

(43) 공개일자 2024년04월08일

- (71) 출연인
신테카인, 인크.
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 오브라이언
드라이브 1505 스위트 디
- (72) 발명자
에머리히, 얀
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 오브라이언
드라이브 1505 스위트 디 신테카인, 인크. 내
카우더, 스티브
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 오브라이언
드라이브 1505 스위트 디 신테카인, 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상남

(54) 발명의 명칭 **편향된 IL2 뮤테인 방법 및 조성물**

본 개시내용은 인간 인터류킨-2 (hIL2) 뮤데인, 그의 제약 제제, 인터류킨-2 뮤데인의 제조 방법, IL2 뮤데인을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터 및 세포, 및 인간 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

Cell Line	P-STAT5 MFI (approx.)
H1h2	1000
H1h3	1000
H1h4	1000
H1h5	1000
H1h6	1000
H1h7	1000
H1h8	1000
H1h9	1000
H1h10	1000
H1h11	12000
H1h12	13000
H1h13	14000
H1h14	15000
H1h15	16000
H1h16	17000
H1h17	18000
H1h18	19000
H1h19	20000
H1h20	21000
H1h21	22000
H1h22	23000
H1h23	24000
H1h24	25000
H1h25	26000
H1h26	27000
H1h27	28000
H1h28	29000
H1h29	30000
H1h30	31000
H1h31	32000
H1h32	33000
H1h33	34000
H1h34	35000
H1h35	36000
H1h36	37000
H1h37	38000
H1h38	39000
H1h39	40000
H1h40	41000
H1h41	42000
H1h42	43000
H1h43	44000
H1h44	45000
H1h45	46000
H1h46	47000
H1h47	48000
H1h48	49000
H1h49	50000
H1h50	51000
H1h51	52000
H1h52	53000
H1h53	54000
H1h54	55000
H1h55	56000
H1h56	57000
H1h57	58000
H1h58	59000
H1h59	60000
H1h60	61000
H1h61	62000
H1h62	63000
H1h63	64000
H1h64	65000
H1h65	66000
H1h66	67000
H1h67	68000
H1h68	69000
H1h69	70000
H1h70	71000
H1h71	72000
H1h72	73000
H1h73	74000
H1h74	75000
H1h75	76000
H1h76	77000
H1h77	78000
H1h78	79000
H1h79	80000
H1h80	81000
H1h81	82000
H1h82	83000
H1h83	84000
H1h84	85000
H1h85	86000
H1h86	87000
H1h87	88000
H1h88	89000
H1h89	90000
H1h90	91000
H1h91	92000
H1h92	93000
H1h93	94000
H1h94	95000
H1h95	96000
H1h96	97000
H1h97	98000
H1h98	99000
H1h99	100000
H1h100	101000

IL-2 단백질

(52) CPC특허분류

C07K 14/55 (2013.01)

(72) 발명자

맥컬리, 스캇 앨런

미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 오브라이언 드
라이브 1505 스위트 디 신테카인, 인크. 내

오프트, 마틴

미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 오브라이언 드
라이브 1505 스위트 디 신테카인, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 정부 지원에 관한 설명

[0002] 본 개시내용의 주제의 실시에 대한 구상 및 감면에서 미국 정부 지원이 사용되지 않았다.

[0003] 관련 출원

[0004] 본원은 2020년 1월 14일에 출원된 미국 특허 가출원 일련 번호 62/961,141 및 2021년 1월 12일에 출원된 미국 특허 가출원 일련 번호 63/136,599를 우선권 주장하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 참조로 포함된다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2021년 3월 1일에 생성된 상기 ASCII 카피는 1218665_SL.txt로 명명되고, 31,573 바이트 크기이다.

배경 기술

[0007] **종양 면역요법:** 종양 면역요법 (또는 암 면역요법)은 신생물성 세포를 공격하는 면역계의 선천성 능력의 증진을 기반으로 하는 신생물성 질환에 대한 치료 형태이다. 면역계의 메커니즘에 대한 현재의 이해가 암 면역요법제의 개발을 크게 도왔지만, 면역계를 조정하여 암을 치료하는 개념은 100년 넘게 추적되어야 할 수도 있다. 현재, 암의 면역요법에 대한 다양한 접근법, 예컨대 항암 백신, 조작된 면역 세포, 동종 TIL 요법, 시토카인, 및 체크포인트 조정 항체가 존재한다. 이들 접근법 모두의 기초가 되는 공통 원리는 대상체의 선천 및 적응 면역계가 신생물성 세포를 공격하고 신생물을 제거하는데 효과적이라는 근본적인 믿음이다. 인간 암 환자에서의 항종양 면역은 항종양, 면역 체크포인트-양성 CD8⁺ T 세포의 낮은 유병률 및/또는 그의 소진에 의해 제약을 받는다.

[0008] **인터류킨 2:** IL2는 항원 활성화된 T 세포에 의해 생성되는 다능성 시토카인이다. IL2는 면역계에 대해 광범위한 효과를 발휘하고, 면역 활성화, 억제 및 항상성을 모두 조절하는데 중요한 역할을 한다. IL2는 활성화된 T 림프구의 증식 및 확장을 촉진시키고, 나이브 T 세포의 증식 및 활성화를 유도하고, B 세포 성장을 강화시키며, NK 세포의 증식 및 확장을 촉진한다. 인간 인터류킨 2 (IL2)는 133개 아미노산의 4 알파-나선 다발 시토카인이다. IL2는 IL2, IL-4, IL-7, IL 9, IL-15 및 IL21을 포함하는 시토카인의 IL2 패밀리의 구성원이다. 그러나, IL2의 기능은 비-중복성이며, 이는 마우스에서의 유전자 녹아웃에 의해 입증된다 (Schorle, et al. (1991) Nature 352(6336): 621-624). hIL2의 아미노산 서열 (서열식별번호(SEQ ID NO): 1)은 진뱅크(Genbank)에서 수탁 위치 NP_000577.2 하에 확인된다.

[0009] **IL2 수용체:** IL2는 3가지 상이한 세포 표면 단백질: (1) CD25 (IL2 수용체 알파, IL2R α , p55로도 지칭됨), CD122 (인터류킨-2 수용체 베타, IL2R β , IL15R β 및 p70-75로도 지칭됨), 및 CD132 (인터류킨 2 수용체 감마, IL2R γ ; 또는 공통 감마 체 (이는 IL2 수용체 패밀리에서 다른 다량체성 수용체의 성분이기 때문)로도 지칭됨)과의 상호작용을 통해 포유동물 면역 세포에 대해 그의 효과를 발휘한다.

[0010] **CD25(IL2R α):** CD25는 활성화에 대한 반응으로 Treg 세포에서 구성적으로 발현되고 다른 T 세포에서 유도적으로 발현되는 55 kD 폴리펩티드이다. hIL2는 대략 10^{-8} M의 Kd로 hCD25에 결합한다. CD25는 문헌에서 "저친화도" IL2 수용체로도 지칭된다. 인간 CD25 ("hCD25")는 251개 아미노산의 성숙한 단백질이 되도록 번역 후 제거되는 21개 아미노산의 신호 서열을 포함하는 272개 아미노산의 전구-단백질로서 발현된다. 아미노산 22-240 (성숙한 단백질의 아미노산 1-219)은 세포외 도메인에 상응한다. 아미노산 241-259 (성숙한 단백질의 아미노산 220-

238)는 막형단 도메인에 상응한다. 아미노산 260-272 (성숙한 단백질의 아미노산 239-251)는 세포내 도메인에 상응한다. CD25의 세포내 도메인은 비교적 작고 (13개 아미노산), 임의의 독립적인 신호전달 활성화와 연관이 없었다. IL2/CD25 복합체는 검출가능한 세포내 신호전달 반응을 생성하는 것으로 관찰되지 않았다. 인간 CD25 핵산 및 단백질 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호 NM_000417 및 NP_0004Q8로서 확인될 수 있다.

[0011] CD122 (IL2R β): CD122는 단일 통과 유형 I 막형단 단백질이다. 인간 CD122 (hCD122)는 551개 아미노산의 전구-단백질로서 발현되며, 신호 서열을 포함하는 처음 26개 아미노산은 성숙한 525개 아미노산의 단백질에서 번역 후 절단된다. 아미노산 27-240 (성숙한 단백질의 아미노산 1-214)은 세포외 도메인에 상응하고, 아미노산 241-265 (성숙한 단백질의 아미노산 225-239)는 막형단 도메인에 상응하고, 아미노산 266-551 (성숙한 단백질의 아미노산 240-525)은 세포내 도메인에 상응한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 CD122는 (성숙한 hCD122 단백질에 따라 넘버링되는 바와 같이) S57F 및 D365E 치환을 포함하는 CD122 변이체를 포함하는 CD122 단백질의 천연 발생 변이체를 포함한다. hCD122는 유니프록케이비(UniProtKB) 데이터베이스에서 항목 P14784로 참조된다. 인간 CD122 핵산 및 단백질 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호 NM_000878 및 NP_000869로서 확인될 수 있다.

[0012] CD132 (IL2R γ): CD132는 유형 1 시토카인 수용체이며, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, 및 IL21에 대한 수용체 복합체에 의해 공유되고, 따라서 문헌에서 "공통" 감마 채로 지칭된다. 인간 CD132 (hCD132)는 22개 아미노산의 N-말단 신호 서열을 포함하는 369개 아미노산의 전구-단백질로서 발현된다. 아미노산 23-262 (성숙한 단백질의 아미노산 1-240)는 세포외 도메인에 상응하고, 아미노산 263-283 (성숙한 단백질의 아미노산 241-262)은 21개 아미노산의 막형단 도메인에 상응하고, 아미노산 284-369 (성숙한 단백질의 아미노산 262-347)는 세포내 도메인에 상응한다. hCD132는 유니프록케이비 데이터베이스에서 항목 P31785로 참조된다. 인간 CD132 핵산 및 단백질 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호: NM_000206 및 NP_000197로서 확인될 수 있다.

[0013] IL2 중간 및 고친화도 수용체: "저친화도" CD25 IL2 수용체에 추가로, 2종의 추가의 IL2 수용체 복합체가 특징화되었다: (a) CD122 및 CD132를 포함하는 "중간 친화도" 이량체 IL2 수용체 ("IL2R $\beta\gamma$ "로도 지칭됨) 및 (b) CD25, CD122 및 CD132 단백질을 포함하는 "고친화도" 삼량체 IL2 수용체 복합체 ("IL2R $\alpha\beta\gamma$ "로도 지칭됨). hIL2는 중간 친화도 CD122/CD132 (IL2 $\beta\gamma$) 수용체 복합체에 대해 대략 10^{-9} M의 Kd를 갖는다. hIL2는 높은 IL2 친화도 수용체 복합체에 대해 대략 10^{-11} M의 Kd를 갖는다.

[0014] IL2 수용체 발현: IL2 수용체는 대부분의 림프 세포, 특히 T 세포, NK 세포 및 B 세포의 표면 상에서 발현되지만, 발현 수준은 가변적이고, 세포의 활성화 단계를 포함하는 다양한 인자에 의존한다. 불활성 T 세포 및 NK 세포는 거의 독점적으로 2종의 신호전달 수용체, CD122 및 CD132로 이루어진 중간-친화도 이량체 IL2 수용체를 발현하고, IL2에 대해 비교적 낮은 반응성을 입증하는데, 이는 이들이 CD25/CD122/CD132 고친화도 수용체에 비해 IL2에 대해 비교적 낮은 친화도를 갖는 중간 친화도 CD122/CD132 복합체를 우세하게 발현하기 때문이다. 대조적으로, 활성화된 T 세포 및 조절 T 세포는 CD25, CD122 및 CD132로 이루어진 삼량체 고친화도 IL2 수용체를 발현한다. TCR 활성화된 T 세포 (즉, 소위 "항원 경험된" T 세포)는 고친화도 삼량체 IL2 수용체를 발현한다. 중앙 집운 T 세포 ("TIL") 및 중앙 인식 세포를 포함한 T 세포는 T 세포 수용체 (TCR) 신호를 받을 때 CD25 및 CD122를 상향조절한다 (Kalia, et al. (2010) Immunity 32(1): 91-103). T 세포 수용체 (TCR) 신호를 받은 것에 반응한 CD25 및 CD122 수용체의 상향조절은 항원 활성화된 T 세포가 IL2 시토카인에 고도로 감수성 있게 한다. Treg는 CD25를 구성적으로 발현하고, 따라서 고친화도 삼량체 IL2 수용체를 발현하지만, TCR-활성화된 T 세포는 조절 T 세포보다 더 높은 수준의 삼량체 수용체를 발현한다. 결과적으로, 항원-펩티드 숙주에서의 항원 활성화 T 세포의 확장은 Treg의 확장을 유의하게 능가한다 (Humblet-Baron, et al. (2016) J Allergy Clin Immunol 138(1): 200-209 e208).

