異は全て、wt IL-2、または、不對のシステイン残基を排除することによってIL-2安定性を促進する置換である置換C125Sを伴うwt IL-2のバックグラウンドに対して行うことができる。本発明は、IL-2受容体活性化活性に著しい影響を与えることなく産生または安定性を改善する他の変異または短縮と共に使用することもできる。

【0053】

本発明の改変体は、任意選択で、アミノ酸配列と核酸配列のどちらにも適用される保存的に置換された改変体を含む。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一または基本的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指す、または、アミノ酸配列をコードしない核酸の場合には、基本的に同一の配列を指す。詳細には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された(または全ての)コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって達成することができる(Batzlerら、Nucleic Acid Res. 19巻: 5081頁(1991年); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260巻: 2605~2608頁(1985年); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8巻: 91~98頁(1994年))。遺伝暗号の縮重が原因で、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは全てアミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによりアラニンが指定されるあらゆる位置において、コドンを、コードされるポリペプチドを変更させることなく、記載されている対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変異は、保存的に改変された変異の1つの種である、サイレント変異である。本明細書では、ポリペプチドをコードするあらゆる核酸配列は、あらゆる可能性のある核酸のサイレント変異も記載する。核酸における各コドン(普通はメチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および、普通はトリプトファンに対する唯一のコドンであるTGG以外)を改変して機能的に同一の分子を得ることができることが当業者には理解されよう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のサイレント変異のそれぞれが、記載されている配列のそれぞれに含意される。

【0054】

アミノ酸配列の保存的置換に関しては、コードされる配列内の単一のアミノ酸または小さな百分率のアミノ酸を変更させる、付加するまたは欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加は、変更により、アミノ酸が化学的に同様のアミノ酸に置換される、保存的に改変された改変体であることが当業者には理解されよう。機能的に同様のアミノ酸がもたらされる保存的置換表は当技術分野で周知である。そのような保存的に改変された改変体は、本発明の多型改変体、種

間ホモログ、および対立遺伝子に加わるものであり、それらを排除するものではない。

【 0 0 5 5 】

以下の群はそれぞれ、互いと保存的置換であるアミノ酸を含有する：

- 1) アラニン ( A )、グリシン ( G )；
- 2) セリン ( S )、トレオニン ( T )；
- 3) アスパラギン酸 ( D )、グルタミン酸 ( E )；
- 4) アスパラギン ( N )、グルタミン ( Q )；
- 5) システイン ( C )、メチオニン ( M )；
- 6) アルギニン ( R )、リシン ( K )、ヒスチジン ( H )；
- 7) イソロイシン ( I )、ロイシン ( L )、バリン ( V )；および
- 8) フェニルアラニン ( F )、チロシン ( Y )、トリプトファン ( W )。

10

【 0 0 5 6 】

F C タンパク質部分

重要な設計選択は、F c タンパク質部分の性質である。F c 融合タンパク質の主要な治療への適用は、( 1 ) 融合パートナータンパク質に免疫グロブリン F c エフェクター機能を付与すること；または ( 2 ) 融合パートナータンパク質の循環半減期を増大させることである ( C z a j k o w s k y ら、2012年、EMBO Mol Med. 4巻：1015～28頁)。I g G タンパク質の主要なエフェクター機能は、補体依存性細胞傷害 ( C D C ) および抗体依存性細胞傷害 ( A D C C ) であり、これらの機能は、それぞれ補体タンパク質 C 1 q および I g G - F c 受容体 ( F c R ) への F c 結合によって媒介される。これらのエフェクター機能は、特定の抗原標的または細胞に対する免疫応答を導くまたは増強するために治療用タンパク質を使用する場合に重要である。本発明の融合タンパク質は、単に I L 2 選択的アゴニスト部分の循環半減期が増大するように設計され、エフェクター機能は必要なく、さらには毒性であり得、したがって、明白に望ましくない。例えば、エフェクター機能コンピテント F c を有する I L 2 選択的アゴニスト - F c 融合タンパク質により、本発明の融合タンパク質によって活性化し、増大させようとする T r e e g 細胞が死滅する潜在性があり、これはまさに自己免疫疾患に対する治療目標の逆である。エフェクター機能 ( C D C 、 A D C C )、循環半減期、および安定性が異なる4種のヒト I g G サブクラスが存在する ( S a l f e l d , J . G . 、2007年、Nature Biotechnology 25巻：1369～72頁)。I g G 1 は、F c エフェクター機能を有し、最も豊富な I g G サブクラスであり、また、U S F D A による認可を受けた治療用タンパク質に最も一般的に使用されているサブクラスである。I g G 2 は、F c エフェクター機能が欠損しているが、他の I g G 2 分子との二量体を形成しやすく、また、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合がスクランブルすること ( s c r a m b l i n g ) に起因して不安定になりやすい。I g G 3 は、F c エフェクター機能を有し、また、非常に長い、剛性のヒンジ領域を有する。I g G 4 は、F c エフェクター機能が欠損しており、他のサブクラスよりも循環半減期が短く、また、I g G 4 二量体はヒンジ領域における単一のジスルフィド結合のみにより異なる I g G 4 分子間での H 鎖の交換が導かれることに起因して生化学的に不安定である。I g G 2 および I g G 4 に由来する F c タンパク質部分は、エフェクター機能を有さず、本発明に使用することができることが当業者には理解されよう。F c 配列の改変は当技術分野に記載されており、したがって、凝集が妨げられるように I g G 2 F c ヒンジ領域を改変できること、または、二量体が安定化するように I g G 4 F c のヒンジ領域を改変できることも当業者には理解されよう。あるいは、I g G 1 のエフェクター機能が欠損した改変体が生成されている。そのような改変体の1つは、N - 連結グリコシル化部位の場所である N 2 9 7 位にアミノ酸置換を有する。このアスパラギン残基の置換により、グリコシル化部位が除去され、A D C C 活性および C D C 活性が有意に低下する ( T a o , M . H . ら、1989年、J Immunol. 143巻：2595～2601頁)。本発明ではこの改変体を代表例として使用する。別のエフェクター機能欠損 I g G 1 改変体は、C 1 q および F c R 結合部位におけるアミノ酸を変異させる I g G 1 ( L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / P 3 3 1 S )

20

30

40

50

(Oganesyanら、2008年、Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64巻:700~4頁)であり、エフェクターが欠損しており、かつ安定なIL2SA-Fc融合タンパク質を生成するための、これらのまたは同様のFc改変体の使用が当業者には検討されよう。二量体ではなく安定な単量体になるように工学的に操作されるFcタンパク質部分の形態も(Dumont, J. A.ら、2006年、BioDrugs 20巻:151~60頁;Liu Zら、J Biol Chem. 2015年 20;290巻:7535~62頁)、本発明のIL-2選択的アゴニストと組み合わせることができることも当業者には理解されよう。さらに、IL-2-Fc H鎖ポリペプチドとFc H鎖ポリペプチドの組合せで構成され、二重特異性抗体技術(Zhu Zら、1997年 Protein Sci. 6巻:781~8頁)を使用して組み立てられる、機能的に単量体であるヘテロ二量体も本発明のIL-2選択的アゴニストと組み合わせることができることが当業者には理解されよう。IgG部分に抗原特異性を有する(Penichet, M. L.ら、1997年、Hum Antibodies. 8巻:106~18頁)または有さない(Bellら、2015年、J Autoimmun. 56巻:66~80頁)インタクトなIgG抗体分子を用いて、いくつかのIL-2 Fc融合タンパク質が作出されている。さらに、ヒンジ領域の一部または全部を欠くFc改変体を本発明と共に使用することができることが当業者には理解されよう。

#### 【0057】

Fc融合タンパク質は、本発明では、融合パートナータンパク質XがN末端にあり、FcがC末端にあるX-FcおよびFc-X、ならびにFcがN末端にあり、融合パートナータンパク質がC末端にあるFc-Xと示される2つの構成で作出することができる(図2)。文献において、異なる融合パートナーはN末端またはC末端Fc融合に対して別個の優先性を有し得ることが示されている例がある。例えば、FGF21は、Fc-X構成に対する強力な優先性を有することが示されている。Fc-FGF21はFGF21自体と基本的に同じ受容体活性化生物活性を有するが、FGF21-Fcの生物活性は100分の1に低下する(Hechtら、2012年、PLoS One. 7巻(11号):e49345頁)。いくつかのIL-2 Fc融合タンパク質が種々の適用のために作出されており、これらは、Fcと、Fc-X構成(Gilliesら、1992年、Proc Natl Acad Sci、89巻:1428~32頁;Bellら、2015年、J Autoimmun. 56巻:66~80頁)およびX-Fc構成(Zheng, X. X.ら、1999年、J Immunol. 163巻:4041~8頁)のどちらで直接融合した場合にも良好なIL-2生物活性を有することが報告されている。Gavinら(US20140286898A1)には、遊離のIL-2サイトカインの生物活性と同様の生物活性を有する、IL-2およびある特定のIL-2改変体をFc-X構成で含有するFc融合タンパク質が記載されているが、それとは対照的に、Zhengら(Zheng, X. X.ら、1999年、J Immunol. 1999年、163巻:4041~8頁)の結果からは、X-Fc構成のIL-2改変体融合タンパク質では生物活性が低下するまたは生物活性がないことが見いだされた。したがって、Gavinらは、概して、N末端IL-2 Fc融合タンパク質とは反対の事項を教示している。融合タンパク質構成の選択に影響を及ぼす別の因子は循環半減期に対する影響である。文献において再び生じた知見は、Fc-X構成のIL-2融合タンパク質は、ヒトにおけるヒトIgG1の21日の半減期または現在FDAに認可を受けているFc融合タンパク質(表I)の半減期よりもかなり短い、比較的短い循環半減期を有するというものである。Fc-X構成のIgG-IL2融合タンパク質は、マウスではおよそ数時間(Gillies S. D.、2002年 Clin Cancer Res.、8巻:210~6頁;Gillies, S. D.、US2007/0036752A2;Bell C. J.、2015年 J Autoimmun. 56巻:66~80頁)、ヒトでは、およそ3.3時間(Ribas A.、J 2009年 Transl Med. 7巻:68頁)および3.7時間(King D. M.、2004年 J Cli