[0015] IL2/IL2 수용체 상호작용: 단량체 IL2는 세포 표면 상에 발현된 수용체 성분의 세포외 도메인에 대한 결합을 통해 IL2 수용체의 삼량체 "고친화도" 형태 및 이량체 중간 친화도 수용체 둘 다와 복합체를 형성한다 (Wang, et al. (2005) Science 310:159-1163). CD25에 대한 IL2의 결합은 IL2의 입체형태적 변화를 유도하여 CD122에 대한 증가된 결합을 용이하게 한다. CD25 결합-유도된 입체형태적 변화를 모방하는 IL2 돌연변이체는 CD122에 대한 증가된 결합을 입증한다 (Levin, et al. (2012) Nature 484(7395): 529-533). CD132의 회합은 세포내 신호 전달과 연관된 이량체 중간-친화도 또는 삼량체 고친화도 수용체 복합체의 형성을 제공한다. JAK/STAT 경로 (예를 들어 STAT5의 인산화) 및 다른 세포 시스템을 통해 세포내 신호전달을 제공하는 것에 추가로, hIL2와 세포 상의 hIL2 고친화도 삼량체 수용체의 상호작용은 CD122가 내재화되고, 막 결합된 형태의 CD25가 활성화된 세포로부터 가용성 단백질 ("가용성 CD25" 또는 "sCD25"로 지칭됨)로서 방출될 뿐만 아니라 자가분비 및/또는 주

변분비 방식으로 작용할 수 있는 활성화된 세포에 의해 내인성으로 생성된 IL2의 방출을 촉발하는 프로세스를 개시한다.

[0016] 인간 암의 치료에서의 IL2의 용도: 재조합 hIL2는 전이성 흑색종 및 전이성 신세포 암종을 갖는 인간 성인의 치료를 위해 지시된다. 고용량 hIL2 (HD-hIL2)의 치료적 적용은 고도로 면역 침윤된 흑색종 및 신세포 암종에서 종양 거부를 유도한다 (Atkins, et al. (1999) J Clin Oncol 17(7):2105-2116). 그러나, HD-hIL2 요법은 손상된 호중구 기능, 열, 저혈압, 설사를 포함한 중증 용량 제한 독성과 연관되고, 전문가 관리를 필요로 한다 (Dutcher, et al. (2014) J Immunother Cancer 2(1): 26). HD-hIL2 처리는 중간 친화도 수용체 (CD122/CD132)를 우세하게 발현하는 나이브 T 세포 및 NK 세포, 및 고친화도 삼량체 수용체 (CD25/CD122/CD132)를 발현하는 CD25+ 조절 T 세포 (Treg)를 포함한 대부분의 림프 세포를 활성화시킨다. HD-hIL2 단독요법은 또한 사망으로 이어질 수 있는 전신 모세혈관 누출 증후군을 유도할 수 있다. 이는 HD-IL2 요법의 사용을 정상 심장 및 폐 기능을 갖는 대부분 보다 젊고 매우 건강한 환자에게 제한한다. HD-IL2 요법은 전형적으로 병원 환경에서 적용되고, 빈번하게 집중 치료실에서의 입원을 필요로 한다.

[0017] 임상 경험은 HD-IL2 처리가 중간 친화도 수용체를 우세하게 발현하는 나이브 T 세포 및 NK 세포 뿐만 아니라 CD8+ T 세포의 활성을 매개하는 CD25+ 조절 T 세포 (Treg)를 활성화시킨다는 것을 입증한다. CD25의 구성적 발현으로 인해, Treg는 IL2에 특히 감수성이다. Treg의 우선적인 활성화를 회피하기 위해, IL2 변이체가 개발되어 임상 개발에 도입되었으며, 이는 CD25에 대한 결합을 회피하고 중간 친화도 CD122/CD132 수용체에 대한 증진된 결합을 보유하여 NK 세포 및 정지 CD8+ T 세포를 활성화시키도록 설계된다. 이러한 IL2 뮤테인은 종종 문헌에서 "비- α -IL2" 또는 " β/γ -IL2" 뮤테인으로 지칭된다. 그러나, 이러한 "비- α -IL2" 또는 " β/γ -IL2" 뮤테인은 CD25에 대한 그의 감소된 결합에 의해, 또한 항종양 T 세포 반응의 1차 매개자로서 확인된 항원 활성화된 T 세포에 대한 결합을 회피한다 (Peace, D. J. and Cheever, M. A. (1989) J Exp Med 169(1):161-173).

[0018] 추가로, 전임상 실험은 NK 세포를 IL2 매개 급성 독성에 대한 우세한 메카니즘으로서 연루시켰다 (Assier E, et al. (2004) J Immunol 172:7661-7668). NK 세포는 중간 친화도 (CD122/CD132; β/γ) IL2 수용체를 발현하기 때문에, 이러한 β/γ -IL2 뮤테인의 성질은 이러한 NK 세포의 증식을 증진시켜 증진된 독성을 유도할 수 있는 것이다. 추가적으로, Treg가 CD8+ T 세포의 하향-조절과 연관되지만, Treg는 또한 IL2 매개 오프-종양 독성을 제한하는 것으로 밝혀졌다 (Li, et al. (2017) Nature Communications 8(1):1762). 산화질소 신타제 억제제가 VLS의 증상을 호전시키는 것으로 제시되어 있지만, VLS가 관찰되는 통상적인 관행은 IL2 요법의 철회이다. HD IL2 치료와 연관된 VLS를 완화시키기 위해, 저용량 IL2 요법을 환자에서 시험하였다. 저용량 IL2 치료 요법은 VLS 독성을 부분적으로 완화시키지만, 이러한 보다 낮은 독성은 신생물의 치료에서 최적의 치료 결과를 희생하여 달성되었다.

[0019] hIL2의 다능성 효과, 및 인간 질환과 연관된 매우 광범위한 세포 유형의 활성을 조정하는 그의 입증된 능력에 비추어, 치료적 맥락에 따라 천연 분자의 바람직하지 않은 특징은 최소화하면서 특정한 바람직한 특징은 유지하는 IL2 뮤테인은 여전히 활발한 연구 분야이다.

발명의 내용

[0020] 본 개시내용의 요약

[0021] 본 개시내용은 1개 이상의 IL2 수용체에 대해 변형된 결합 특성을 나타내는 인간 인터류킨-2 (IL2) 뮤테인, 및 신생물성 질환의 치료에서의 그의 용도에 관한 것이다. 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 HD IL2 치료와 연관된 전신 독성 없이 IL2의 바람직한 생물학적 기능, 예컨대 항원 활성화된 T 세포에 대한 T 세포 증식 및 세포독성 활성을 보유한다. 추가로, 본 개시내용의 조성물은 야생형 IL2 또는 β/γ -IL2 뮤테인에 비해, 모세혈관 누출 증후군을 포함하나 이에 제한되지는 않는 유의하게 더 낮은 수준의 NK 매개 독성을 보인다. 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 CD25 및 CD122에 대한 결합을 보유하지만, CD132에 대한 감소된 결합을 나타내고, NK 세포에 비해 CD25+ T 세포를 우선적으로 활성화시킨다.

[0022] IL2 뮤테인: 본 개시내용은 신생물성 질환의 치료 및/또는 예방에 유용한 인간 IL2 ("hIL2") 뮤테인을 포함하는 조성물 및 그를 사용하는 방법을 제공하며, 여기서 hIL2 뮤테인은 야생형 hIL2 ("wt hIL2")에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타낸다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, CD122 및/또는 CD25에 대해 유의한 결합 친화도를 보유한다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122에 대한 결합 친화도를 보유한다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소

된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD25에 대한 결합 친화도를 보유한다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122 및 CD25에 대한 결합 친화도를 보유한다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, CD25, 막 결합된 CD25 또는 sCD25의 존재 하에 wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122에 대한 증가된 결합 친화도를 나타낸다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, sCD25의 존재 하에 wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122에 대한 증가된 결합 친화도를 나타낸다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 비해 hCD25/hCD122 수용체 복합체 및/또는 고친화도 hCD25/hCD122/hCD132 수용체 복합체에 대해 증가된 결합 친화도를 나타낸다. 한 측면에서, 본 개시내용은 wt hIL2에 비해 hCD25에 대한 유의하거나 증진된 결합 친화도 및 hCD132 수용체의 세포외 도메인에 대한 감소된 결합 친화도를 나타내는 hIL2 뮤테인을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 CD132 수용체 결합을 감소시키는 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD132 수용체 결합 친화도를 감소시키는 1개 이상의 아미노산 치환은 성숙한 wt hIL2에 따라 넘버링된, hIL2 뮤테인의 위치 18, 22, 및 126에서의 아미노산 변형으로부터 선택된다.

[0023] 신생물성 질환에서 사용하는 방법: 본 개시내용은 신생물성 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 대상체에게 치료 또는 예방 유효량의 hIL2 뮤테인을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 대상체에서 신생물성 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 hIL2 뮤테인은 (a) wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내거나; (b) wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, CD122 및/또는 CD25에 대해 유의한 결합 친화도를 보유하거나; (c) wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122에 대한 결합 친화도를 보유하거나; (d) wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD25에 대한 결합 친화도를 보유하거나; (e) wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122 및 CD25에 대한 결합 친화도를 보유하거나; (f) wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, CD25의 존재 하에 wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122에 대해 증가된 결합 친화도를 나타내거나; 또는 (g) wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, sCD25의 존재 하에 wt hIL2에 비해 CD122에 대해 증가된 결합 친화도를 나타내는 hIL2로부터 선택된다.

[0024] 일부 실시양태에서, 방법은 포유동물 대상체에게 화학요법제, 면역 체크포인트 조정제, 방사선요법 및/또는 물리적 개입 치료 방법, 예컨대 수술 중 1종 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 보충제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 보충제는 치료 항체이다. 일부 실시양태에서, 치료 항체는 종양 세포 항원에 결합한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 보충제는 면역 세포이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 CAR T 세포, 조작된 NK 세포, TCR 조작된 세포, 또는 조작된 Treg를 포함하나 이에 제한되지는 않는 조작된 면역 세포, 또는 1종 이상의 이러한 조작된 면역 세포를 포함하는 세포 집단이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 종양 침윤 림프구 (TIL) 또는 1종 이상의 TIL을 포함하는 세포 집단이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 투여가 고친화도 IL2 수용체를 발현하는 T 세포 (예를 들어, 항원 활성화된 T 세포)의 증식을 촉진하기에 충분하지만 주로 중간 친화도 수용체를 발현하는 T-세포 (예를 들어, NK 세포)의 활성화를 실질적으로 유도하기에 충분한 농도 미만인 수준의 대상체 내 IL2 뮤테인의 혈청 농도를 생성하는, 본 개시내용의 IL2 뮤테인을 사용한 대상체의 치료 방법을 제공한다.

[0027] 본 개시내용은 본 개시내용의 hIL2 뮤테인을 코딩하는 핵산을 추가로 제공한다.

[0028] 본 개시내용은 재조합 생성을 위해 사용되는 숙주 세포에서 작동가능한 1개 이상의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 hIL2 뮤테인을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 추가로 제공한다.

[0029] 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에게 치료 또는 예방 유효량의 본 개시내용의 hIL2 뮤테인을 코딩하는 핵산 또는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인을 코딩하는 재조합 벡터를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 신생물성 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 재조합 벡터는 비-바이러스 벡터 (예를 들어 플라스미드 또는 다른 비-바이러스 전달 시스템) 또는 복제 적격, 복제 결핍, 및 조건부 복제 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터일 수 있다.

[0030] 본 개시내용은 1개 이상의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 hIL2 뮤테인을 코딩하는 핵산

을 포함하는 재조합 벡터를 포함하는 조작된 세포를 추가로 제공한다.

[0031] 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에게 진핵 세포에서 작동가능한 1개 이상의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 hIL2 유테인을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 포함하는 조작된 진핵 세포의 치료 또는 예방 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에서 신생물성 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 면역 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 면역 세포는 조작된 면역 세포일 수 있다.

[0032] 본 개시내용은 hIL2 유테인이 포유동물 대상체에서 그의 작용 지속기간을 증가시키도록 변형된, 본 개시내용의 hIL2 유테인의 변형된 버전을 추가로 제공한다. 이러한 변형의 예는 1종 이상의 담체 단백질에의 접합, PEG화, 아실화, 또는 hIL2 유테인의 아미노산 서열 변형, 치환 또는 결실을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0033] 본 개시내용은 본 개시내용의 hIL2 유테인을 제조하는 방법을 추가로 제공한다. hIL2 유테인을 제조하는 이러한 방법의 예는 원핵 또는 진핵 세포에서의 재조합 생성 또는 화학적 합성을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 본 개시내용은 본 개시내용의 hIL2 유테인 또는 표적 세포에서 활성인 1개 이상의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 hIL2 유테인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터의 제약상 허용되는 제제를 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 제약상 허용되는 제제는 1종 이상의 보충제를 포함할 수 있다.

[0035] 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 또는 예방 유효량의 본 개시내용의 hIL2 유테인 또는 hIL2 유테인을 코딩하는 벡터를 포함하는 제약상 허용되는 투여 형태를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물 대상체에서 신생물성 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0036] 본 개시내용은 본 개시내용의 hIL2 유테인의 제약상 허용되는 투여 형태 및 사용 지침서를 포함하는 키트를 추가로 제공한다. 제약 투여 형태는 사전-충전 시린지에 제공될 수 있다. 키트는 임의로 hIL2 유테인의 제약상 허용되는 투여 형태와 혼합하기 위한 소정량의 용액을 추가로 제공할 수 있고, 여기서 용액은 희석제, 재구성 완충제, 활성화제, 제제화제, 장성 작용제, 또는 생분해성 또는 생침식성 생체적합성 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 제어 방출 제제의 성분 중 1종 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 키트는 임의로 1종 이상의 보충제를 포함하는 제약상 허용되는 제제를 제공할 수 있다. 키트는 투여를 용이하게 하는 의료 장치 (예를 들어 시린지 또는 자가주사기 장치)를 임의로 포함할 수 있다. 키트는 또한 키트 및 그의 성분을 연장된 기간 동안 냉장 온도에서 유지하기 위한 1종 이상의 구성품, 예컨대 1개 이상의 겔 아이스 팩 및/또는 단열 포장을 제공할 수 있다.

[0037] Garcia 등 (국제 출원 번호 PCT/US2018/062122, PCT 국제 공개 번호 WO 2019/104092 A1, 2019년 5월 31일 공개됨, 이후 "Garcia '092")은 특히 본원에 기재된 방법의 실시예에 유용한 부분적 IL2 활성을 유지하면서 CD132에 대해 감소된 결합을 나타내는 위치 18, 22 및 126을 포함하는 변형을 갖는 특정한 IL2 유테인을 기재한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 신생물성 질환, 장애 또는 상태를 앓고 있는 대상체에게 하기 화학식 1 (서열식별번호: 10)의 폴리펩티드에 대해 적어도 95% 상동성인 폴리펩티드를 투여함으로써 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다:

(AA1)a-(AA2)b-(AA3)c-(AA4)d-(AA5)e-(AA6)f-(AA7)g-(AA8)h-(AA9)i-T10-Q11-L12-Q13-L14-E15-H16-L17-(AA18)-L19-D20-L21-(AA22)-M23-I24-L25-N26-G27-I28-N29-N30-Y31-K32-N33-P34-(AA35)-L36-T37-(AA38)-(AA39)-L40-T41-F42-K43-F44-Y45-M46-P47-K48-K49-A50-T51-E52-L53-K54-(AA55)-L56-Q57-C58-L59-E60-E61-E62-L63-K64-P65-L66-E67-E68-(AA69)-L70-N71-L72-A73-(AA74)-S75-K76-N77-F78-H79-(AA80)-(AA81)-P82-R83-D84-(AA85)-(AA86)-S87-N88-(AA89)-N90-(AA91)-(AA92)-V93-L94-E95-L96-(AA97)-G98-S99-E100-T101-T102-F103-(AA104)-C105-E106-Y107-A108-(AA109)-E110-T111-A112-(AA113)-H114-V115-E116-F117-L118-N119-R120-W121-H122-T123-F124-(AA125)-(AA126)-S127-H128-H129-(AA130)-T131-L132-T133

[0039]

- [0040] 상기 식에서:
- [0041] 각각의 a, b, c, d, e, f, g, h 및 i는 0 또는 1로부터 개별적으로 선택되고;
- [0042] AA1은 A (야생형, a=1)이거나 또는 결실되고 (a=0);
- [0043] AA2는 P (야생형, b=1)이거나 또는 결실되고 (b=0);
- [0044] AA3은 T (야생형, c=1), C, A, G, Q, E, N, D, R, K, P이거나 또는 결실되고 (c=0);
- [0045] AA4는 S (야생형, d=1)이거나 또는 결실되고 (d=0);
- [0046] AA5는 S (야생형, e=1)이거나 또는 결실되고 (e=0);
- [0047] AA6은 S (야생형, f=1)이거나 또는 결실되고 (f=0);
- [0048] AA7은 T (야생형, g=1)이거나 또는 결실되고 (g=0);
- [0049] AA8은 K (야생형, h=1)이거나 또는 결실되고 (h=0);
- [0050] AA9는 K (야생형, i=1)이거나 또는 결실되고 (i=0);
- [0051] AA18은 L (야생형) 또는 R, L, G, M, F, E, H, W, K, Q, S, V, I, Y, H, D 또는 T이고;
- [0052] AA22는 Q (야생형) 또는 F, E, G, A, L, M, F, W, K, S, V, I, Y, H, R, N, D, T 또는 F이고;
- [0053] AA35는 K (야생형) 또는 E이고;
- [0054] AA38은 R (야생형), W 또는 G이고;
- [0055] AA39는 M (야생형), L 또는 V이고;
- [0056] AA55는 H (야생형) 또는 Y이고;
- [0057] AA69는 V (야생형) 또는 A이고;
- [0058] AA74는 Q (야생형), P, N, H, S이고;
- [0059] AA80은 L (야생형), F 또는 V이고;
- [0060] AA81은 R (야생형), I, D 또는 T이고;
- [0061] AA85는 L (야생형) 또는 V이고;
- [0062] AA86은 I (야생형) 또는 V이고;
- [0063] AA89는 I (야생형) 또는 V이고;
- [0064] AA91은 V (야생형), R 또는 K이고;
- [0065] AA92는 I (야생형) 또는 F이고;
- [0066] AA97은 K (야생형) 또는 Q이고;
- [0067] AA104는 M (야생형) 또는 A이고;
- [0068] AA109는 D (야생형), C 또는 활성화된 측쇄를 갖는 비-천연 아미노산이고;
- [0069] AA113은 T (야생형) 또는 N이고;
- [0070] AA125는 C (야생형), A 또는 S이고;
- [0071] AA126은 Q (야생형) 또는 H, M, K, C, D, E, G, I, R, S 또는 T이고;
- [0072] AA130은 S (야생형), T, G 또는 R이다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 하기 돌연변이를 포함한다:
- [0074] AA18은 L (야생형) 또는 R, L, G, M, F, E, H, W, K, Q, S, V, I, Y, H, D 또는 T로 이루어진 군으로부터 선택되고;

- [0075] AA22는 Q (야생형) 또는 F, E, G, A, L, M, F, W, K, S, V, I, Y, H, R, N, D, T, 또는 F로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0076] AA126은 Q (야생형) 또는 H, M, K, C, D, E, G, I, R, S, 또는 T로 이루어진 군으로부터 선택됨.
- [0077] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 하기 돌연변이를 포함한다:
- [0078] a=0이고;
- [0079] AA18은 L (야생형) 또는 R, L, G, M, F, E, H, W, K, Q, S, V, I, Y, H, D 또는 T로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0080] AA22는 Q (야생형) 또는 F, E, G, A, L, M, F, W, K, S, V, I, Y, H, R, N, D, T, 또는 F로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0081] AA126은 Q (야생형) 또는 H, M, K, C, D, E, G, I, R, S, 또는 T로 이루어진 군으로부터 선택됨.
- [0082] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 하기 돌연변이 세트로부터 선택된 돌연변이 세트를 포함한다: L18R, Q22E 및 Q126H; L18R, Q22E 및 Q126K; L18R, Q22E 및 Q126M; L18R, Q22E 및 Q126T; L18R, Q22E; V91K; V91R; Q126H; L18R, 및 Q126H; Q22E, 및 Q126H; L18G, Q22E 및 Q126H; L18A, Q22E 및 Q126H; L18M, Q22E 및 Q126H; L18F, Q22E 및 Q126H; L18W, Q22E 및 Q126H; L18K, Q22E 및 Q126H; L18Q, Q22E 및 Q126H; L18E, Q22E 및 Q126H; L18S, Q22E 및 Q126H; L18V, Q22E 및 Q126H; L18I, Q22E 및 Q126H; L18Y, Q22E 및 Q126H; L18H, Q22E 및 Q126H; L18N, Q22E 및 Q126H; L18D, Q22E 및 Q126H; L18T, Q22E 및 Q126H; L18R, Q22G 및 Q126H; L18R, Q22A 및 Q126H; L18R, Q22L 및 Q126H; L18R, Q22M 및 Q126H; L18R, Q22F 및 Q126H; L18R, Q22W 및 Q126H; L18R, Q22K 및 Q126H; L18R, Q22S 및 Q126H; L18R, Q22V 및 Q126H; L18R, Q22I 및 Q126H; L18R Q22Y 및 Q126H; L18R Q22H 및 Q126H; L18R Q22R 및 Q126H; L18R Q22N 및 Q126H; L18R Q22D 및 Q126H; 및 L18R Q22T 및 Q126H.
- [0083] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 PEG화된다. 일부 실시양태에서, 이러한 PEG화 폴리펩티드의 PEG 성분은 약 10 kD 내지 약 70 kD의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이러한 PEG화 폴리펩티드의 PEG 성분은 약 40 kD의 분자량을 갖는다.
- [0084] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질은 Fc 도메인을 포함한다.
- [0085] 또한, 상기 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 DNA이다.
- [0086] 또한, 상기 기재된 바와 같은 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터가 제공된다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 비-바이러스 벡터이다.
- [0088] 또한, 상기 기재된 바와 같은 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다.
- [0089] 또한, 상기 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 상기 기재된 바와 같은 핵산 또는 상기 기재된 바와 같은 벡터를 포함하는 제약 제제가 제공된다.
- [0090] 또한, 상기 기재된 바와 같은 제약 제제의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 신생물성 질환 장애 또는 상태를 앓고 있는 포유동물 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 대상체에 게 보충제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 보충제는 화학요법제, 항체, 면역 체크포인트 조절제, TIL, CAR-T 세포, 및 물리적 방법으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 보충제는 면역 체크포인트 조절제이다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 조절제는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체이다. 일부 실시양태에서, 보충제는 [fam]-트라스투주맙 데록스테칸, 엔포르투맙 베도틴, 폴라투주맙 베도틴, 세미폴리맙, 목세투모맙 파수도톡스, 모가몰리주맙, 티드라키주맙, 이발리주맙, 두르발투맙, 이노투주맙, 오조가미신, 아벨루맙, 아테졸리주맙, 올라라투맙, 익세키주맙, 아라투무맙, 엘로투주맙, 네시투무맙, 디누톡시맙, 니볼루맙, 블리나투모맙, 펌브롤리주맙, 라무시루맙, 실톡시맙, 오비누투주맙, 아도-트라스투주맙 엠탄신, 페르투주맙, 브렌톡시맙 베도틴, 이필리무맙, 오파투무맙, 세르톨리주맙 페골, 카투막소맙, 파니투무맙, 베바시주맙, 세톡시맙, 토시투모맙-I131, 이브리투모맙 티옥세탄, 겐투주맙, 오조가미신, 트라스투주맙, 인플릭시맙, 리톡시맙 및 에드레콜로맙으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체이다.
- [0091] 일부 실시양태에서, 신생물성 질환 장애 또는 상태는 선종, 섬유종, 혈관종, 증식증, 비정형증, 화생, 이형성증, 암종, 백혈병, 유방암, 육종, 백혈병, 림프종, 비뇨생식기암, 난소암, 요도암, 방광암, 전립선암, 위

장암, 결장암, 식도암, 위암, 폐암; 골수종; 췌장암; 간암; 신장암; 내분비암; 피부암; 신경교종, 신경모세포종, 성상세포종, 골수이형성 장애; 계내 자궁경부 암종; 장 폴립증; 구강백반증; 조직구증, 켈로이드 반흔을 포함한 과다증식성 반흔, 호흡기계 암종, 위장계 암종, 비뇨생식기계 암종, 고환 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비계 암종, 흑색종, 선암종, 골수증식성 신생물, 호산구증가증을 동반한 골수성 및 림프성 장애, 골수증식성/골수이형성 신생물, 골수이형성 증후군, 급성 골수성 백혈병 및 관련 전구체 신생물, 및 모호 계통의 급성 백혈병, 전골수성 백혈병 (APML), 급성 골수 백혈병 (AML) 및 만성 골수 백혈병 (CML), 전림프구성 신생물, 성숙한 B-세포 신생물, 성숙한 T-세포 신생물, 호지킨 림프종, 및 면역결핍-연관 림프증식성 장애, B-계통 ALL 및 T-계통 ALL을 포함한 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 전림프구성 백혈병 (PLL), 모발상 세포 백혈병 (HLL) 및 발덴스트롬 마크로글로블린혈증 (WM), 적혈모구성 백혈병 및 급성 거핵모구성 백혈병, 비-호지킨 림프종 및 그의 변이체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 악성 림프종, 말초 T 세포 림프종, 성인 T-세포 백혈병/림프종 (ATL), 피부 T 세포 림프종 (CTCL), 거대 과립 림프구성 백혈병 (LGF), 호지킨병 및 리드-스탬버그병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 일부 실시양태에서, 방법은 상기 대상체에게 치료 유효량의 hIL2 뮤테인을 투여하는 것을 포함하며, 상기 치료 유효량은 혈청 농도를, 상기 IL2 뮤테인과 관련하여 CD3-활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 촉진하기에 충분한 IL2 뮤테인의 유효 농도 이상에서, T-세포의 활성화를 유도하기에 충분한 상기 IL2 뮤테인의 혈청 농도 이하에서, 적어도 24시간의 기간의 약 50% 초과 동안 유지하기에 충분하다.

도면의 간단한 설명

[0093] 본 발명은 첨부된 도면을 함께 읽을 때 하기 상세한 설명으로부터 가장 잘 이해된다. 일반적인 실무에 따라, 도면의 다양한 특징이 축적에 맞지 않음을 강조한다. 그에 반해, 다양한 특징의 치수는 명료성을 위해 임의로 확대 또는 축소된다.

첨부된 도면의 도 1은 실시예에 기재된 바와 같이 지정된 IL2 뮤테인 (및 대조군)을 함유하는 293T 형질감염 상청액으로 처리된 NKL 세포에서 측정되는 pSTAT5 수준의 그래프 표현을 제공한다. 수직 축은 실시예에 따라 측정되는 IL2 활성 수준을 나타내고, 각각의 막대는 실시예에 기재된 바와 같이 그의 3 문자 약어로 확인되는 구축물과 연관되어 평가되는 특정한 IL2 펩티드의 활성 수준을 나타낸다.

첨부된 도면의 도 2는 실시예에 기재된 바와 같이 지정된 IL2 뮤테인 (및 대조군)을 함유하는 293T 형질감염 상청액으로 처리된 CD25 양성 및 CD25 음성 YT 세포에서 비교 pSTAT5 활성을 제공한다. 수직 축은 CD25 양성 YT 세포에서 관찰된 pSTAT5 활성 수준을 CD25 음성 YT 세포에서 측정된 pSTAT5 활성 수준으로 나눈 비로서 계산되는 선택성의 척도이며, 각각의 막대는 실시예에 기재된 바와 같이 그의 3 문자 약어로 확인되는 평가된 특정한 IL2 펩티드의 활성 수준을 나타낸다.