10

20

30

40

50

n Oncol.、22巻：4463～73頁）の比較的短い循環半減期を有することが報告されており、Fc-IL2融合タンパク質は、マウスでは12.5時間の循環半減期を有することが報告されている（Zhu E. F.、Cancer Cell. 2015 13；27巻（4号）：489～501頁）。Fc部分のC末端とIL-2部分の間でのタンパク質分解が短い循環半減期に寄与する（Gillies S. D.、2002年 Clin Cancer Res.、8巻：210～6頁；Zhu E. F.、2015年 Cancer Cell. 27巻：489～501頁）。これらの比較的短い半減期が原因で、本発明者らは、X-Fc構成のIL2選択的アゴニストFc融合タンパク質に着目してきた。

【0058】

#### リンカー

Fcと融合パートナータンパク質の間の接合部のアミノ酸配列は、（1）2つのタンパク質配列の直接融合、または（2）間に入るリンカーペプチドを伴う融合のいずれであってもよい。現在US FDAにより臨床使用に関して認可を受けている10種のFc融合タンパク質（表I）のうち、8種が融合パートナータンパク質とFcの直接融合であり、2種がリンカーペプチドを有し、したがって、多くのFc融合タンパク質がリンカーペプチドを伴わずに機能的であり得る。リンカーペプチドは、2つのタンパク質部分の間のスペーサーとして含まれる。リンカーペプチドにより、構成成分タンパク質部分の適切なタンパク質フォールディングおよび安定性が促進し、タンパク質の発現を改善し、また、構成成分タンパク質部分のより良好な生物活性を可能にすることができる（Chenら、2013年、Adv Drug Deliv Rev. 65巻：1357～69頁）。多くの融合タンパク質に使用されるペプチドリinkerは、構造化されていない柔軟なペプチドになるように設計される。天然のタンパク質内の独立した構造的ドメイン間のリンカーペプチドの長さ、配列、およびコンフォメーションに関する試験により、柔軟なペプチドリinkerを設計するための理論的基礎がもたらされている（Argos、1990年、J Mol Biol. 211巻：943～58頁）。Argosにより、グリシンのような小さな非極性残基とセリンおよびトレオニンのような小さな極性残基で構成される長い柔軟なリンカーペプチドであり、多数のグリシン残基により高度に柔軟なコンフォメーションが可能になり、セリンまたはトレオニンによりペプチド内または構成成分である融合タンパク質部分との疎水性相互作用が限定される極性表面エリアがもたらされるリンカーペプチドの手引きがもたらされた。文献に記載されている多くのペプチドリinkerは、例えば配列GGGGSの反復など、グリシンおよびセリンに富むものであるが、Argosの一般的な推奨に従った他の配列（Argos、J Mol Biol. 1990年 20；211巻（4号）：943～58頁）も使用することができることが当業者には理解されよう。例えば、本明細書に記載のタンパク質のうちの1つは、グリシンとアラニンで構成されるリンカーペプチド（配列番号15）を含有する。十分に伸長されたベータ鎖コンフォメーションを有する柔軟なリンカーペプチドは、端から端までの長さが残基当たりおよそ3.5である。したがって、5残基、10残基、15残基、または10残基のリンカーペプチドの最大の十分に伸長された長さはそれぞれ17.5、35、52.5、または70になる。ペプチドリinkerの最大の端から端までの長さは、本発明におけるペプチドリinkerの特性を定義するための指針にもなり得る。本発明内でのリンカーペプチドの目的は、IL-2選択的アゴニスト部分とその同族受容体を会合させ、またFcRnへFc部分を結合させて融合タンパク質の再利用および循環半減期の延長を可能にするために、個々の融合タンパク質部分の適切なコンフォメーションおよび配向を達成し得ることである。これらの相互作用に影響を及ぼす因子は予測することが難しいので、リンカーペプチドに対する要件およびその適切な長さは、経験的に試験し、決定しなければならない。表Iに列挙されているUS FDAによる認可を受けたFc融合タンパク質10種のうち8種がそのようなペプチドを欠くことによって証明されるように、多くのFc融合タンパク質にはリンカーペプチドは必要ない。対照的に、GLP-1とFcの融合物であるデュラグルチドは、生物活性に強力に影響を及ぼす15残基のペプチドリinker

10

20

30

40

50

ーを含有する (Glaesner、米国特許第7,452,966B2号)。IL-2-Fc融合タンパク質に関する当技術分野における先行研究では、リンカーペプチドは生物活性に必要なものではないことが示されている。wt IL-2または置換C125Sを伴うIL-2をFc-X配向で含有するIL-2融合タンパク質は、ペプチドリンカーを有せずに (Gilliesら、1992年、Proc Natl Acad Sci、89巻:1428~32頁; Gavinら、米国特許出願第20140286898A1号) またはペプチドリンカーを有して (Bellら、2015年、J Autoimmun、56巻:66~80頁)、遊離のIL-2サイトカインのものと同様のIL-2生物活性を有することが報告されている。X-Fc配向では、Zhengらにより、X-Fc構成のIL-2融合タンパク質のIL-2生物活性はIL-2自体のものと基本的に区別できないことが報告された (Zheng, X. X.ら、1999年、J Immunol、1999年、163巻:4041~8頁)。この広範囲にわたる先行技術は、高いIL-2生物活性を有するためには、IL-2タンパク質とFcの融合にリンカーペプチドは必要ではないことを教示するものである。しかし、Gavinらは、受容体選択性の変更された、ある特定のIL-2改変体を含有するX-Fc構成のFc融合タンパク質では、ペプチドリンカーを有さなくても5残基のペプチドリンカーを有しても生物活性が低下したまたは生物活性がないことを報告した (Gavinら、米国特許出願第20140286898A1号)。

【0059】

#### バイオアッセイ

候補タンパク質の生物学的活性を特徴付けるためにはロバストな定量的バイオアッセイが必要である。これらのアッセイでは、IL2受容体の活性化の測定、Tregにおける活性化の下流の機能的結果の測定、ならびに治療に関連性のある転帰および活性化されたTregの機能の測定がなされるべきである。これらのアッセイは、IL2選択的アゴニスト分子の治療活性および効力を測定するために使用することができ、また、動物またはヒトにおけるIL2選択的アゴニストの薬力学を測定するためにも使用することができる。1つのアッセイでは、シグナル伝達タンパク質であるSTAT5のリン酸化を測定し、これは、リン酸化されたタンパク質 (pSTAT5) に特異的な抗体を用いたフローサイトメトリーで測定される。STAT5のリン酸化は、IL-2シグナル伝達経路における必須のステップである。STAT5は、Tregの発生に必須であり、IL-2の不在下でのTreg細胞の産生には、CD4+CD25+細胞において発現する構成的に活性化された形態のSTAT5が十分である (Mahmud, S. A.ら、2013年、JAKSTAT 2巻:e23154頁)。したがって、Treg細胞におけるリン酸化STAT5 (pSTAT5) の測定は、これらの細胞におけるIL-2による活性化の反映として当業者には理解され、また、適切な曝露時間および条件でなされたIL-2処理の他の生物学的転帰を予測するものになる。機能的活性化に関する別のアッセイでは、IL-2により刺激されたTreg細胞の増殖を測定する。Treg増殖は、精製されたTreg細胞にトリチウム標識チミジンを組み入れることにより、フローサイトメトリーによって測定される混合細胞集団内のTreg細胞数の増加およびCD4+CD25+FOX P3+またはCD4+CD25+CD127-マーカー表現型の頻度によって、Ki-67などの増殖関連細胞周期タンパク質のTreg細胞における発現の増加によって、または、Treg細胞におけるフローサイトメトリーによるカルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル (CFSE) などの生体蛍光色素の細胞分裂関連希釈の測定によって、測定できることが当業者には理解されよう。IL-2を用いたTregの機能的活性化に関する別のアッセイは、Tregの安定性の増大である。pTreg細胞は、一部では、不安定であり、Th1エフェクターT細胞およびTh17エフェクターT細胞に分化する潜在性があると考えられている。TregのIL-2による活性化により、Tregを安定化し、この分化を予防することができる (Chen, Q.ら、2011、J Immunol、186巻:6329~37頁)。TregのIL-2による刺激の別の転帰は、Tregの免疫抑制性活性に寄与するCTLA4、GITR、LAG3、TIGIT