도 3은 hIL2 뮤테인이 다양한 희석률에서 CD25 음성 YT 세포에 비해 CD25 양성 YT CD25 세포에 대해 야생형 hIL2에 비해 우선적인 pSTAT5 신호전달 활성을 입증하였음을 예시하는 표 형태의 데이터를 제공한다.

도 4는 명세서 및 실시예 8에 더욱 상세하게 기재되는 바와 같이 hIL2 뮤테인과 접촉한 3F8 세포의 세포 증식에 관한 데이터를 제공한다.

도 5는 명세서 및 실시예 8에 더욱 상세하게 기재되는 바와 같이 hIL2 뮤테인과 접촉한 3F8 세포로부터의 인터페론 감마 생성에 관한 데이터를 제공한다.

도 6은 YT CD25 NKL 세포에 의한 CD25 (IL2Ra)의 발현을 입증하는 형광 유동 세포측정법 패널 A, CD122 (IL2Rb)의 발현을 입증하는 패널 B, 및 CD132 (IL2Rg)의 발현을 입증하는 패널 C에 의해 확인된 YT CD25 세포상의 IL-2 수용체의 성분의 발현에 관한 데이터를 제공한다. 채워진 히스토그램은 염색된 세포를 나타내고, 파선 히스토그램은 비염색된 대조군 세포를 나타낸다. 게이트는 각각의 염색에 대한 퍼센트 양성 세포를 나타낸다.

도 7은 wt hIL-2 및 STK-012가 유사한 용량 범위에서 NKL 세포의 증식을 유도하였음을 예시하는 데이터를 제공하며, 이는 STK-012가 wt hIL2에 필적하는 인간 면역 세포에서 pSTAT5를 유도하는 능력을 보유함을 입증한다.

도 8은 야생형 IL-2 (패널 A) 또는 STK-012 (패널 B)로의 처리 후 나타낸 세포주에 대한 퍼센트 P-STAT5-양성 세포에 관한 데이터를 제공한다. 4-파라미터 피트에 의해 계산된 추세선이 제시된다. x-축은 log10 스케일 상의 단백질 농도를 나타낸다. 비처리된 세포에 대한 값은 y-축에 표시된다.

도 9는 열거된 다양한 투여량 및 작용제로 처리된 마우스의 생존과 관련된, 명세서에 보다 완전히 기재되는 바와 같은 데이터를 제공한다.

도 10은 부종 폐의 중량에서 건조 후 폐의 중량을 뺀 차이로서 계산된, mIL-2 또는 STK-014로 처리된 마우스의 폐의 물 함량에 관한 데이터를 제공한다. 폐를 연구 종료 시에 또는 조기 종결 또는 사망 시에 (mIL-2 처리된 동물에서) 수거하였다.

도 11은 지시된 다양한 투여량에서 mIL-2 또는 STK-014로 처리된 마우스의 체중의 백분율로서의 폐 중량에 관한 데이터를 제공한다. 폐를 연구 종료 시에 또는 조기 종결 또는 사망 시에 (mIL-2 처리된 동물에서) 수거하였다.

도 12는 STK-014 처리, PEGmIL2 및 대조군에 대한 반응으로 마우스에서의 CT-26 결장 암종 모델 연구의 과정에 걸친 종양 부피에 관한 데이터를 제공한다.

도 13은 CT-26 결장 암종 모델 연구에서 STK-014에 대한 반응으로 CD8+ 및 CD8+ CD25+ T 세포의 종양내 확장과 관련하여 면역조직화학적 평가에 관한 데이터를 제공한다.

도 14는 CT-26 결장 암종 모델 연구에서 STK-014에 대한 반응으로 마우스의 비장에서의 CD25+ T 세포의 확장에 관한 면역조직화학적 평가에 관한 데이터를 제공한다.

도 15는 STK-014 및 PEG-mIL-2에 대한 반응으로 시간 경과에 따른 종양 부피의 변화를 보여주는, 마우스에서의 MC38 결장 암종 모델의 과정에 걸친 종양 부피 (y-축)에 관한 데이터를 제공한다.

도 16A 및 도 16B는 STK-014 및 PEG-mIL-2를 사용한 치료 간격의 종료 시 MC38 종양 내, IHC에 의한 CD8+ T 세포 및 CD25+ CD8+ T 세포 각각의 정량화에 관한 데이터를 제공한다.

도 17은 STK-014 및 PEG-mIL-2로의 처리에 대한 반응으로 MC38 종양에서의 조절 T 세포에 대한 종양내 CD8+ T 세포에 관한 데이터를 제공한다.

도 18은 처리 기간 종료 시의 MC38 종양에서의 CD8+ T 세포 및 Treg의 IHC 분석에 의한 정량화에 관한 데이터를 제공한다.

도 19는 지시된 처리에 대한 반응으로 MC38 종양 모델에서의 마우스에서의 체중 양의 변화에 관한 데이터를 제공한다.

도 20은 항-PD-1 처리와 조합된 STK-014로의 처리에 대한 반응으로 마우스에서의 MC38 종양 모델에서의 종양 부피에 관한 데이터를 제공한다.

도 21은 STK-014, 항-PD1 항체, 및 STK014 및 항-PD-1 처리의 조합을 사용한 처리에 대한 반응으로 마우스에서의 MC38 종양 모델에서의 종양내 T 세포의 수준에 관한 데이터를 제공한다.

도 22는 비-인간 영장류에서 평가된 바와 같은 다양한 용량의 STK-012에서의 전신 노출에 관한 데이터를 제공한다. 1회 용량의 프로류킨 (고용량 (HD) 프로류킨과 등가임)과 비교한 STK-012의 농도 (제1일 / 제8일에 지시된 바와 같이 투여됨).

도 23은 STK-012 처리된 시노물구스 원숭이로부터 분리된 CD25+ CD4+ T 세포에서의 P-STAT5에 대한 비-인간 영장류 FACS 분석에서 STK-012에 대한 반응으로 pSTAT5에 관한 데이터를 제공하며, 이는 STK-012의 단일 용량이 7일 동안 지속된 p-STAT5 신호전달을 유도하였음을 입증한다.

도 24는 STK-012의 혈청 농도와 관련하여 말초 혈액으로부터의 3가지 세포 유형 (CD25- CD122- CD8+ T 세포, CD25+ CD122- CD8+ T 세포 및 CD25+ CD122+ CD8+ T 세포)에서 STK-012 혈청 농도와 관련하여 STAT5 인산화 (Y-축)와 관련된 데이터를 제공한다.

도 25는 CD8+ CD25+ T 세포 및 CD25 음성 세포에서의 STK-012 (0.1/0.35 mg/kg) 유도된 증식 (KI67+)에 관한 데이터를 제공한다.

도 26은 STK-012에 대한 반응으로 NHP에서의 CD8 T 세포 중 기억 T 세포의 농도에 관한 데이터를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 개시내용을 더욱 용이하게 이해하기 위해, 특정한 용어 및 문구가 하기에서 뿐만 아니라 명세서 전체에 걸쳐

[0094]

정의된다. 본원에 제공된 정의는 비제한적이며, 관련 기술분야의 기술자가 알고 있는 지식의 관점에서 읽어야 한다.

- [0095] 본 발명의 방법 및 조성물을 기재하기 전에, 본 발명이 기재된 특정한 방법 또는 조성물로 제한되지 않으며, 따라서 물론 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본원에 기재된 용어가 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 목적이고, 제한하는 것으로 의도되지 않음을 이해해야 한다.
- [0096] 값의 범위가 제공되는 경우, 해당 범위의 상한과 하한 사이에서 각각의 중간 값, 문맥상 명백히 달리 지시되지 않는다면 하한의 단위의 1/10까지 또한 구체적으로 개시되는 것으로 이해된다. 명시된 범위에서 임의의 명시된 값 또는 중간 값과 해당 명시된 범위에서 임의의 다른 명시된 또는 중간 값 사이의 각각의 더 작은 범위는 본 발명 내에 포함된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 상기 범위에 독립적으로 포함되거나 또는 제외될 수 있고, 더 작은 범위에 한계 중 하나가 포함되거나, 둘 다 포함되지 않거나 또는 둘 다 포함되는 각각의 범위 또한 본 발명 내에 포함되며, 명시된 범위에서 임의의 구체적으로 제외된 한계에 적용된다. 명시된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계 중 하나 또는 둘 다를 제외하는 범위 또한 본 발명에 포함된다.
- [0097] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명에 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 일부 잠재적이고 바람직한 방법 및 물질이 이제 기재된다. 본원에 언급된 모든 공보는 공보가 인용된 것과 관련된 방법 및/또는 물질을 개시하고 기재하기 위해 본원에 참조로 포함된다.
- [0098] 본원에서 및 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명백히 달리 지시되지 않는다면 복수 형태를 포함한다는 것에 유의한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 다수개의 이러한 세포를 포함하고, "펩티드"에 대한 언급은 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 하나 이상의 펩티드 및 그의 등가물, 예를 들어 폴리펩티드 등에 대한 언급을 포함한다.
- [0099] 본원에서 논의되는 공보는 본 출원의 출원인 이전에 그들의 개시내용에 대해서만 제공된다. 본원에서 어떤 것도 본 발명이 선행 발명에 의해 이러한 공보보다 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 추가로, 제공된 공개 날짜는 실제 공개 날짜와 상이할 수 있으며, 이는 독립적으로 확인할 필요가 있을 수 있다.
- [0100] 달리 나타내지 않는다면, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도 (°C)이고, 압력은 대기압 또는 그 근처이다. 표준 약어: bp = 염기쌍(들); kb = 킬로염기(들); s 또는 sec = 초; min = 분; h 또는 hr = 시간; AA 또는 aa = 아미노산(들); kb = 킬로염기(들); nt = 뉴클레오티드(들); pg = 피코그램; ng = 나노그램; μ g = 마이크로그램; mg = 밀리그램; g = 그램; kg = 킬로그램; pL = 피코리터; dL 또는 dL = 데시리터; μ L, uL 또는 μ L = 마이크로리터; mL 또는 mL = 밀리리터; L 또는 L = 리터; μ M 또는 μ M = 마이크로몰; pM = 피코몰; nM = 나노몰; fM = 펨토몰; mM = 밀리몰; M = 몰; kDa = 킬로달톤; SC 또는 SQ = 피하(로); QD = 매일; QW = 매주 1회; QM = 매월 1회; BW = 체중; U = 단위; ns = 통계적으로 유의하지 않음; PBS = 포스페이트-완충 염수; HSA = 인간 혈청 알부민; MSA = 마우스 혈청 알부민; 뿐만 아니라 하기 표 1에 제공된 약어가 사용된다:

표 1. 추가의 약어	
약어	설명
ADA	항-약물 항체
ADCC	항체의존세포매개세포독성
AEC	음이온 교환 크로마토그래피
ALT	알라닌 트랜스아미나제
AST	아스파르테이트 트랜스아미나제
AUC	곡선하 면적 (약리학적 노출)
BID	1일 2회
CD8+ T 세포	세포독성 CD8+ T 세포
clULN	임상 실험실 정상 상한치
Cmax	최대 약물 농도
Cmin	최소 약물 농도
CR	완전 반응 (측정가능한 잔류 종양 없음)
CRC	결장직장 암종
CTCAE	유해 사건에 대한 통상 용어 기준
DLT	용량 제한 독성
ECG	심전도
ECOG	동부 종양학 협력 그룹
EDTA	에틸렌디아민테트라아세트산
ELISA	효소-연결 면역흡착 검정
HIC	소수성 상호작용 크로마토그래피
HNSTD	최고 비-중증 독성 용량
HP-IEC	고성능 이온 교환 크로마토그래피
HP-SEC	고성능 크기 배제 크로마토그래피
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
IEF	등전 포커싱
IFN α , IFN γ	인터페론 감마
IHC	면역조직화학
ID 또는 i.d.	피내
IM 또는 i.m.	근육내
IV 또는 i.v.	정맥내
KD	평형 해리 상수

[0101]

표 1. 추가의 약어	
약어	설명
kDa	킬로달톤
LAL	리물루스 변형세포 용해물 (내독소 검정)
LC/MS	액체 크로마토그래피-질량 분광측정법
MCB	마스터 세포 은행
MTD	최대 허용 용량
n/d, nd	검출 불가; 검출되지 않음; 검출 한계 미만
NHL	비-호지킨 림프종
NHP	비-인간 영장류
NK	자연 킬러 세포
nM	나노몰 (10^{-9} 몰)
NSG	NOD-scid-IL2R γ -null 면역 손상된 마우스 계통
PCR	폴리머라제 연쇄 반응
PEG	폴리에틸렌 글리콜
PK	약동학
q.d.; qg	라틴어: 매일(quaque die); “1일 1회”
q.o.d.; qod	라틴어: 매일; “1일 1회”
RP-HPLC	역상 HPLC
RT-PCR	리버스 트랜스크립타제 폴리머라제 연쇄 반응
SAE	심각한 유해 사건
SC 또는 s.c.	피하
SDS-PAGE	소듐 도데실 황페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동
SEC	크기 배제 크로마토그래피
T _{1/2}	반감기
TK	독성동태학
TIL	종양 침윤 림프구
UF/DF	한외여과/투석여과

[0102]

[0103]

본 개시내용 전체에 걸쳐 단일 문자 또는 3 문자 코드에 따라 아미노산이 언급된다는 것을 이해할 것이다. 독자의 편의를 위해, 단일 및 3 문자 아미노산 코드가 하기 표 2에 제공된다:

표 2. 아미노산 약어		
G	글리신	Gly
P	프롤린	Pro
A	알라닌	Ala
V	발린	Val
L	류신	Leu
I	이소류신	Ile
M	메티오닌	Met
C	시스테인	Cys
F	페닐알라닌	Phe
Y	티로신	Tyr
W	트립토판	Trp
H	히스티딘	His
K	리신	Lys
R	아르기닌	Arg
Q	글루타민	Gln
N	아스파라긴	Asn
E	글루탐산	Glu
D	아스파르트산	Asp
S	세린	Ser
T	트레오닌	Thr

[0104]

[0105]

분자 생물학의 표준 방법은 과학 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; and Ausubel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y.]을 참조하며, 박테리아 세포에서의 클로닝 및 DNA 돌연변이유발 (Vol. 1), 포유동물 세포 및 효모에서의 클로닝 (Vol. 2), 당접합체 및 단백질 발현 (Vol. 3), 및 생물정보학 (Vol. 4)이 기재되어 있음). 과학 문헌은 번역침전, 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리, 및 결정화, 뿐만 아니라 화학적 분석, 화학적 변형, 번역 후 변형, 융합 단백질의 생성, 및 단백질의 글리코실화를 비롯한 단백질 정제 방법을 기재한다 (예를 들어, 문헌 [Coligan, et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vols. 1-2, John Wiley and Sons, Inc., NY] 참조).

[0106]

달리 나타내지 않는다면, 하기 용어들은 하기 제시된 의미를 갖는 것으로 의도된다. 다른 용어는 명세서 전체에 걸쳐 다른 곳에서 정의된다.

[0107]

정의:

[0108]

활성화시키다: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "활성화시키다"는 수용체에 대한 효능제 리간드의 결합의 생물학적 효과를 반영하기 위해 수용체 또는 수용체 복합체와 관련하여 사용된다. 활성화제는 예를 들어 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 증가시키거나, 활성화시키거나, 용이하게 하거나, 활성화를 증강시키거나, 민감화시키거나 또는 상향조절하는 분자이다. 예를 들어, IL2 수용체 (예를 들어, 고친화도 CD25/CD122/CD132 수용체 복합체)에 대한 IL2 효능제의 결합은 수용체의 신호전달을 "활성화시켜" 하나 이상의 세포내 생물학적 효과 (예를 들어 STAT5의 인산화)를 생성한다.

[0109]

활성: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "활성"은 시험 시스템 (예를 들어 검정)에 대한 분자의 특성, 분자의 생물학적 또는 화학적 특성 (예를 들어, 분자가 또 다른 분자에 결합하는 정도) 또는 물질 또는 세포의 물리적 특성 (예를 들어 세포 막 전위의 변형)을 기재하기 위해 분자와 관련하여 사용된다. 이러한 생물학적 기능의 예에는 생물학적 작용제의 촉매 활성, 세포내 신호전달, 유전자 발현, 세포 증식을 자극하는 능력, 면역학적 활성, 예컨대 염증성 반응을 조정하는 능력이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. "활성"은 전형적으로 투여된 작용제의 단위당 생물학적 활성, 예컨대 [촉매 활성]/[mg 단백질], [면역학적 활성]/[mg 단백질], 국제 단위 (IU)의 활성, [STAT5 인산화]/[mg 단백질], [T-세포 증식]/[mg 단백질], 플라크 형성 단위 (pfu) 등으로 표현된다.

- [0110] 투여하다/투여: 용어 "투여" 및 "투여하다"는 대상체의 시험관내, 생체내 및/또는 생체외에서 세포, 조직, 장기, 또는 생물학적 유체를 작용제 (예를 들어 hIL2 뮤테인, hIL2 뮤테인을 코딩하는 벡터, hIL2 뮤테인을 발현하는 조작된 세포, 화학요법제, 항체, 또는 상기 중 1종 이상을 포함하는 제약 제제)와 접촉시키는 것을 비롯하여 대상체를 접촉시키는 행위를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 작용제의 투여는 관련 기술분야에서 인식되는 임의의 다양한 방법, 예컨대 비제한적으로 국소 투여, 혈관내 주사 (정맥내 또는 동맥내 주입 포함), 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 두개내 주사, 종양내 주사, 경피, 경점막, 이온영동 전달, 림프내 주사, 위내 주입, 전립선내 주사, 방광내 주입 (예를 들어, 방광), 흡입 (예를 들어, 호흡기 흡입기, 예컨대 건조-분말 흡입기), 안내 주사, 복부내 주사, 병변내 주사, 난소내 주사, 뇌내 주입 또는 주사, 뇌실내 주사 (ICVI) 등을 통해 달성될 수 있다. 용어 "투여"는 세포, 조직 또는 장기에 대한 작용제의 접촉 뿐만 아니라, 세포와 접촉하고 있는 유체에 대한 작용제의 접촉이 포함된다. 용어 "투여"는 대상체로부터 단리되어 작용제와 접촉할 수 있는 세포 (또는 세포 집단)의 생체의 접촉을 포함하며, 세포 (또는 세포 집단)는 동일한 대상체 (예를 들어 자가 세포 전달) 또는 상이한 대상체 (예를 들어 동종이체 세포 전달)에게 투여된다.
- [0111] 유해 사례: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유해 사례"는 대상체에서 치료제 또는 예방제의 사용과 연관된 임의의 바람직하지 않은 경험을 지칭한다. 유해 사례는 치료제 또는 예방제 (예를 들어 IL2 뮤테인)의 투여에 의해 유발되지 않지만, 관련이 없는 상황에서 발생할 수 있다. 유해 사례는 전형적으로 경증, 중간 또는 중증으로 분류된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 유해 사례의 분류는 본원에서 사용된 바와 같이 미국 보건 복지부 (United States Department of Health and Human Services), 국립 보건원 (National Institutes of Health) 및 국립 암 연구소 (National Cancer Institute)에 의해 2017년 11월 27일에 발행된 유해 사례에 대한 공통 용어 기준 v5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events v5.0 (CTCAE))에 따른다.
- [0112] 친화도: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "친화도"는 제2 분자 (예를 들어 수용체)에 대한 제1 분자 (예를 들어 리간드)의 특이적인 결합의 정도를 지칭하며, 분자와 그의 표적 사이의 해리 상수 (K_{off}) 및 분자와 그의 표적 사이의 회합 상수 (K_{on})의 비인 K_d 로 표현되는 결합 동역학에 의해 측정된다.
- [0113] 효능제: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "효능제"는 제2 작용제 ("표적")에 특이적으로 결합하고, 표적과 상호작용하여, 표적 활성화의 증가를 유발하거나 또는 촉진시키는 제1 작용제를 지칭한다. 일부 경우에, 효능제는 세포 활성화를 조정하거나, 활성화를 증진시키거나, 제2 작용제에 의한 활성화에 대해 세포를 감작화시키거나, 또는 세포 증식 또는 예컨대 아포토시스에 의한 세포 주기 정지 또는 세포 사멸을 초래하는 경로를 유발할 수 있는 1종 이상의 유전자, 단백질, 리간드, 수용체, 생물학적 경로의 발현을 상향조절하는 수용체 단백질의 활성화제이다. 일부 실시양태에서, 효능제는 수용체에 결합하고, 수용체 상태를 변경시켜, 수용체의 내인성 리간드의 효과를 모방하는 생물학적 반응을 일으키는 작용제이다. 용어 "효능제"에는 부분 효능제, 완전 효능제 및 과효능제가 포함된다. 효능제는 이러한 효능제가 연구 중인 수용체에 의해 유도되는 실질적으로 완전한 생물학적 반응 (즉, 천연 발생 리간드/수용체 결합 상호작용과 연관된 반응)을 유발할 때 "완전 효능제", 또는 부분 효능제로 기재될 수 있다. "과효능제"는 표적 수용체에 대해 내인성 효능제보다 더 큰 최대 반응을 생성할 수 있고, 따라서 천연 리간드의 100% 초과 활성을 갖는 효능제의 유형이다. 과효능제는 전형적으로, 비교가능한 검정에서 유사한 농도에서 평가될 때 분자의 천연 발생 형태의 평가가능한 정량적 또는 정성적 파라미터에서 110% 초과, 대안적으로 120% 초과, 대안적으로 130% 초과, 대안적으로 140% 초과, 대안적으로 150% 초과, 대안적으로 160% 초과, 또는 대안적으로 170% 초과 반응을 나타내는 합성 분자이다. hIL2 뮤테인과 관련하여, hIL2 뮤테인의 활성은 WHO 국제 표준 (NIBSC 코드: 86/500) 야생형 성숙한 hIL2에 따라 유사한 검정에서 유사한 농도에서 평가하였을 때 발현된다. 완전 효능제와 연관된 생물학적 효과는 부분 또는 과효능제의 생물학적 효과와 정도 및/또는 종류가 상이할 수 있음을 주목하여야 한다. 효능제와 대조적으로, 길항제는 수용체에 특이적으로 결합할 수 있지만, 수용체에 의해 전형적으로 개시되는 신호 캐스케이드를 일으키지 않고, 해당 수용체에서 효능제의 작용을 변경시킬 수 있다. 역효능제는 효능제의 방향과 반대인 약리학적 반응을 생성하는 작용제이다.
- [0114] 효능제와 대조적으로, 길항제는 수용체에 특이적으로 결합할 수 있지만, 수용체에 의해 전형적으로 개시되는 신호 캐스케이드를 일으키지 않고, 해당 수용체에서 효능제의 작용을 변경시킬 수 있다. "과효능제"는 표적 수용체에 대한 내인성 효능제에 비해 더 큰 최대 반응을 생성할 수 있는 유형의 효능제이며, 따라서 100% 초과 활성을 갖는다. 본 개시내용의 IL2 과효능제는 비교가능한 검정에서 유사한 농도에서 평가될 때 WHO 국제 표준 (NIBSC 코드: 86/500) 야생형 성숙한 hIL2의 활성의 110% 초과, 대안적으로 120% 초과, 대안적으로 130% 초과, 대안적으로 140% 초과, 대안적으로 150% 초과, 대안적으로 160% 초과, 또는 대안적으로 170% 초과를 가질 수 있

다. 역효능제는 효능제의 방향과 반대인 약리학적 반응을 생성하는 작용제이다.

[0115] 길항제: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "길항제" 또는 "억제제"는 효능제의 작용(들)과 반대인 분자를 지칭한다. 길항제는 효능제의 활성을 방지하거나, 감소시키거나, 억제하거나 또는 중화시키며, 길항제는 또한 확인된 효능제가 없는 경우에도 표적, 예를 들어 표적 수용체의 구성적 활성을 방지하거나, 억제하거나 또는 감소시킬 수 있다. 억제제는 예를 들어 유전자, 단백질, 리간드, 수용체, 면역 체크포인트 경로를 포함한 생물학적 경로, 또는 세포를 감소시키거나, 차단하거나, 방지하거나, 활성화를 지연시키거나, 불활성화시키거나, 탈민감화시키거나 또는 하향조절하는 분자이다.

[0116] 항체: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 집합적으로 하기를 지칭한다: (a) 표적 분자에 특이적으로 결합하는 글리코실화된 및 비-글리코실화된 면역글로불린 (포유동물 면역글로불린 클래스 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하나 이에 제한되지는 않음) 및 (b) 표적 분자에 결합하기 위해 그가 유래된 면역글로불린과 경쟁하는 IgG(1-4)델타C_H2, F(ab')₂, Fab, ScFv, V_H, V_L, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, dsFv, F(ab')₃, scFv-Fc 및 (scFv)₂를 포함하나 이에 제한되지는 않는 면역글로불린 유도체. 용어 항체는 임의의 특정한 포유동물 종으로부터 유래된 면역글로불린으로 제한되지 않고, 무린, 인간, 말, 낙타과, 인간 항체가 포함된다. 용어 항체에는 전형적으로 낙타과 (낙타, 라마 및 알파카 포함)의 면역화로부터 수득되는 소위 "중쇄 항체" 또는 "VHH" 또는 "나노바디(Nanobody)®"가 포함된다 (예를 들어 문헌 [Hamers-Casterman, et al. (1993) Nature 363:446-448] 참조). 주어진 특이성을 갖는 항체는 또한 비-포유동물 공급원, 예컨대 상어를 포함하나 이에 제한되지는 않는 연골 어류의 면역화로부터 수득되는 VHH로부터 유래될 수 있다. 용어 "항체"는 천연 공급원으로부터 또는 항원에 의한 면역화 후에 동물로부터 단리될 수 있는 항체 뿐만 아니라, 조작된 항체, 예컨대 모노클로날 항체, 이중특이적인 항체, 삼중특이적인, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, CDR-이식된, 베니어링된 또는 탈면역화된 (예를 들어, T-세포 에피토프를 제거하기 위해) 항체를 포함한다. 용어 "인간 항체"에는 인간으로부터 수득된 항체 뿐만 아니라, 항원에 의한 자극시 트랜스제닉 동물이 인간에 의해 생성되는 항체의 특징적인 아미노산 서열을 포함하는 항체를 생성하도록, 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 트랜스제닉 포유동물로부터 수득된 항체가 포함된다. 용어 항체에는 모 항체 및 그의 유도체, 예컨대 친화도 성숙한, 베니어링된, CDR 이식된 (CDR 이식된 VHH 포함), 인간화, 낙타화 (비-낙타 유래된 VHH의 경우), 또는 비-면역글로불린 스캐폴드에서 항체 (예를 들어, CDR)의 결합 도메인을 포함하는 결합 분자 모두 포함된다. 용어 "항체"는 임의의 특정한 합성 수단으로 제한되지 않고, 천연 공급원으로부터 단리될 수 있는 천연 발생 항체 뿐만 아니라, "재조합" 수단에 의해 제조된 조작된 항체 분자, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자 또는 그로부터 제조된 하이브리도마에 대해 트랜스제닉인 트랜스제닉 동물로부터 단리된 항체, 항체의 발현을 일으키는 핵산 구축물로 형질전환된 숙주 세포로부터 단리된 항체, 파지 디스플레이 라이브러리를 비롯한 조합 항체 라이브러리로부터 단리되거나 또는 화학적으로 합성된 (예를 들어, 고체 상 단백질 합성) 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, "항체"는 포유동물 면역글로불린이다. 일부 실시양태에서, 항체는 결합 및 이펙터 기능을 제공하는 가변 및 불변 도메인을 포함하는 "전장 항체"이다. 대부분의 경우, 전장 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하고, 각각의 경쇄는 가변 영역 및 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서 용어 "전장 항체"는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하는 통상적인 IgG 면역글로불린 구조체를 지칭하기 위해 사용되며, 각각의 경쇄는 가변 영역 및 불변 영역을 포함하고, 결합 및 이펙터 기능을 제공한다. 용어 항체에는 하기에 더욱 상세하게 기재되는 바와 같이 작용 기간을 연장시키기 위한 변형, 예컨대 융합 단백질 또는 중합체에 대한 접합 (예를 들어 PEG화)을 포함하는 항체 접합체가 포함된다.