T、IL-10、CD39、およびCD73などのTreg機能的エフェクター分子のレベルの刺激である。

#### 【0060】

IL2選択的アゴニストFcタンパク質を開発するために、Fc-X構成のIL-2融合タンパク質に関しては循環半減期が短いことが報告されているので、本発明者らは、まずX-Fc構成のタンパク質に着目した。1つはリンカーペプチドを有し、1つはリンカーペプチドを有さない2つのタンパク質を最初に作製し試験し、予想外に、ペプチドリリンカーを有するタンパク質はIL-2生物活性を有し、ペプチドリリンカーを有さないタンパク質は検出可能な生物活性を有さないことが示された。どちらのタンパク質もIL2RAに対して高い結合親和性を示し、これにより、どちらのタンパク質も適正にフォールディングされていることが示される。これらの結果により、IL-2受容体の活性化および生物活性にはリンカーペプチドが必要であることが示唆された。次いで、他の変数を排除し、この仮説を検定するために、一連の追加の類似体を作製した。これらの試験からの結果により、この治療用タンパク質についての重要な構造と活性の関連性の発見が導かれ、所望の活性および薬学的特質を有する新規の分子が創出された。

#### 製剤

本発明の融合タンパク質の医薬組成物は、従来の方法に従って非経口（特に、静脈内または皮下）送達用に製剤化されるものと定義される。一般に、医薬製剤は、本発明の融合タンパク質を、例えば食塩水、緩衝食塩水、水中5%デキストロースなどの薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて含む。製剤は、バイアル表面などでのタンパク質の喪失を予防するために、1種または複数種の賦形剤、防腐剤、可溶化剤、緩衝剤、アルブミンをさらに含んでよい。製剤化の方法が当技術分野で周知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、Gennaro編、Mack Publishing Co.、Easton, Pa.、第19版、1995年において開示されている。

実例として、医薬製剤は、本発明の融合タンパク質を含む容器を含むキットとして供給することができる。治療用タンパク質は、単回用量または複数回用量用の注射可能な溶液の形態で、注射前に再構成する滅菌散剤として、または充填済みシリンジとして提供することができる。そのようなキットは、医薬組成物の適応症および使用に関する書面の情報をさらに含んでよい。さらに、そのような情報は、本発明の融合タンパク質が、本発明の融合タンパク質に対する既知の過敏症を有する患者には禁忌である旨の記載を含んでよい。

本発明のIL-2選択的アゴニスト融合タンパク質は、医薬組成物を含めた組成物に組み入れることができる。そのような組成物は、一般には、タンパク質および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、これだけに限定されないが、薬学的投与に適合する食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤(isotonic agent)および吸収遅延剤などを含む。追加の活性化合物（例えば、抗生物質）も組成物に組み入れることができる。

医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように製剤化する。本発明のIL-2選択的アゴニスト融合タンパク質は、非経口経路によって投与される可能性が高い。投与の非経口経路の例としては、例えば、静脈内、皮内、および皮下が挙げられる。非経口適用のために使用される溶液または懸濁物は、以下の構成成分を含んでよい：注射用水、食塩水溶液、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸、クエン酸またはリン酸などの緩衝液、および、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの、張度を調整するための薬剤。pHは、一塩基および/または二塩基リン酸ナトリウム、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基を用いて調整することができる（例えば、約7.2~7.8、例えば、7.5のpHまで）。非経口調製物は



、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数回用量バイアルに封入することができる。

注射による使用に適した医薬組成物は、滅菌水溶液または分散物、および滅菌された注射可能な溶液または分散物を即時調製するための滅菌粉末を含む。静脈内投与に関しては、適切な担体として、生理的食塩水、滅菌水、またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌されているべきであり、また、容易な注射可能性（*syringability*）が存在する限りでは流体であるべきである。組成物は、製造および保管の条件下で安定であるべきであり、また、細菌および真菌などの微生物の混入作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、および適切なそれらの混合物を含有する溶媒または分散媒であってよい。必要な粒子サイズの維持は、分散物の場合では、界面活性剤、例えば、ポリソルベートまたはTweenを使用することによって容易にすることができる。微生物の作用の予防は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムが組成物中に含まれることが好ましい。

10

滅菌された注射可能な溶液は、必要量の活性化化合物を、適切な溶媒中に、上に列挙されている成分の1つ、または成分の組合せと一緒に組み入れ、その後、必要に応じて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散物は、活性化化合物を、基本的な分散媒および上に列挙されているものからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み入れることによって調製される。滅菌された注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合では、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過したその溶液から活性成分と任意の追加的な所望の成分の粉末を得る真空乾燥および凍結乾燥である。

20

一実施形態では、IL-2選択的アゴニスト融合タンパク質を、埋め込み物およびマイクロカプセル封入送達系を含めた制御放出製剤などのIL-2選択的アゴニスト融合タンパク質を体からの迅速な排除から保護する担体を用いて調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤は、標準の技法を使用して調製することができる。

30

医薬組成物は、投与に関する指示と一緒に容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

#### 投与

本発明の融合タンパク質は、非経口経路によって投与することが好ましい。好ましい経路は皮下経路であるが、静脈内、筋肉内、および真皮下（*subdermal*）投与も使用することができる。皮下または筋肉内経路に関しては、デポおよびデポ製剤を使用することができる。ある特定の疾患に対しては、特殊化された投与経路を使用することができる。例えば、炎症性眼疾患に対して、眼内注射を使用することができる。融合タンパク質は、総体積1ml当たり約0.1~10mcgの濃度で使用する事ができるが、0.01mcg/ml~100mcg/mlの範囲の濃度を使用することができる。

40

用量の決定は当技術分野における通常の技術のレベルの範囲内に入る。投薬は、治療期間にわたって毎日または毎週であるか、または別の断続的な頻度であってもよい。静脈内投与は、1時間~数時間の典型的な期間にわたるボーラス注射または注入によるものである。持続放出製剤も使用することができる。一般に、本発明の融合タンパク質の治療有効量は、循環Treg細胞の臨床的に有意な変化、患部組織内に存在するTreg細胞の臨床的に有意な変化、または疾患症状の臨床的に有意な変化などの、治療される状態の臨床的に有意な変化を生じさせるために十分な量である。

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータをヒトにおける使用のためのさまざまな投与量の製剤化に使用することができる。そのような化合物の投与量は、毒性がほとんどまたは全く伴わずに、最大半量の有効濃度（EC50；すなわち、Treg細胞の

50

最大半量の刺激が達成される試験化合物の濃度)を含む循環濃度の範囲内に入ることが好ましい。投与量は、使用する剤形および利用する投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明の方法において使用する化合物のいずれに関しても、最初に細胞培養アッセイから治療有効用量を推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定されたEC50を含む循環血漿中濃度範囲が達成されるように製剤化することができる。そのような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、酵素結合免疫吸着検定法によって測定することができる。

本明細書で定義されている通り、IL-2選択的アゴニスト融合タンパク質の治療有効量(すなわち、有効な投与量)は、選択されるポリペプチドおよび投薬頻度に左右される。例えば、患者の体重1kg当たりおよそ0.001~0.1mgの範囲の単回投薬量を投与することができ、一部の実施形態では、約0.005mg/kg、約0.01mg/kg、約0.05mg/kgを投与することができる。組成物は、1日おきに1回を含め、1日当たり1回から1週間当たり1回もしくは複数回、または1カ月当たり1回もしくは複数回までで投与することができる。これだけに限定されないが、疾患または障害の重症度、以前の治療、被験体の全体的な健康および/または年齢、患者に存在するTreg細胞のレベル、ならびに存在する他の疾患を含めた、ある特定の因子が、被験体を有効に治療するために必要な投与量およびタイミングに影響を及ぼす可能性があることが当業者には理解されよう。さらに、治療有効量の本発明のIL-2選択的アゴニスト融合タンパク質を用いた被験体の治療は、一連の治療になる可能性がある。

#### 【0061】

##### 自己免疫疾患

本発明の療法から利益を受け得る疾患のいくつかが確認されている。しかし、自己免疫疾患におけるTreg細胞の役割は非常に活発な研究分野であり、追加の疾患が本発明によって治療可能であると同定される可能性がある。自己免疫疾患は、免疫系により自身のタンパク質、細胞、および組織が攻撃されるヒト疾患と定義される。自己免疫疾患についての包括的な一覧表および総説は、The Autoimmune Diseases (RoseおよびMacKay、2014年、Academic Press)に見いだすことができる。

#### 【0062】

##### 他の融合タンパク質

本発明のFcタンパク質部分の目的は、単に循環半減期を増大させることであるので、分子サイズの増大および腎クリアランスの速度の低下という同じ目標を達成するために、本発明において発見された構造と活性の関連性を使用して、IL-2選択的アゴニスト部分を他のタンパク質のN末端と融合することができることが当業者には理解されよう。IL2選択的アゴニストを血清アルブミンのN末端と融合することができ(Sleep, D.ら、2013年、Biochim Biophys Acta. 1830巻:5526~34頁)、それにより、融合タンパク質の流体力学的半径がIL-2部分と比べて増大し、また、FcRNによる再利用もなされる。本発明のIL2選択的アゴニスト部分を組換え非免疫原性アミノ酸ポリマーのN末端と融合することも当業者には理解されよう。この目的のために開発された非免疫原性アミノ酸ポリマーの2つの例は、XTENポリマー、A、E、G、P、S、およびTアミノ酸の鎖(Schellenberger, V.ら、2009年、Nat Biotechnol. 27巻:1186~90頁)、ならびにPASポリマー、P、A、およびSアミノ酸残基の鎖(Schlappschy, M.ら、2007年、Protein Eng Des Sel. 20巻:273~84頁)である。