[0117] 생물학적 샘플: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 샘플" 또는 "샘플"은 대상체로부터 수득되거나 또는 유래된 샘플을 지칭한다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 체액, 혈액, 전혈, 혈장, 혈청, 점액 분비물, 타액, 뇌척수액 (CSF), 기관지폐포 세척액 (BALF), 안구 유체 (예를 들어, 유리체액, 수양액), 림프액, 림프절 조직, 비장 조직, 골수, 및 이들 조직 중 하나 이상으로부터 유래된 면역글로불린 강화된 분획으로 이루어진 균으로부터 선택된 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 동일한 IL2 뮤테인에 대한 반복된 노출과 같이 IL2 뮤테인의 제약 제제를 비롯한 치료적 치료 요법에 노출된 대상체로부터 수득된다. 다른 실시양태에서, 샘플은 IL2 뮤테인에 최근에 노출된 적이 없는 대상체로부터 수득되거나 또는 IL2 뮤테인의 계획된 투여 전에 대상체로부터 수득된다.

[0118] "CAR" 또는 "키메라 항원 수용체": 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항원 수용체" 및 "CAR"은 아미노산에서 카르복시 말단으로 하기 순서로 배열된 다중 기능적 도메인을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용되며: (a) 항원 결합 도메인 (ABD) 및 "힌지" 도메인을 포함하는 세포외 도메인 (ECD), (b) 막횡단 도메인 (TD); 및 (c) 하나 이상의 세포질 신호전달 도메인 (CSD), 여기서 상기 도메인은 임의적으로

하나 이상의 스페이스 도메인에 의해 연결될 수 있다. CAR은 또한 번역 후 가공 동안에, 및 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 세포의 세포 표면 상에 CAR의 제시 동안에 통상적으로 제거되는 신호 펩티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. CAR은 관련 기술분야에 널리 공지된 원리에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, Eshhar 등의 미국 특허 번호 7,741,465 B1 (2010년 6월 22일 허여됨); 문헌 [Sadelain, et al. (2013) Cancer Discovery 3(4):388-398]; Campana 및 Imai의 미국 특허 번호 8,399,645 (2013년 3월 19일 허여됨) 문헌 [Jensen and Riddell (2015) Current Opinions in Immunology 33:9-15; Gross, et al. (1989) PNAS(USA) 86(24):10024-10028; Curran, et al. (2012) J Gene Med 14(6):405-15]; Brogdon 등의 미국 특허 번호 10,174,095 (2019년 1월 8일 허여됨) 문헌 [Guedan, et al. (2019) Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors (2019) Molecular Therapy: Methods & Clinical Development Vol. 12: 145-156]을 참조한다.

[0119] CAR-T 세포: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항원 수용체 T-세포" 및 "CAR-T 세포"는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 재조합적으로 변형된 T-세포를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상업적으로 입수가능한 CAR-T 세포 생성물의 예에는 약시캅타진 실로류셀 (길리어드 파마슈티컬즈(Gilead Pharmaceuticals)로부터 상업적으로 입수가능한 예스카르타(Yescarta)®로 판매됨) 및 티사젠레클류셀 (노바티스(Novartis)로부터 상업적으로 입수가능한 킴리아(Kymriah)®로 판매됨)이 포함된다.

[0120] CD25: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CD25", "IL2 수용체 알파", "IL2R α ", "IL2Ra" 및 "p55"는 활성화에 대한 반응으로 Treg 세포에서 구성적으로 발현되고 다른 T 세포에서 유도적으로 발현되는 55 kD 폴리펩티드를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다 (예를 들어 CD3CD25는 또한 문헌에서 "저친화도" IL2 수용체로 지칭됨). 인간 CD25 핵산 및 단백질 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호 NM_000417 및 NP_000408로서 확인될 수 있다. 인간 CD25는 251개 아미노산의 성숙한 단백질이 되도록 번역 후 제거되는 21개 아미노산의 신호 서열을 포함하는 272개 아미노산의 전구-단백질로서 발현된다. 아미노산 22-240 (성숙한 단백질의 아미노산 1-219)은 세포외 도메인에 상응한다. 아미노산 241-259 (성숙한 단백질의 아미노산 220-238)는 막횡단 도메인에 상응한다. 아미노산 260-272 (성숙한 단백질의 아미노산 239-251)는 세포내 도메인에 상응한다. 성숙한 형태의 hCD25의 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
ELCDDDFPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCCQ
CTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLFGHCREPPPPWENEATERIYH
FVVGQMVVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA
SPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTW
QRRQRKSRRTI (Sequence ID No. 2)
```

[0121]

[0122] CD122: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CD122", "인터류킨-2 수용체 베타", "IL2R β ", "IL2R β ", "IL15R β " 및 "p70-75"는 인간 CD122 막횡단 단백질을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 인간 CD122 (hCD122)는 551개 아미노산의 단백질로서 발현되고, 신호 서열을 포함하는 처음 26개 아미노산은 성숙한 525개 아미노산의 단백질에서 번역 후 절단된다. 아미노산 27-240 (성숙한 단백질의 아미노산 1-214)은 세포외 도메인에 상응하고, 아미노산 241-265 (성숙한 단백질의 아미노산 225-239)는 막횡단 도메인에 상응하고, 아미노산 266-551 (성숙한 단백질의 아미노산 240-525)은 세포내 도메인에 상응한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 CD122에는 S57F 및 D365E (성숙한 hCD122 단백질에 따라 넘버링됨)를 포함하는 CD122 단백질의 천연 발생 변이체가 포함된다. hCD122는 유니프루트케이비 데이터베이스에서 항목 P14784로 참조된다. 인간 CD122 핵산 및 단백질 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호 NM_000878 및 NP_000869로서 확인될 수 있다. 성숙한 hCD122 단백질의 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
AVNGTSQFTCFYNSTRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLFVSQASWAC
NLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMLAPISLQVVHVETH
RCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEF
QVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLVLGSLGAFGFIILVYLLIN
CRNTGFWLKKVLKCNTPDPSPKFFSLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLE
VLERDKVTQQLLLQDKVPEPASLSSNHSLSCTFTNQGYFFHLPDALEIEACQVYFTYDF
YSEEDPDEGVAGAPTGSPPQLPLSGEDDAYCTFPPSRDLLLLFSPSLGPGSPSPSTAPG
SGGAGEERMPPSLQERVRDWDPPQLPGPPTPGVFDLVDFQPPPELVLRREAGEEVPDAGPR
EGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV
(SEQ ID NO. 3)
```

[0123]

[0124] 그리고, hCD122의 세포외 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:

AVNGTSQFTCFYNSTRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWAC
NLILGAPDSQKLTFTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVETH
RCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTPTDQYEF
QVRVKPLQGEFTTWSQPLAFRTKPAALGKDT (SEQ ID NO. 4)

[0125]

[0126] CD132: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CD132", "IL2 수용체 감마", "IL2Rg", "IL2R γ "는 유형 1 시토카인 수용체를 지칭하고, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL21에 대한 수용체 복합체에 의해 공유되고, 따라서 "공통" 감마 채로 지칭된다. 인간 CD132 (hCD132)는 22개 아미노산의 N-말단 신호 서열을 포함하는 369개 아미노산의 전구-단백질로서 발현된다. 아미노산 23-262 (성숙한 단백질의 아미노산 1-240)는 세포외 도메인에 상응하고, 아미노산 263-283 (성숙한 단백질의 아미노산 241-262)은 21개 아미노산의 막횡단 도메인에 상응하고, 아미노산 284-369 (성숙한 단백질의 아미노산 262-347)는 세포내 도메인에 상응한다. hCD132는 유니프룻케이비 데이터베이스에서 항목 P31785로 참조된다. 인간 CD132 핵산 및 단백질 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호: NM_000206 및 NP_000197로서 확인될 수 있다. 성숙한 hCD132 단백질의 아미노산 서열은 다음과 같다:

LNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDLSVSTLPLPEVQCFVENVEYMNCTWNSSEPPQ
TNLTLYHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEETSGCQLQKKEIHLVQTFVVQLQDPREPRRQA
TQMLKLQNLVIPWAPENLTLLKLSSESQLELNWNFLNHCLEHLVQYRTDWDHDSWTEQSV
DYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNPLCGSAQHWSEWSHPHWSGNTSKENPFLFALEA
VVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ
PDYSERLCLVSEIIPKGGALGEGPGASPCNQHSPIYWAPPCTYTLKPET (SEQ ID NO. 5)

[0127]

[0128] CDR: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"은 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 폴리펩티드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견되는 비-연속적인 항원 결합 부위를 의미하는 것으로 의도된다. CDR은 문헌 [Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, 문헌명 "Sequences of proteins of immunological interest" (1991) (본원에서 "카바트 1991" 또는 "카바트"로도 지칭됨); Chothia, et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 (본원에서 "코티아"로도 지칭됨); 및 MacCallum, et al. (1996) J. Mol. Biol. 262:732-745]에 기재되어 있으며, 여기서 정의는 서로에 대해 비교할 때 아미노산 잔기의 중첩 또는 하위 집합을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 그라프트된 항체 또는 그의 변이체의 CDR을 지칭하기 위한 정의의 적용은 본원에 정의 및 사용된 바와 같은 용어의 범주 내인 것으로 의도된다. 본 개시내용의 맥락에서, CDR 위치의 넘버링은 카바트 넘버링 규칙에 따라 제공된다.

[0129]

필적하는: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "필적하는"은 평가가능한 정량적인 또는 정성적인 파라미터의 두 측정치에서 차이의 정도를 기재하기 위해 사용된다. 예를 들어, 평가가능한 정량적인 파라미터의 제1 측정치 (예를 들어 CTLL-2 증식 또는 포스포-STAT5 검정에 의해 결정되는 IL2 활성의 수준) 및 평가가능한 파라미터의 제2 측정치가 숙련된 기술자에 의해 상황에서 두 결과 사이의 효과에서 통계적으로 유의한 차이를 생성하지 않는 것으로 인식되는 범위를 벗어나지 않는 경우, 두 측정치는 "필적하는" 것으로 고려된다. 일부 경우에, 한 측정치가 또 다른 것으로부터 30% 미만, 대안적으로 25% 미만, 대안적으로 20% 미만, 대안적으로 15% 미만, 대안적으로 10% 미만, 대안적으로 7% 미만, 대안적으로 5% 미만, 대안적으로 4% 미만, 대안적으로 3% 미만, 대안적으로 2% 미만, 또는 1% 미만 벗어나는 경우, 측정치는 "필적하는" 것으로 고려될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 한 측정치가 기준 표준으로부터 15% 미만, 대안적으로 10% 미만, 또는 대안적으로 5% 미만 벗어나는 경우, 이는 기준 표준에 필적한다.

[0130]

보존적 아미노산 치환: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "보존적 아미노산 치환"은 생성된 단백질이 유사한 시험 시스템에서 모 폴리펩티드에 필적하는 활성을 보유하도록 하나의 아미노산 잔기가 또 다른 아미노산 잔기로 변화되는 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 야생형 IL2 아미노산 서열 내에 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 보존적 치환의 예는 문헌 [Dayhoff in The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978)] 및 [Argos in EMBO J., 8:779-785 (1989)]에 기재된 것들을 포함한다. 보존적 치환은 전형적으로 하기 표 3에 도시된 하기 차트에 따라 이루어진다:

표 3: 예시적인 보존적 아미노산 치환	
야생형 잔기	보존적 치환(들)
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu, Met, Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0131]

[0132]

기능 또는 면역학적 동일성의 실질적인 변화는 표 3에 나타난 것보다 덜 보존적인 아미노산 치환 ("비-보존적 아미노산 치환")을 선택함으로써 이루어질 수 있다. 비-보존적 아미노산 치환의 예는 폴리펩티드 백본의 구조에 유의하게 영향을 미치거나 또는 2차 또는 3차 요소를 파괴하는 치환, 예컨대 큰 하전된 벌키 측쇄 (예를 들어, 아스파라긴)를 갖는 작은 비하전 측쇄 (예를 들어, 글리신)를 갖는 아미노산의 치환이다.