#### 【0063】

本明細書において引用されている全ての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願が具体的にかつ個別に参照により組み込まれることが示されたと同じく参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0064】

前述の発明は、明瞭な理解のために図解および実施例により一部の詳細について記載されているが、本発明の教示に照らして、添付の特許請求の範囲の主旨または範囲から逸脱することなく、それらに対してある特定の変化および改変を成すことができるは当業者には容易に明らかになろう。

## 【実施例】

## 【0065】

以下の実施例は、単に例示として提供されるものであり、限定として提供されるものではない。基本的に同様の結果が得られるように変化または改変することができる種々の重大でないパラメータは当業者には容易に理解されよう。

10

## 【0066】

## (実施例1)

IL-2 選択的アゴニスト-IgG Fc 融合タンパク質のクローニング、発現、および精製

N88RL9AG1 (配列番号4) をコードする cDNA を DNA 合成および PCR 集合によって構築した。N88RL9AG1 構築物は、マウス IgG1 シグナル配列、置換 N88R および C125S を伴う成熟ヒト IL-2 配列 (配列番号1)、9 アミノ酸リンカーペプチド配列 (配列番号15)、ならびに置換 N297A を含有するヒト IgG1 の Fc 領域 (配列番号2) で構成されるものであった。N88R/IL2 は、IL2RB への結合および IL2R 受容体を発現する細胞に対する選択的アゴニスト活性が低下した IL2 選択的アゴニストである (Shanafelt, A. B. ら、2000 年、Nat Biotechnol. 18 巻: 1197~202 頁)。IgG1 Fc の N297 にある N 結合グリコシル化部位の排除により、Fc エフェクター機能が低下する (Tao, M. H. ら、1989 年、J Immunol. 143 巻: 2595~2601 頁)。D20HIL0G2 は、マウス IgG1 シグナル配列、置換 D20H および C125S を伴う IL-2 (配列番号1)、ならびにヒト IgG2 (配列番号3) に由来する Fc タンパク質部分で構成されるものであった。D20H IL-2 改変体は、N88R と同様の選択的アゴニスト活性を有することが報告されている (Cassell, D. J. ら、2002 年、Curr Pharm Des., 8 巻: 2171~83 頁)。

20

30

## 【0067】

これらの cDNA を、制限部位 HindIII および NotI を使用して pcDNA3.1 (+) (Life Technologies, Carlsbad, CA) にクローニングした。構築物を含有する精製された発現ベクタープラスミドを HEK293 細胞に一過性にトランスフェクトした。HEK293 細胞をトランスフェクションの24時間前に振とうフラスコ中に播種し、無血清の既知組成培地を使用して成長させた。DNA 発現構築物を、0.1 リットルの懸濁物の HEK293 細胞に一過性にトランスフェクトした。24 時間後に、細胞を計数して生存度および生存細胞計数を得た。5 日目に培養物を収集し、馴化培地上清を 3000 x g で 15 分遠心分離することによって清澄化した。上清をプロテイン A カラム (GE Healthcare) に流し、0.25% 酢酸 (pH 3.5) を用いて溶出させ、溶出したタンパク質を 1 M の Tris (pH 8.0) で中和し、30 mM の HEPES、pH 7、150 mM の NaCl に対して透析することによってタンパク質を精製した。次いで、試料を、0.2 μm の膜フィルターを通して滅菌濾過し、還元条件下および非還元条件下の SDS PAGE によって分析した。タンパク質はジスルフィド連結した二量体として移動した。タンパク質の濃度を、算出された吸光係数 1.11 mg/ml cm<sup>-1</sup> を使用して吸光度によって決定し、アリコートをして -80 °C で保管した。

40

## 【0068】

サイトカイン N88R/IL2 および D20H/IL2 は、配列番号1の改変体であり、安定性を改善するために追加の変異 C125S を付加した以外は基本的に米国特許第 6

50

、955,807B1号に記載の通りE coliにおいて産生させた。

#### 【0069】

##### (実施例2)

N88RL9AG1およびD20HLOG2の受容体結合活性の決定。

N88RL9AG1およびD20HLOG2が適正にフォールディングされているかどうかを決定するために、IL-2受容体サブユニットIL2RAおよびIL2RBに対するそれらの親和性を、Biacore T-200 instrument (GE Healthcare) を使用して表面プラズモン共鳴 (SPR) によって決定した。IL2RA細胞外ドメインタンパク質、IL2RB細胞外ドメインタンパク質およびIL-2タンパク質 (R&D Systems、Minneapolis、MN) をCM-5 Biacoreチップ上にNHS/EDCカップリングにより、それぞれ最終的なRU (共鳴単位) 値30および484まで固定化した。IL2RAへの結合のカイネティクス (kinetics) を、IL2およびN88RL9AG1を0.6nM~45nMにわたる5つの濃度で、毎分50μlの流量で測定した。IL2RBへの結合のカイネティクスを、IL2については16.7nM~450nM、Fc融合タンパク質については14nM~372nMの5つの濃度、毎分10μlの流量で測定した。解離定数 (Kd) を動力学定数 (kinetic constant) から、Biacore評価ソフトウェアバージョン2.0を使用し、IL-2については1:1フィット、N88RL9AG1およびD20HLOG2については二価フィットを仮定して算出した。Biacore評価ソフトウェアにより、定常状態の結合値を使用して平衡Kd値を算出した。

#### 【0070】

IL-2とN88RL9AG1の両方についてIL2RAへの結合を検出した。N88RL9AG1についてのRmax値14.43は、IL2のRmax値2.62の5.5倍であり、これは、N88RL9AG1 (82,916g/M) の分子量がIL-2 (15,444g/M) よりも大きいという事実と一致した。IL-2についてのkon値、koff値、およびKd値は、公開されたSPR値から予測される範囲内であった (表II)。動力学的方法と平衡方法の両方によって決定したところ、N88RL9AG1の親和性は、IL2の親和性のおよそ2倍であった。IL2のIL2RBへの結合を、6.19のRmaxを用いて検出した。kon、koff、およびKdについて決定された値は、文献において報告されている範囲内であった。報告された値は、 $3.1 \times 10^{-8}$  M (IL2RA) および  $5.0 \times 10^{-7}$  M (IL2RB) (Myszka, D. G. ら、1996年、Protein Sci. 5巻: 2468~78頁);  $5.4 \times 10^{-8}$  M (IL2RA) および  $4.5 \times 10^{-7}$  M (IL2RB) (Shanafelt, A. B. ら、2000年、Nat Biotechnol. 18巻: 1197~202頁); および  $6.6 \times 10^{-9}$  M (IL2RA) および  $2.8 \times 10^{-7}$  M (IL2RB) (Ring, A. M. ら、2012年、Nat Immunol. 13巻: 1187~95頁) である。N88RL9AG1のIL2RBへの結合は基本的に検出されず、試験した最高濃度でわずかな結合が検出され (Rmax = 0.06)、これは、IL2とN88RL9AG1の分子量の差異、およびIL2RA結合の結果に基づいて予測されたものをはるかに下回った。D20HLOG2タンパク質もIL2RAへの結合について試験し、N88RL9AG1のKdと同様である、 $8.3 \times 10^{-9}$  MのKdを有することが見いだされた。したがって、SPR結合試験により、N88RL9AG1タンパク質とD20HLOG2タンパク質はどちらもIL2RAに結合することが示され、これにより、当該タンパク質が適正にフォールディングされていることが示される。

#### 【0071】

##### (実施例3)

N88RL9AG1およびD20HLOG2のT細胞に対する生物活性。

N88RL9AG1およびD20HLOG2のT細胞に対する生物活性を、特定のT細胞サブセットにおけるリン酸化STAT5 (pSTAT5) レベルを測定することによって決定した。pSTAT5のレベルを、固定し、透過処理した細胞において、リン酸化S

TAT5 ペプチドに対する抗体を使用してフローサイトメトリーによって測定した。Treg 細胞は、CD25 を構成的に発現し、CD25 発現レベルが上位 1 % の細胞では高度に Treg 細胞が富化されている (Jailwala, P. ら、2009 年、PLOS One, 2009 年; 4 巻: e6527 頁; Long, S. A. ら、2010 年、Diabetes 59 巻: 407 ~ 15 頁)。したがって、フローサイトメトリーのデータで、Treg サブセットおよび CD4 エフェクター T 細胞サブセットについて、それぞれ CD25<sup>high</sup> 群 (CD25 を発現する細胞の上位 1 ~ 2 %) および CD25<sup>low</sup> 群にゲートをかけた。