[0133]

로부터 유래된: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "로부터 유래된"은, 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 맥락에서 (예를 들어, IL2 폴리펩티드 "로부터 유래된" 아미노산 서열), 폴리펩티드 또는 핵산이 기준 폴리펩티드 또는 핵산 (예를 들어, 천연 발생 IL2 폴리펩티드 또는 IL2-코딩 핵산)의 것을 기반으로 하는 서열을 가짐을 나타내는 것을 의미하고, 단백질 또는 핵산이 제조되는 공급원 또는 방법으로 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 용어 "로부터 유래된"에는 기준 아미노산 또는 DNA 서열의 상동체 또는 변이체가 포함된다.

[0134]

유효 농도 (EC): 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유효 농도" 또는 그의 약어 "EC"는 시험 시스템에서 주어진 파라미터에서 반응을 일으키는데 충분한 양의 작용제 (예를 들어, hIL2 뮤테인)의 농도를 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용된다. 약어 "E"는 시험 시스템이 시험 작용제에 노출될 때 시험 시스템에서 관찰되는 주어진 생물학적 효과의 크기를 지칭한다. 반응의 크기가 시험 작용제의 농도 ("C")의 인자로서 표현되는 경우에, 약어 "EC"가 사용된다. 생물학적 시스템과 관련하여, 용어 E_{max}는 활성화 시험 작용제의 포화 농도에 대한 반응으로 관찰되는 주어진 생물학적 효과의 최대 크기를 지칭한다. 약어 EC가 아래첨자로 제공되는 경우에 (예를 들어, EC₄₀, EC₅₀ 등), 아래첨자는 그 농도에서 관찰된 생물학적 물질의 E_{max}의 백분율을 지칭한다. 예를 들어, 시험 시스템에서 이러한 시험 작용제에 대한 반응으로 이러한 측정가능한 생물학적 파라미터의 최대 수준의 30%인 측정가능한 생물학적 파라미터의 유도를 유발하기에 충분한 시험 작용제의 농도는 이러한 생물학적 파라미터에 대해 시험 작용제의 "EC₃₀"로 지칭된다. 유사하게, 용어 "EC₁₀₀"은 이러한 작용제에 대한 반응으로 측정가능한 파라미터의 최대 (100%) 반응을 유발하는 작용제의 유효 농도를 나타내기 위해 사용된다. 유사하게, 용어 EC₅₀ (이는 약역학 분야에서 통상적으로 사용됨)은 측정가능한 파라미터에서 반수-최대 (50%) 변화를 유발하기에 충분한 작용제의 농도를 지칭한다. 용어 "포화 농도"는 온도 및 압력의 표준 조건 하에 표준 부피의 특정 용매 (예를 들어, 물) 중에 용해될 수 있는 시험 작용제의 최대 가능한 양을 지칭한다. 약역학에서, 약물의 포화 농도는 전형적으로 모든 이용가능한 수용체가 약물에 의해 점유되기에 충분한 약물의 농도를 나타내기 위해 사용되고, EC₅₀은 반수-최대 효과를 제공하는 약물 농도이다. 특정 유효 농도의 시험 작용제의 EC는 특정 파라미터 및 시험 시스템과 관련하여 추약될 수 있다. 예를 들어, CD25+ T-세포에서 STAT5 인산화의 최대 수준의 50%를 유도하는 IL2 뮤테인의 농도는 문맥에 따라 "EC₅₀^{pSTAT5-CD25+}" 또는 유사한 것으로 약칭될 수 있다. E_{max}는 측정되는 파라미터 (예를 들어, pSTAT5 유도, 증식), 시험 작용제 (예를 들어, 특정 IL2 뮤테인, 예컨대 하기 기재된

"REH") 및 시험 시스템 (예를 들어, CD25+ 인간 T 세포, 인간 CD25-세포, 1차 인간 T 세포)의 인자이기 때문에, Emax 및 특정 백분율의 Emax를 생성하기에 충분한 시험 작용제의 농도 (예를 들어, EC₂₀, EC₅₀ 등)의 결정은 특정 시험 시스템에서 실험적으로 결정될 수 있다. 일부 경우에, 분자에 대해 확립된 생물학적 활성의 표준화된 허용 척도가 존재한다. 예를 들어 hIL2 효력과 관련하여, 국제 단위 (IU)의 hIL2 효력의 평가를 위한 표준 방법론은 문헌 [Wadhwa, et al. (2013) "The 2nd International standard for Interleukin-2 (IL2) Report of a collaborative study" Journal of Immunological Methods 397:1-7]에 보다 완전히 기재된 바와 같은 표준화된 절차에 따라 뮤린 세포독성 T 세포주 CTLL-2에서 측정된다. 본 개시내용의 문맥에서 뮤린 IL2 수용체는, 특히 세포내 신호 전달 (예를 들어 STAT5 인산화)을 제공하기 위한 삼량체 수용체 복합체의 모든 성분에 대한 필요성과 관련하여, 인간 IL2 수용체와 상이하게 기능한다는 것을 주목해야 한다. 예를 들어, 문헌 [Horta, et al., (2019) "Human and murine IL2 receptors differentially respond to the human-IL2 component of immunocytokines" Oncoimmunology 8(6):e1238538-1, e1238538-15 및 Nemoto, et al. (1995) "Differences in the interleukin-2 (IL2) receptor system in human and mouse: alpha chain is require for formation of the functional mouse IL2 receptor" European J Immunology 25(11):3001-5]을 참조한다. 결과적으로, 특히 CD25에 대한 선택성에 관하여 본 개시내용의 hIL2 뮤테인의 활성을 평가할 때, 인간 저, 중간 및 고 친화도 IL2 수용체 및 수용체 복합체의 생물학을 재현하는 인간 세포 또는 시스템의 사용이 바람직하고, 뮤린 시험 시스템 (예를 들어 뮤린 세포를 사용하는 시험관내 시험 시스템 또는 마우스에서 생체내)에서 선택적 결합 또는 활성화를 나타내는 분자는 인간 시스템 (예를 들어 인간 세포를 사용하는 시험관내 시험 시스템 또는 인간 대상체에서 생체내)에서 이러한 선택적 활성을 재현하지 않을 수 있다.

[0135] **EC 증식:** 용어 "CD3 활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 유도하기에 충분한 유효 농도" (본원에서 "EC^{PRO}"로 약칭됨)는 관련 기술분야의 표준 프로토콜의 교시에 따라 결정할 때 CD3 활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 유도하기에 충분한 IL2 뮤테인의 유효 농도를 의미한다. CD3 활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 평가하기 위한 이러한 표준 프로토콜의 예는 문헌 [Crouch, et al. (1993) "The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity" J. Immunol. Methods 160: 81-8]에 기재된 바와 같이 배양물에 존재하는 세포의 수에 정비례하는 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 신호를 생성하는 생물발광 검정, 또는 표준화된 상업적으로 입수가 가능한 검정 시스템, 예컨대 실질적으로 각각 제조업체에 의해 제공된 지침에 따라 카탈로그 번호 G9241 및 G9681로서 프로메가 코포레이션(Promega Corporation, 위스콘신주 53711 매디슨주 우즈 홀 로드 2800)으로부터 상업적으로 입수가 가능한 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)® 2.0 세포 생존율 검정 또는 셀타이터-글로® 3D 세포 생존율 키트를 포함한다. 약어 EC^{PRO}가 아래첨자로 사용된 경우에, 이는 주어진 시험 프로토콜에 의해 측정된 바와 같이 시험 작용제에 대한 반응으로 최대 1차 인간 T 세포 증식의 표시된 백분율을 유도하기에 충분한 시험 작용제의 농도를 나타내기 위해 제공된다. 예시로서, 약어 EC₃₀^{PRO}는 셀타이터-글로® 2.0 세포 생존율 검정에 의해 측정된 바와 같이, hIL2 뮤테인과 관련하여 상기 IL2 뮤테인에 대한 반응으로 CD3 활성화된 1차 인간 T-세포의 최대 증식 수준의 30%와 연관된 농도를 나타내기 위해 사용될 수 있다.

[0136] **EC 활성화:** 용어 "T-세포의 활성화를 유도하기에 충분한 유효 농도" (본원에서 "EC^{ACT}"로 약칭됨)는 인간 T-세포의 활성화 및/또는 분화를 유도하기에 충분한 IL2 뮤테인의 유효 농도를 지칭한다. T-세포 활성화를 측정하기 위한 평가가능한 파라미터는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 시험 작용제의 투여에 반응한 T-세포의 활성화 수준은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 따라 STAT5 인산화의 수준에 의해 결정된 바와 같은 유동 세포측정 방법에 의해 결정될 수 있다. STAT5 인산화는 문헌 [Horta, et al., 상기 문헌], [Garcia, et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같은 유동 세포측정 기술, 또는 상업적으로 입수가 가능한 키트, 예컨대 포스포-STAT5 (Tyr694) 키트 (퍼킨-엘머/시스바이오(Perkin-Elmer/cisbio; 매사추세츠주 월섬)로부터 파트 번호 64AT5PEG로서 상업적으로 입수가 가능함)를 사용하여 실질적으로 제조업체의 교시에 따라 측정될 수 있다. 약어 EC^{ACT}가 아래첨자로 사용된 경우에, 이는 시험 프로토콜에 따라 측정된 바와 같이 시험 작용제의 적용에 대한 반응으로 T 세포에서 최대 STAT5 인산화의 표시된 백분율을 유도하기에 충분한 시험 작용제의 농도를 나타내기 위해 제공된다. 예시로서, 약어 EC₃₀^{PRO}는 이로 측정된 바와 같이, hIL2 뮤테인에 대해 상기 IL2 뮤테인에 대한 반응으로 T 세포에서의 최대 증식 수준의 30%와 연관된 농도를 나타내기 위해 사용될 수 있다.

[0137] **농축된:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "농축된"은 관심 종 (예를 들어, 분자 또는 세포)이 (a) 출발 샘플, 예컨대 생물학적 샘플 (예를 들어, 분자가 천연 발생하거나 또는 투여 후에 존재하는 것인 샘플)에서 종의 농도보다 더 높은 (예를 들어, 적어도 3배 더 높은, 대안적으로 적어도 5배 더 높은, 대안적으로 적어도 10배 더 높은

은, 대안적으로 적어도 50배 더 높은, 대안적으로 적어도 100배 더 높은, 또는 대안적으로 적어도 1000배 더 높은) 농도로 존재하거나; 또는 (b) 분자가 제조된 환경보다 더 높은 농도로 (예를 들어, 제조합적으로 변형된 박테리아 또는 포유동물 세포) 존재하도록 샘플이 비천연적으로 조작되는 것을 지칭한다.

[0138] 세포의 도메인: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포의 도메인" 또는 그의 약어 "ECD"는 세포의 원형질막 외부에 있는 세포 표면 단백질 (예를 들어, 세포 표면 수용체)의 부분을 지칭한다. 세포 표면 단백질은 막형 단백질, 세포 표면 또는 막 회합된 단백질일 수 있다.

[0139] 동일성: 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리펩티드 또는 DNA 서열과 관련하여 용어 "동일성"은 두 분자 사이의 서브유닛 서열 동일성을 지칭한다. 두 분자에서 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛 (즉, 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드)에 의해 점유되면, 분자는 해당 위치에서 동일하다. 두 아미노산 또는 두 뉴클레오티드 서열 사이의 유사성은 동일한 위치의 개수의 직접적인 함수이다. 일반적으로, 가장 높은 순서 매칭이 수득되도록 서열을 정렬시킨다. 필요한 경우, 동일성은 공개된 기술 및 광범위한 입수가 가능한 컴퓨터 프로그램, 예컨대 GCS 프로그램 패키지 (Devereux, et al., (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, et al. (1990) *J. Molecular Biol.* 215:403-410)를 사용하여 계산될 수 있다. 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하는데 적합한 알고리즘은 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이며, 이는 문헌 [Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 및 Altschul et al. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 먼저 국립 생물 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 웹사이트를 통해 공개적으로 이용가능하다. 상기 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 워드와 정렬될 때 일부 양의 임계값 점수 "T"와 매칭되거나 또는 그를 충족시키는 쿼리 서열의 길이 W의 짧은 워드를 확인함으로써 높은 점수 서열 쌍 (HSP)을 확인하는 것을 수반한다. T는 이웃 워드 점수 임계값으로 지칭된다 (Altschul et al., 상기 문헌). 이들 초기 이웃 워드 히트는 그를 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위해 검색을 개시하기 위한 시드로서 작용한다. 이어서, 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한, 워드 히트를 각각의 서열을 따라 양 방향으로 연장시킨다. 누적 점수는 뉴클레오티드 서열의 경우 파라미터 "M" (매칭 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 >0) 및 "N" (미스매칭 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 <0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 평점 매트릭스를 사용하여 누적 점수를 계산한다. (a) 누적 정렬 점수가 그의 최대 달성 값으로부터 X 양만큼 떨어지거나; 하나 이상의 음의 점수 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 점수가 0 이하로 가거나; 또는 (b) 서열의 말단에 도달할 때, 각각의 방향에서 워드 히트의 연장이 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 "W", "T", 및 "X"는 알고리즘의 민감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열의 경우)은 유사하게 기능하지만 디폴트로서 28의 워드 크기 ("W"), 10의 기대값 ("E"), M=1, N=-2, 및 두 가닥의 비교를 이용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 워드 크기 (W), 10의 기대값 (E), 및 BLOSUM62 평점 매트릭스를 이용한다 (문헌 [Henikoff & Henikoff, (1989) *PNAS(USA)* 89:10915-10919] 참조).