#### 【0072】

凍結保存 CD4 + T 細胞 (Astarte Biologies, Seattle, WA) を解凍し、1 % ヒト AB 血清 (Mediatech, Manassas, VA) を含有する X-VIVO 15 (Lonza, Allendale, NJ) 培地で洗浄し、37 °C で 2 時間にわたって回復させた。次いで、細胞を 15 × 75 mm のチューブ中、0.1 ml に 1 ml 当たり細胞 5 × 10<sup>6</sup> 個の濃度で分配した。細胞を種々の濃度の IL-2 または Fc 融合タンパク質を用いて 37 °C で 10 分処理した。次いで、細胞を Cytofix Fixation Buffer を用いて 37 °C で 10 分にわたって固定し、Perm Buffer III (BD Biosciences, Santa Clara, CA) を用いて氷上で 30 分にわたって透過処理し、次いで、洗浄した。次いで、細胞を、抗 CD4 - Pacific Blue (BD Biosciences, Santa Clara, CA)、抗 CD25 - AF488 抗体 (eBioscience, San Diego, CA)、および抗 pSTAT5 - AF547 抗体 (BD Biosciences) の混合物を製造者によって推奨されている濃度で用いて 20 °C で 30 分にわたって染色し、洗浄し、LSRII instrument (BD Biosciences) でフローサイトメトリーのデータを取得した。Flowjo 解析ソフトウェア (Flowjo, Ashland, OR) を使用してデータを解析した。

#### 【0073】

このアッセイで N88RL9AG1 を用いた結果から、IL-2 と比較して、N88RL9AG1 は Treg 集団に対する注目すべき選択性を有することが示された (図 3A)。N88RL9AG1 により活性化された CD4 + 細胞は 1 % 未満であり、CD25<sup>high</sup> 細胞に対する選択性は非常に強力であった。対照的に、40 nM の濃度で IL-2 により活性化された CD4 + T 細胞は 80 % を超え、高い割合の pSTAT5 + 細胞が CD25 を低レベルで発現するまたは発現しないものであった。試験した最低濃度の 4 pM でさえ、依然として IL-2 では CD25<sup>low</sup> 細胞と CD25<sup>high</sup> 細胞のどちらにおいても有意な pSTAT5 レベルが刺激された。

#### 【0074】

次いで、D20HLOG2 を CD4 + T 細胞 pSTAT5 アッセイにおいて活性について試験した。予想外に、D20HLOG2 はこのアッセイでは活性を有さなかった (図 3B)。10<sup>-8</sup> M の D20H / IL2 サイトカイン (Fc と融合していない改変体 IL-2 サイトカイン) を用いた追加の対照では、CD25<sup>high</sup> 細胞のロバストかつ選択的な pSTAT5 活性化が示された (図 3C)。D20HLOG2 を用いた活性の欠如は、D20HLOG2 が IL2RA に IL-2 および N88RL9AG1 の Kd と同様の Kd で結合し、それにより、D20HLOG2 が適正にフォールディングされていたことが示されることを考えると、特に驚くべきことであった。

#### 【0075】

N88RL9AG1 によって選択的に活性化された CD25<sup>high</sup> 細胞が Treg であることを確認するために、活性化された細胞を、Treg 細胞についての別の分子マーカーである pSTAT5 と FOXP3 の両方について共染色した。CD4 + 細胞を、pSTAT5 染色について上記の通り、4 nM の IL-2 または N88RL9AG1 を用いて処理し、固定し、透過処理し、その後、FOXP3 Perm Buffer (BioLegend, San Diego, CA) 1 ml を用いて室温で 30 分処理し、次いで、

洗浄し、FOX P 3 Perm Bufferに再懸濁させた。透過処理した細胞を、抗FOX P 3 - e F l u o r 4 5 0、抗CD 2 5 - A F 4 8 8 ( e B i o s c i e n c e 、 S a n D i e g o 、 C A )、および抗p S T A T 5 - A F 5 4 7 ( B D B i o s c i e n c e s ) 抗体の混合物を用いて20で30分にわたって染色し、洗浄し、フローサイトメトリーによって分析した。この実験の結果により、活性化S T A T 5を伴うN 8 8 R L 9 A G 1 処理細胞 ( p S T A T 5 + 細胞 ) が高い割合でFOX P 3 も高レベルで発現することが示された。この結果により、活性化された細胞がT r e g 細胞について高度に富化されていることのさらなる証拠がもたらされる。対照的に、I L - 2 で処理したp S T A T 5 + 細胞は、FOX P 3 + とFOX P 3 - の両方であり、大多数がFOX P 3 - 細胞であった。

10

#### 【0076】

##### (実施例4)

生物活性のために重要な構造と活性の関連性の決定。

実施例3に記載の予想外の結果により、I L 2 生物活性がN 8 8 R L 9 A G 1 では検出されたがD 2 0 H L 0 G 2 では検出されなかったことが、リンカーペプチドの存在に起因することが示唆された。この知見を検証するため、ならびにF c 部分のアイソタイプおよびI L - 2 部分における選択性変異などの他の変数の寄与を排除するために、全てI g G 1 N 2 9 7 A F c を使用した類似体のパネルを設計し、作製した(表I I I)。

#### 【0077】

全ての構築物においてF c のC末端リシン残基を欠失させたこと、および産生細胞培養物の体積を100mlの代わりに30mlにした以外は実施例1に記載の通り、cDNAを構築し、タンパク質を発現させ、精製した。全てのタンパク質が良好な収量で回収された。実際、N 8 8 R / I L 2 シリーズの分子の収量の比較により、ペプチドリンカーの長さが増すにしたがってタンパク質収量が増加する明らかな傾向が示され、N 8 8 R L 2 0 A G 1 ( 最長のペプチドリンカーを有する ) はN 8 8 R L 0 A G 1 ( ペプチドリンカーを有さない ) よりも6 . 8 倍多く回収された(図5 A)。リンカーペプチドを含有するタンパク質の収量の増加についての基礎は未だに不明であるが、発現レベルの上昇、分泌速度の増大、タンパク質安定性の増大、または精製効率の上昇に起因する可能性がある。興味深いことに、N 8 8 R L 1 5 A G 1 の収量がN 8 8 R L 0 A G 1 と比較して4 . 5 倍であったのと比較して、W T L 1 5 A G 1 の収量はW T L 0 A G 1 の収量よりもわずかしが高くなかった(1 . 8 倍)。D 2 0 H L 1 5 A G 1 の収量は、N 8 8 R L 1 5 A G 1 の収量と同様であり、これにより、I L - 2 選択性変異は収量に対して有意に影響を及ぼさないことが示され、また、これらのタンパク質の収量はどちらもA G 1 L 1 5 D 2 0 H よりも有意に多かった(それぞれ4 . 3 倍および3 . 4 倍)(図5 B)。集合的に、これらの結果により、ペプチドリンカーの長さの増大が、N 8 8 R / I L 2 を含有するF c 融合タンパク質のより高いタンパク質収量に関連すること、w t I L - 2 を含有するF c 融合タンパク質の収量はリンカーペプチドの存在に対する感受性がはるかに低いこと、およびX - F c 構成のI L - 2 - F c 融合タンパク質が作製されることが示された。

20

30

#### 【0078】

これらの精製されたタンパク質を、CD 4 + 細胞の代わりにヒトCD 3 + T細胞(負に選択された)を使用し、細胞を試験タンパク質と一緒に10分ではなく20分インキュベートしたこと以外は基本的に実施例3に記載の通り、ヒトT細胞p S T A T 5 バイオアッセイにおいて試験した。

40

#### 【0079】

N 8 8 R / I L 2 シリーズの分子からの結果により、T r e g 富化集団における生物活性がペプチドリンカーの長さによって劇的に影響を受けることが示された(図6 A)。T r e g 集団内のp S T A T 5 シグナル(% p S T A T 5 + 細胞)は、ペプチドリンカーの長さが増すにしたがって漸進的に増加した。この生物活性の増大は、 $10^{-8}$  Mの試験タンパク質での最大p S T A T 5 シグナルおよびE C 5 0 値の両方に反映された(表I V)。最長のペプチドリンカーを有するタンパク質であるN 8 8 R L 2 0 A G 1 では、N 8 8

50

R L 0 A G 1 に対して最大 p S T A T 5 シグナルの 4 . 2 倍の増加が示された。N 8 8 R L 0 A G 1 p S T A T 5 シグナルは、最高濃度 (  $10^{-8}$  M ) で I L - 2 による活性化の 50 % に達しなかったため、リンカーペプチドを含有するタンパク質の N 8 8 R L 0 A G 1 に対する E C 50 の改善倍率を決定することは不可能であった。しかし、N 8 8 R L 2 0 A G 1 の E C 50 および試験した N 8 8 R L 0 A G 1 の最高濃度に基づいて、N 8 8 R L 2 0 A G 1 が N 8 8 R L 0 A G 1 の 100 分の 1 未満の E C 50 を示すことを推定することができる。

#### 【 0 0 8 0 】

予測通り、N 8 8 R / I L 2 分子のいずれも C D 2 5 - /  $10^{-8}$  M 細胞に対する検出可能な活性は基本的に存在しなかったが、 $10^{-8}$  M の I L - 2 では C D 2 5 - /  $10^{-8}$  M 細胞の 54 . 2 % で p S T A T 5 活性が刺激された ( 図 6 B ) 。

10

#### 【 0 0 8 1 】

W T L 0 A G 1 と W T L 1 5 A G 1 の比較から、リンカーペプチドの w t I L - 2 - F c 融合タンパク質に対する有意な効果は N 8 8 R / I L 2 - F c 融合タンパク質よりもはるかに低いことが示された ( 図 7 ) 。 T r e g 垂集団では、W T L 0 A G 1 および W T L 1 5 A G 1 はどちらも有意な生物活性を有し、実際、p S T A T 5 リン酸化の最大レベルが I L - 2 よりもおよそ 2 倍高く刺激された。しかし、W T L 0 A G 1 および W T L 1 5 A G 1 はまた、C D 2 5 - /  $10^{-8}$  M 細胞における大きな p S T A T 5 シグナルをおよそ 10 倍の濃度で刺激した。W T L 1 5 A G 1 と W T L 0 A G 1 では、T r e g および C D 2 5 - /  $10^{-8}$  M 細胞集団のどちらにおいても E C 50 値におよそ 10 倍の差異が示された。

20

#### 【 0 0 8 2 】

T r e g における D 2 0 H L 1 5 A G 1 による最大 p S T A T 5 シグナルは、N 8 8 R L 1 5 A G 1 による最大 p S T A T 5 シグナルよりも有意に低かった ( 図 8 ) 。これにより、実施例 3 において D 2 0 H L 0 G 2 を用いていかなる検出可能な活性もなかったことが、一部において、F c 融合タンパク質の状況で、D 2 0 H / I L 2 部分の活性が N 8 8 R / I L 2 部分と比較して低いことに起因することが示唆される。A G 1 L 1 5 D 2 0 H の活性は、D 2 0 H L 1 5 A G 1 の活性よりもわずかに高いだけであり、これにより、F c 融合タンパク質内の I L - 2 部分の構成 ( すなわち、X - F c 対 F c - X ) は T r e g 生物活性に対して重大な影響を及ぼさないことが示される。

30

#### 【 0 0 8 3 】

集合的に、これらの結果から、最適な生物活性に必要な N 8 8 R / I L 2 - F c 融合タンパク質の重要な特徴が定義される。N 8 8 R / I L 2 - F c タンパク質には、最適な T r e g 生物活性のためにリンカーペプチドが必要であり、リンカーペプチドの長さが増すにしたがって生物活性が増大する傾向がある。第 2 に、他者の研究に従うと、w t I L - 2 を含有する F c 融合タンパク質の生物活性に対するリンカーペプチドの影響はよりわずかである。リンカーペプチドに関するこれらの異なる要件は、N 8 8 R / I L 2 は、I L 2 R B への結合が欠損しており、これにより、受容体会合に関するよりストリンジェントな要件および F c 融合タンパク質パートナーによる立体障害に対する感受性の増大がもたらされる可能性があり得るという事実の結果であり得る。これらの結果から、最も強力な I L 2 選択的アゴニスト - F c 融合タンパク質も定義される。

40

#### 【 0 0 8 4 】

##### ( 実施例 5 )

ヒト P B M C における I L 2 選択的アゴニスト - F c 融合タンパク質の選択性

より広範な生物学的状況で N 8 8 R / I L 2 - F c 融合タンパク質の選択性を決定するために、粗製未分画ヒト P B M C 中の重要な免疫細胞型の全てにわたって S T A T 5 活性化を測定するためのアッセイを開発した。ヒト P B M C を正常な志願者から F i c o l l - H y p a q u e 遠心分離によって単離した。  $10^6$  個の P B M C を、グルコース ( L o n z a ) および 10 % F B S ( O m e g a ) を伴う X - V I V O 1 5 培地に懸濁させ、  $10^{-8}$  M の試験タンパク質を用いて 37 °C で 20 分処理した。次いで、細胞を F o x p 3

50

/Transcription Factor Staining Buffer Set (E B I O) を製造者の指示に従って用いて処理した。次いで、実施例 3 に記載の通り、細胞を C y t o f i x 緩衝液を用いて固定し、P e r m B u f f e r I I I を用いて透過処理した。次いで、固定し、透過処理した細胞を 1 % F B S / P B S で洗浄し、抗体混合物を用いて室温、暗所中で 6 0 分にわたって染色した。次いで、染色された細胞を 1 % F B S / P B S で洗浄し、P B S に再懸濁させ、F o r t e s s a フローサイトメーター ( B D B i o s c i e n c e s ) で分析した。抗体ミックスは、抗 C D 4 - P e r C P - C y 5 . 5 ( B D 、 # 5 6 0 6 5 0 ) 、抗 p S T A T 5 - A F - 4 8 8 ( B D 、 # 6 1 2 5 9 8 ) 、抗 C D 2 5 - P E ( B D 、 # 5 6 0 9 8 9 ) 、抗 C D 5 6 - P E - C F 5 9 4 ( B D 、 # 5 6 2 3 2 8 ) 、抗 F O X P 3 - A F 6 4 7 ( B D 、 # 5 6 0 8 8 9 ) 、抗 C D 3 - V 4 5 0 ( B D 、 5 6 0 3 6 6 ) 、および抗 C D 8 - B V 6 5 0 ( B i o l e g e n d 、 # 3 0 1 0 4 1 ) からなるものであった。この染色手順により、7 種の重要な免疫細胞型における p S T A T 5 レベルをモニタリングすることが可能になった。

10

#### 【 0 0 8 5 】

細胞表現型を以下の通り定義した：T r e g 細胞：C D 3 + 、C D 4 + 、F o x p 3 + 、C D 2 5 <sup>h i g h</sup>、C D 8 - 、C D 5 6 - ；活性化 C D 4 T e f f 細胞：C D 3 + 、C D 4 + 、F o x p 3 - 、C D 2 5 <sup>h i g h</sup>、C D 8 - 、C D 5 6 - ；C D 4 T e f f 細胞：C D 3 + 、C D 4 + 、F o x p 3 - 、C D 2 5 <sup>l o w</sup>、C D 8 - 、C D 5 6 - ；N K T 細胞：C D 3 + 、C D 4 - 、F o x p 3 - 、C D 2 5 <sup>l o w</sup>、C D 8 - 、C D 5 6 + ；N K 細胞：C D 3 - 、C D 4 - 、F o x p 3 - 、C D 2 5 <sup>l o w</sup>、C D 8 - 、C D 5 6 + ；B 細胞：C D 3 - 、C D 4 - 、F o x p 3 - 、C D 2 5 <sup>l o w</sup>、C D 8 - 、C D 5 6 - 。

20

#### 【 0 0 8 6 】

このアッセイでは、タンパク質を  $10^{-8}$  M の濃度で試験した。図 9 に示されており表 V に要約されている結果から、N 8 8 R L 1 5 A G 1 が、どちらも全ての細胞集団の大部分において p S T A T 5 を活性化した w t I L 2 および W T L 1 5 A G 1 と比較して、注目すべき選択性を示したことが示される。N 8 8 R L 1 5 A G 1 では、T r e g 集団における p S T A T 5 シグナルは w t I L - 2 のレベル付近で刺激され、N K 細胞を例外として他の細胞型の活性化はわずかであった。追加の分析 ( 示していない ) から、p S T A T 5 + N K 細胞が、同じく免疫調節活性を有する N K 細胞亜集団である N K - C D 5 6 b r i g h t 細胞の特性である C D 2 5 <sup>h i g h</sup> であったことが示された ( P o l i , A ら、2 0 0 9 年 I m m u n o l o g y . 1 2 6 巻 ( 4 号 ) : 4 5 8 ~ 6 5 頁 ) 。N 8 8 R / I L 2 を用いて低レベルの p S T A T 5 シグナルを有したいくつかの細胞型 ( 活性化 C D 4 T e f f 細胞、C D 4 T e f f 細胞、N K T 細胞、および N K 細胞 ) では、N 8 8 R L 1 5 A G 1 を用いると p S T A T 5 シグナルが示されなかったまたは低い p S T A T 5 シグナルが示された。これらの結果から、複雑な生物学的環境における N 8 8 R L 1 5 A G 1 の T r e g に対する活性および高い選択性が実証される。

30



【表 1】

表

表I. US FDAにより認可されたFc融合タンパク質およびそれらの特性

表I

薬物	Fcアイソタイプ	融合パートナー	N 対 C 融合	リンカー ペプチド	半減期 (日数)
ロミプロスチム	G1	TPO-R ペプチド	C	Y	3.5
エタネルセプト	G1	P75 TNFa-R	N	N	4.3
アレファセプト	G1	LFA3	N	N	10.1
リロナセプト	G1	IL1-R	N	N	8.6
アバタセプト	G1	CTLA4	N	N	16.7
ベラタセプト	G1	CTLA4 (mut)	N	N	9.8
アフリベルセプト	G1	VEGF R1 + R2	N	N	n/a
デュラグルチド	G4 (mut)	GLP1	N	Y	3.7
イロクティ	G1	FVIII	N	N	0.8
オルプロリクス	G1	FIX	N	N	3.6

【表 2】

表II. IL-2 Fc融合タンパク質のIL2RAサブユニットおよびIL2RBサブユニットに対する親和性

表II

リガンド	分析物	方法	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_d$ (M)
IL2RA	IL-2	動力学的	$5.85 \times 10^6$	$8.4 \times 10^{-2}$	$1.44 \times 10^{-8}$
	N88RL9AG1	動力学的	$1.78 \times 10^6$	$1.0 \times 10^{-2}$	$5.63 \times 10^{-9}$
	D20HL0G2	動力学的	$1.66 \times 10^7$	0.137	$8.30 \times 10^{-9}$
	IL-2	平衡	-	-	$1.47 \times 10^{-8}$
	N88RL9AG1	平衡	-	-	$9.36 \times 10^{-9}$
IL2RB	IL-2	動力学的	$5.10 \times 10^5$	$3.0 \times 10^{-1}$	$5.87 \times 10^{-7}$
	N88RL9AG1	動力学的	nd	nd	-
	IL-2	平衡	-	-	$2.53 \times 10^{-7}$
	N88RL9AG1	平衡	-	-	$7.60 \times 10^{-2}$

nd: 結合は検出されず

【表 3】

表III

タンパク質	IL2	ペプチドリinker	構成	配列番号
N88RL0AG1	N88R	0	X-Fc	6
N88RL5AG1	N88R	5	X-Fc	7
N88RL10AG1	N88R	10	X-Fc	8
N88RL15AG1	N88R	15	X-Fc	9
N88RL20AG1	N88R	20	X-Fc	10
WTL0AG1	wt	0	X-Fc	11
WTL15AG1	wt	15	X-Fc	12
D20HL15AG1	D20H	15	X-Fc	13
AG1L15D20H	D20H	15	Fc-X	14

10

【表 4】

表IV

タンパク質	EC50	10 <sup>-8</sup> Mでの 最大pSTAT5反応	最大pSTAT5反応 の増大倍率
N88RL0AG1	>10 <sup>-8</sup>	0.33	1.0
N88RL5AG1	>10 <sup>-8</sup>	0.52	1.6
N88RL9AG1	7 X 10 <sup>-10</sup>	0.96	2.9
N88RL10AG1	9 X 10 <sup>-10</sup>	0.90	2.7
N88RL15AG1	4 X 10 <sup>-10</sup>	1.22	3.7
N88RL20AG1	1 X 10 <sup>-10</sup>	1.40	4.2

20

30

【表 5】

表V

	対照	IL-2	WTL15AG1	N88R/IL2	N88RL15AG1
Treg 細胞	0.8	99.9	99.8	99.9	75.1
活性化 CD4	0.1	70.5	65.2	3.7	0.1
Teff 細胞					
CD4 Teff 細胞	0.2	60.9	40.0	2.4	0.5
CD8 Teff 細胞	0.1	90.2	35.4	2.3	0.1
NKT 細胞	0.5	74.9	60.5	20.5	5.2
NK 細胞	0.3	96.8	96.1	49.9	19.3
B 細胞	0.1	20.9	10.6	0.2	0.1

ヒトPBMC中の7種の免疫細胞型におけるpSTAT5+細胞の百分率。実施例6に記載の通り細胞を列の見出しに示されているタンパク質を用いて処理し、分析した。

40

## 【化 1】

## 配列表

## 配列番号 1

&gt;ヒト IL-2

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

## 配列番号 2

&gt;ヒト IgG1(N297A) Fc

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSP  
GK

10

## 配列番号 3

&gt;ヒト IgG2 Fc

VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
FRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK\*

## 配列番号 4

&gt;N88RL9AG1

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGCGGAGGGGDKTHTCPP  
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK\*

20

## 配列番号 5

&gt;D20HL0G2

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTVECPPCPAPPVAGPSV  
LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNG  
KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK\*

## 配列番号 6

&gt;N88RL0AG1

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD  
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG\*

30

## 配列番号 7

&gt;N88RL5AG1

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGCGGSGGGGSDKTHTCPP  
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG\*

## 配列番号 8

&gt;N88RL10AG1

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGCGGSGGGGSDKTHTCPP  
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG\*

40

## 配列番号 9

&gt;N88RL15AG1

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTFKFFMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGCGGSGGGGSGGGGSDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA

## 【化 2】

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

## 配列番号 10

>N88RL20AG1

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGG  
GGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPR  
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPG\*

## 配列番号 11

>WTL0AG1

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLTGKHTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPRREEQYASTYRVVSVLTVLHQD  
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

## 配列番号 12

>WTL15AG1

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGSDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPRREEQYA  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

## 配列番号 13

>D20HL15AG1

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQS  
KNFHLRPRDLISRNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGSDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPRREEQYA  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

## 配列番号 14

>AG1L15D20H

DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPRREEQ  
YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GGGGSGGGSGGGSGGSAPTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL  
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFSQSIISTLT\*

## 配列番号 15

>L9

GGGGAGGGG

## 配列番号 16

>L5

GGGGG

## 配列番号 17

>L10

GGGGSGGGGS

## 配列番号 18

>L15

GGGGSGGGSGGGGS

## 配列番号 19

>L20

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

10

20

30

40

FIGURE 1



FIGURE 2

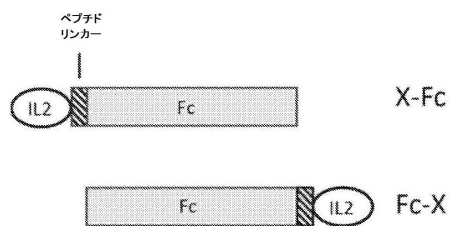


FIGURE 3A

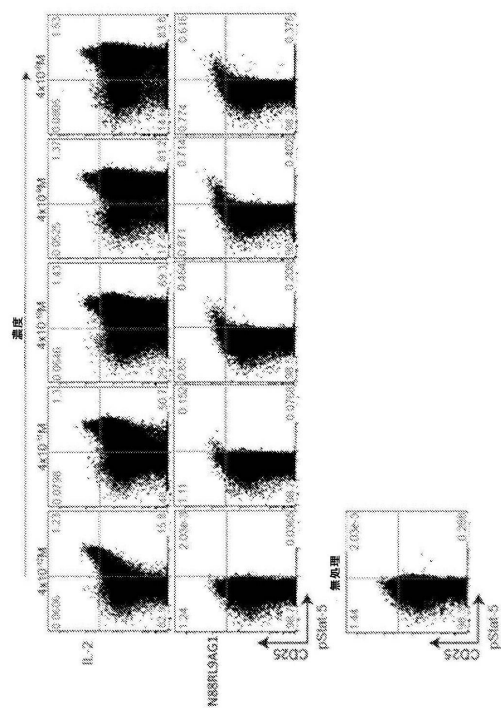
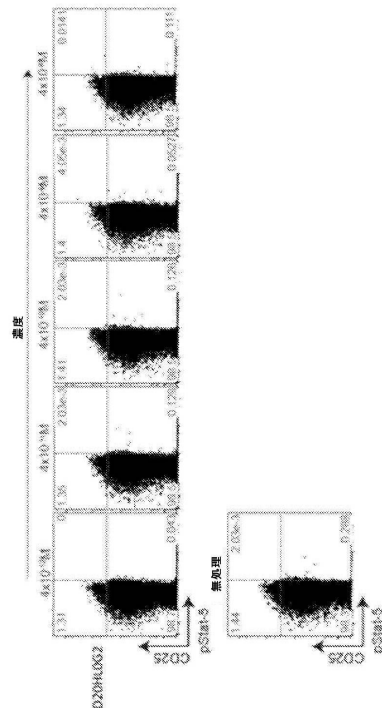
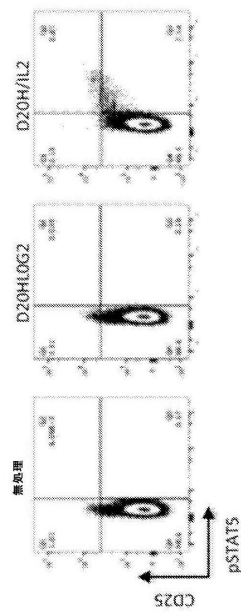


FIGURE 3B



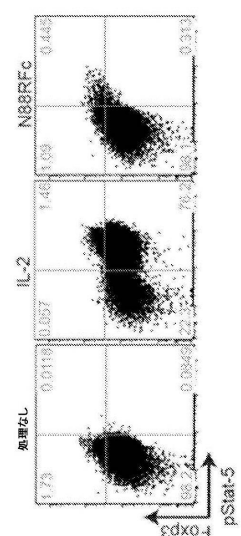
【 図 3 C 】

FIGURE 3C



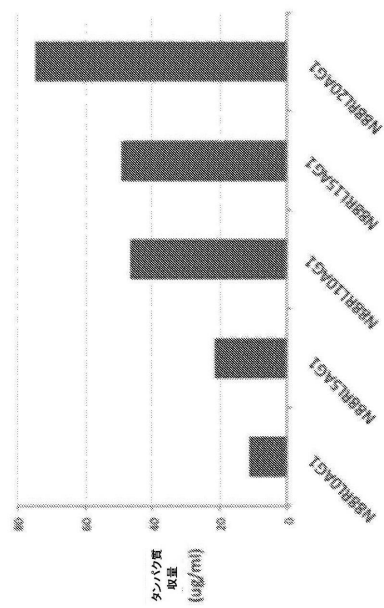
【 図 4 】

FIGURE 4



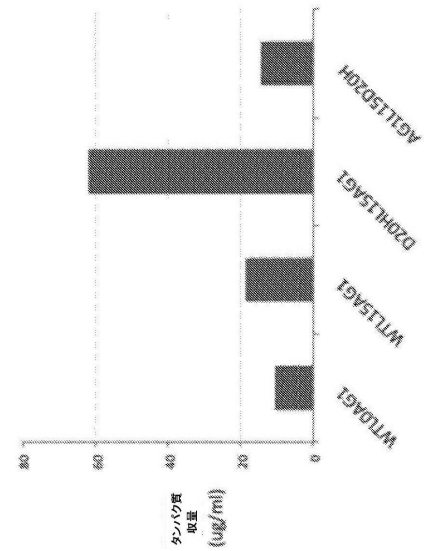
【 図 5 A 】

FIGURE 5A



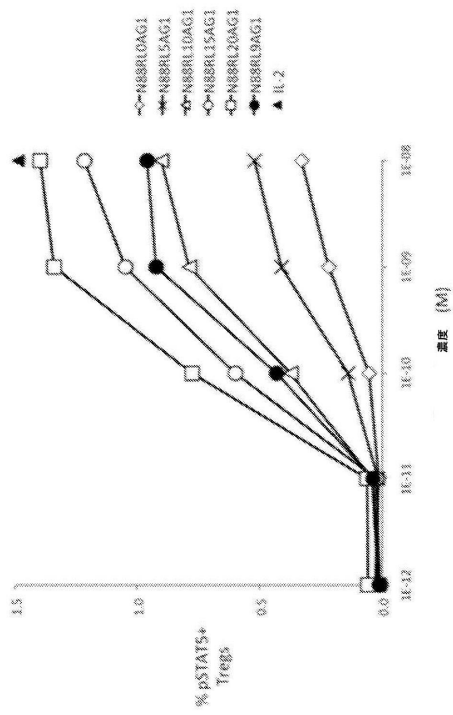
【 図 5 B 】

FIGURE 5B



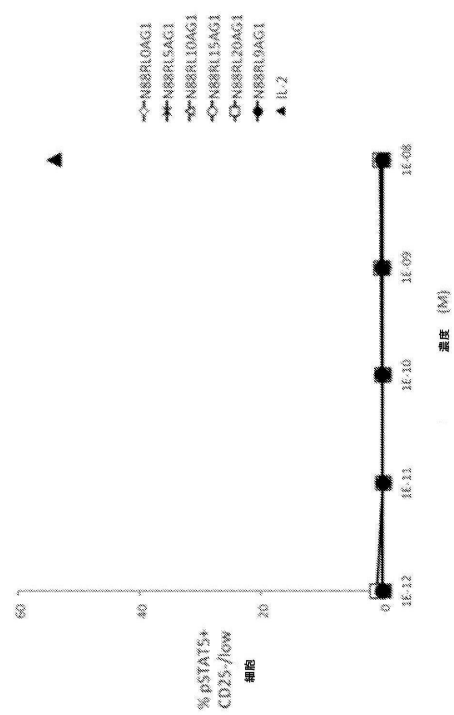
【図 6 A】

FIGURE 6A



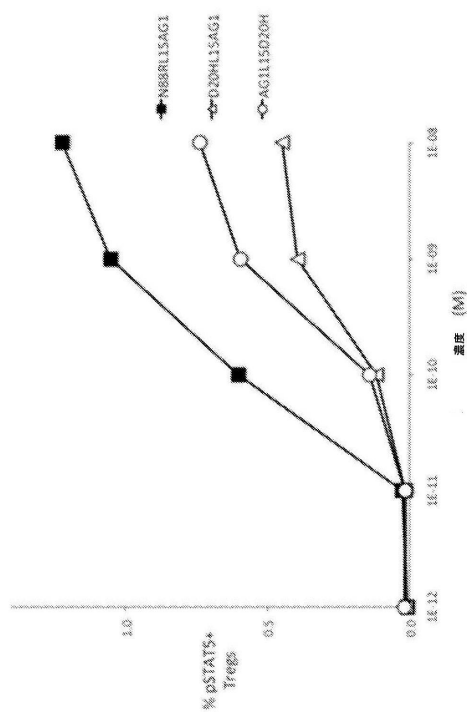
【図 6 B】

FIGURE 6B



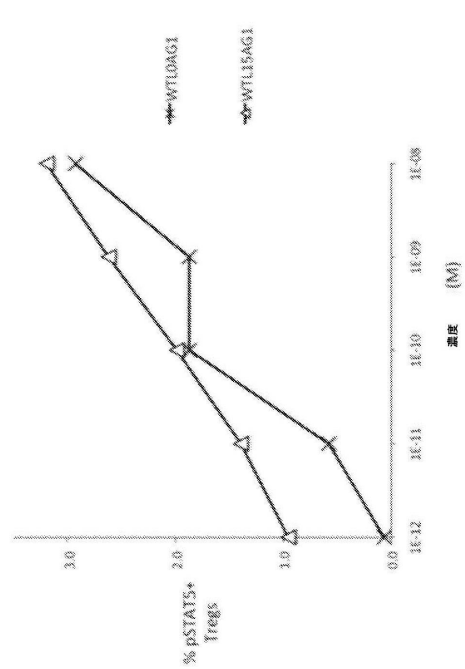
【図 7】

FIGURE 7



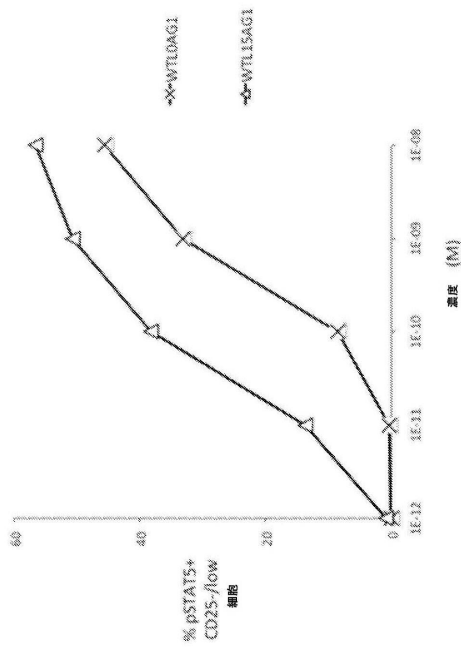
【図 8 A】

FIGURE 8A



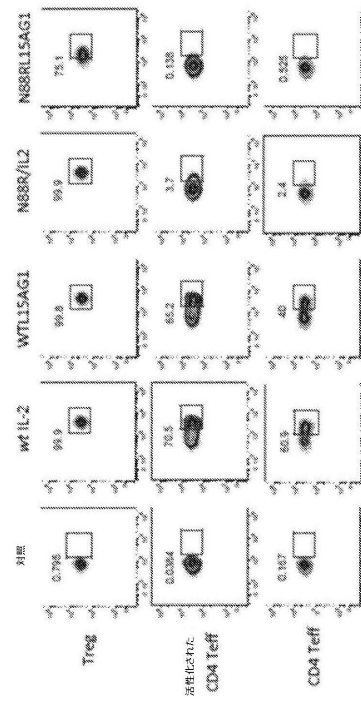
【図 8 B】

FIGURE 8B



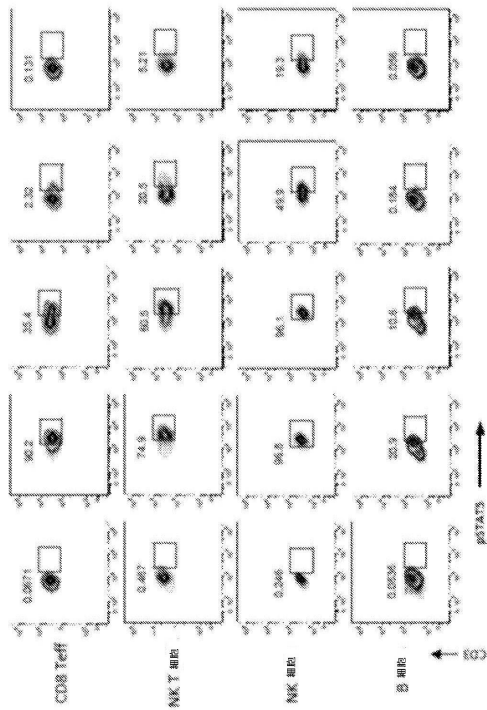
【図 9 - 1】

FIGURE 9



【図 9 - 2】

FIGURE 9 (続き)





【配列表】

0006768633000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K 38/20
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K 38/17 1 0 0
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K 47/65
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 グレーブ, ジェフリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94708, パークレー, パーク ヒルズ ロード 10  
66

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第2012/146628(WO, A1)

特表2012-515778(JP, A)

特表2012-521196(JP, A)

特開2014-094898(JP, A)

特表2010-504755(JP, A)

特表2007-500132(JP, A)

特表2016-518823(JP, A)

Adv Drug Deliv Rev, 2013, vol.65, no.10, p.1357-1369

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)