[0140] IL2: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인터류킨-2" 또는 "IL2"는 IL2 활성을 갖는 천연 발생 IL2 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, IL2는 성숙한 야생형 인간 IL2를 지칭한다. 성숙한 야생형 인간 IL2 (hIL2)는 문헌 [Fujita, et al., *PNAS USA*, 80, 7437-7441 (1983)]에 기재된 바와 같이 133개 아미노산의 성숙한 폴리펩티드 (추가 20개 N-말단 아미노산으로 구성되는 신호 펩티드가 더 적음)로서 발생한다.

[0141] 본원에서 사용된 바와 같이, hIL2 뮤테인의 잔기의 넘버링은 서열식별번호: 1의 것과 동일한 신호 펩티드를 제외하고 hIL2 서열 유니프록 ID P60568을 기반으로 한다. 성숙한 야생형 인간 IL2 (hIL2)의 천연 발생 변이체의 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
AFTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO: 1)
```

[0142]

[0143] IL2 활성: 용어 "IL2 활성"은 세포와 유효량의 IL2 폴리펩티드의 접촉에 대한 반응으로 세포에 대한 하나 이상의 생물학적 효과를 지칭한다. IL2 활성은 예를 들어 실질적으로 [Gearing, A.J.H. and C.B. Bird (1987) in *Lymphokines and Interferons, A Practical Approach*. Clemens, M.J. et al. (eds): IRL Press. 295]의 교시 내용에 따라 CTLL-2 마우스 세포독성 T 세포를 이용하는 세포 증식 검정에서 측정될 수 있다. 제조합 인간 IL2 (rhIL2)의 특이적인 활성은 대략 2.1×10^4 IU/ μ g이며, 이는 제조합 인간 IL2 WHO 국제 표준 (NIBSC 코드: 86/500)에 대해 보정된다. 일부 실시양태에서, IL2 활성의 수준은 관련 기술분야에 공지된 유효 세포측정 방법에 의해 결정될 수 있는 STAT5 인산화 수준으로서 표현될 수 있다.

- [0144] IL-2 뮤테인: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IL2 뮤테인"은 IL2 분자의 아미노산 서열에 대한 변형을 포함하는 IL2의 천연 발생 형태로부터 유래된 뮤테인을 지칭한다. IL2 뮤테인은 천연의 모 IL2 폴리펩티드쇄의 하나 이상의 부위에서 또는 다른 잔기에서 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 IL2 뮤테인은 비교가능한 검정에서 유사한 농도에서 평가할 때 WHO 국제 표준 (NIBSC 코드: 86/500) 야생형 성숙한 인간 IL2의 활성에 필적하는 CD122 결합 활성을 유지한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.
- [0145] 반응을 일으키는데 충분한 양으로: 본원에서 사용된 바와 같이, 문구 "반응을 일으키는데 충분한 양으로"는 시험 작용제를 시험 시스템에 적용하기 전 (예를 들어, 기준선 수준)과 후에 측정된 지표의 수준의 검출가능한 변화를 제공하는데 충분한 시험 작용제의 양과 관련하여 사용된다. 일부 실시양태에서, 시험 시스템은 세포, 조직 또는 유기체이다. 일부 실시양태에서, 시험 시스템은 시험관내 시험 시스템, 예컨대 형광 검정이다. 일부 실시양태에서, 시험 시스템은 시험 작용제를 세포, 조직 또는 유기체에 적용하기 전 및 후에 생물학적 기능을 반영하는 세포, 조직 또는 유기체의 파라미터 수준의 변화를 측정하는 것을 포함하는 생체내 시스템이다. 일부 실시양태에서, 지표는 소정량의 시험 작용제의 투여에 반응한 검정에서 평가된 세포의 생물학적 기능 또는 발생 상태를 반영한다. 일부 실시양태에서, 시험 시스템은 1종 이상의 시험 작용제를 세포, 조직 또는 유기체에 적용하기 전 및 후에 생물학적 상태를 반영하는 세포, 조직 또는 유기체의 지표 수준의 변화를 측정하는 것을 포함한다. 용어 "반응을 일으키는데 충분한 양으로"는 치료 유효량이 되기에 충분할 수 있지만, 치료 유효량보다 많거나 적을 수도 있다.
- [0146] 치료를 필요로 하는: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료를 필요로 하는"은 대상체가 치료를 필요로 하거나 또는 그로부터 잠재적으로 이익을 얻을 것이라고 대상체에 대해 의사 또는 다른 간병인에 의해 이루어지는 판단을 지칭한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 인자를 기반으로 한다.
- [0147] 예방을 필요로 하는: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "예방을 필요로 하는"은 대상체가 예방적 처치를 필요로 하거나 또는 그로부터 잠재적으로 이익을 얻을 것이라고 대상체에 대해 의사 또는 다른 간병인에 의해 이루어지는 판단을 지칭한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 인자를 기반으로 한다.
- [0148] 억제제: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "억제제"는 예를 들어 유전자, 단백질, 리간드, 수용체, 또는 세포를 감소시키거나, 차단하거나, 방지하거나, 활성화를 지연시키거나, 불활성화시키거나, 탈민감화시키거나 또는 하향조절하는 분자를 지칭한다. 억제제는 또한 세포 또는 유기체의 구성적 활성을 감소시키거나, 차단하거나 또는 불활성화시키는 분자로서 정의될 수 있다.
- [0149] 단리된: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단리된"은 천연 발생하는 경우 천연 발생할 수 있는 것과는 상이한 환경에 있는 관심 폴리펩티드와 관련하여 사용된다. "단리된"은 관심 폴리펩티드에 대해 실질적으로 농축된 및/또는 관심 폴리펩티드가 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 샘플 내에 있는 폴리펩티드를 포함하는 것을 의미한다. 폴리펩티드가 천연 발생하지 않는 경우, "단리된"은 폴리펩티드가 합성된 환경으로부터 분리된 것, 예를 들어 폴리펩티드를 발현하도록 조작된 세포를 포함하는 재조합 세포 배양물로부터 또는 고체 상 합성 수단으로부터 생성된 용액에 의해 단리된 것을 나타낸다.
- [0150] 카바트 넘버링: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "카바트 넘버링"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 영역에서 다른 아미노산 잔기에 비해 더 가변적인 아미노산 잔기 (예를 들어, 초가변 잔기)를 넘버링하는 시스템을 지칭하기 위해 항체 조작 분야에서 인식되는 용어이다 (Kabat, et al., (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93; Kabat, et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). 본 개시내용의 목적을 위해, 본원에 개시된 항체의 가변 영역에서 CDR의 위치는 카바트 넘버링 또는 간단히 "카바트"를 따른다.
- [0151] 전이: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "전이"는 원발성 종양으로부터 주위 조직 및 원위 기관으로의 암 세포의 확산을 기재한다.
- [0152] 리간드: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "리간드"는 수용체에 특이적으로 결합하고 수용체의 활성 또는 수용체를 발현하는 세포에서의 반응의 변화를 일으키도록 수용체의 변화를 유발하는 분자를 지칭한다. 한 실시양태에서, 용어 "리간드"는 수용체의 효능제 또는 길항제로서 작용할 수 있는 분자 또는 그의 복합체를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "리간드"는 천연 및 합성 리간드를 포괄한다. "리간드"는 또한 소분자, 시토키인 및 항체의 펩티드 유사체를 포괄한다. 리간드 및 수용체의 복합체는 "리간드-수용체 복합체"로 명명된다. 리간드는 폴리단백질 또는 융합 단백질의 하나의 도메인 (예를 들어, 항체/리간드 융합 단백질의 도메인)을 포

합할 수 있다. 리간드 및 수용체의 복합체는 "리간드-수용체 복합체"로 명명된다.

[0153] 변형된 IL2 뮤테인: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형된 IL2 뮤테인"은 하나 이상의 추가의 변형 (즉, hIL2 뮤테인의 코어 아미노산 서열 이외의 변형), 예컨대 PEG화, 글리코실화 (N- 및 O-연결), 아실화 또는 폴리시알릴화를 포함하거나, 또는 혈청 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 소 혈청 알부민 (BSA)을 포함하는 알부민 융합 폴리펩티드, 또는 Fc-융합 단백질 또는 표적화 모이어티를 갖는 것, 예컨대 IL2 직교식 폴리펩티드 융합 단백질을 포함하는 IgG, 표적화된 IL2 뮤테인 폴리펩티드, 예컨대 ScFv-IL2 뮤테인 폴리펩티드 융합 단백질 및 VHH-IL2 뮤테인 폴리펩티드 융합 단백질을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 폴리펩티드 담체 분자와의 접합 (화학적 또는 융합 단백질로서)을 포함하는 IL2 뮤테인을 지칭하기 위해 사용된다. 변형된 IL2 뮤테인은 하나 이상의 성질을 증강시키기 위해, 예를 들어 면역원성을 조정하기 위해; 수용성, 생체이용률, 혈청 반감기, 및/또는 치료 반감기를 증가시키는 방법; 및/또는 생물학적 활성을 조정하기 위해 제조될 수 있다. 특정한 변형은 또한 예를 들어 검출 검정에서 사용하기 위한 항체를 생성하는데 (예를 들어, 에피토프 태그), 단백질 정제의 용이성을 제공하는데 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL2 뮤테인은 서열식별번호: 1과 적어도 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일하며, 표 4에 제시된 바와 같이 서열식별번호: 1에 대해 3가지 변형의 조합 중 하나를 갖는다.

[0154] 조정하다: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조정하다", "조정" 등은 생물학적 시스템 또는 생화학적 경로를 비롯한 시스템에서 양성으로 또는 음성으로 또는 직접적으로 또는 간접적으로 반응에 영향을 미치는 시험 작용제의 능력을 지칭한다. 용어 조정제는 효능제 (부분 효능제, 완전 효능제 및 과효능제 포함) 및 길항제 둘 다를 포함한다.

[0155] 뮤테인: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "뮤테인"은 폴리펩티드의 일차 구조 (즉, 아미노산 서열)에 대한 변형을 포함하는 야생형 폴리펩티드의 변형된 버전을 지칭하기 위해 사용된다. 용어 뮤테인은 폴리펩티드 자체, 폴리펩티드, 또는 그를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물을 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뮤테인 폴리펩티드는 모 폴리펩티드에 비해 약 1 내지 약 10개 아미노산 변형, 대안적으로 모 폴리펩티드에 비해 약 1 내지 약 5개 아미노산 변형, 대안적으로 모 폴리펩티드에 비해 약 1 내지 약 3개 아미노산 변형, 대안적으로 모 폴리펩티드에 비해 1 내지 2개 아미노산 변형, 대안적으로 모 폴리펩티드에 비해 단일 아미노산 변형을 포함한다. 뮤테인은 모 폴리펩티드와 적어도 약 99% 동일한, 대안적으로 적어도 약 98% 동일한, 대안적으로 적어도 약 97% 동일한, 대안적으로 적어도 약 95% 동일한, 또는 대안적으로 적어도 약 90% 동일할 수 있다.

[0156] N-말단: 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리펩티드 구조의 맥락에서, "N-말단" (또는 "아미노 말단") 및 "C-말단" (또는 "카르복실 말단")은 각각 폴리펩티드의 극단의 아미노 및 카르복실 말단을 지칭하는 반면에, 용어 "N-말단" 및 "C-말단"은 각각 N-말단 및 C-말단을 향하는 폴리펩티드의 아미노산 서열에서의 상대적인 위치를 지칭하며, 각각 N-말단 및 C-말단의 잔기를 포함할 수 있다. "바로 N-말단" 또는 "바로 C-말단"은 제2 아미노산 잔기에 대한 제1 아미노산 잔기의 위치를 지칭하며, 제1 및 제2 아미노산 잔기는 공유 결합되어 연속 아미노산 서열을 제공한다.

[0157] 신생물성 질환: 본원에 사용되고 하기에 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 용어 "신생물성 질환"은 세포 과다 증식 또는 비조절된 (또는 조절이상) 세포 복제로부터 발생하는 대상체에서의 장애 또는 상태를 지칭한다. 용어 신생물성 질환은 대상체에서 신생물의 존재로부터 발생하는 장애를 지칭한다. 신생물은 (1) 양성 (2) 전악성 (또는 "전암성"); 및 (3) 악성 (또는 "암성")으로 분류될 수 있다. 용어 "신생물성 질환"은 신생물성 질환과 직접적으로 또는 간접적으로 연관된 상태를 지칭하는 신생물성-관련 질환, 장애 및 상태를 포함하고, 예를 들어 혈관신생 및 전암성 상태, 예컨대 이형성증 또는 무증상 다발성 골수종을 포함한다. 조절이상 세포 복제로부터 발생하는 양성 장애의 예는 비대성 반흔, 예컨대 켈로이드 반흔을 포함한다.

[0158] 핵산: 용어 "핵산", "핵산 분자", "폴리뉴클레오타이드" 등은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체성 형태인 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 그의 유사체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예에는 선형 및 원형 핵산, 메신저 RNA (mRNA), 상보성 DNA (cDNA), 재조합 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 프로브, 프라이머 등이 포함된다.

[0159] IL2에 따라 넘버링된: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IL2에 따라 넘버링된"은 아미노산이 성숙한 야생형 hIL2의 성숙한 서열에서 정상적으로 발생하는 위치와 관련하여 특정한 아미노산의 위치를 확인하는 것을 지칭하며, 예를 들어 R81은 서열식별번호: 1에서 발생하는 81 번째 아미노산인 아르기닌을 지칭한다.

[0160] 작동가능하게 연결된: 용어 "작동가능하게 연결된"은 본원에서, 작동가능한 연결이 구축물의 개별 성분의 활성

을 양성적으로 또는 음성적으로 조정시킬 수 있지만 성분 분자의 각각의 기능이 유지되도록 구축물 내에 배열된 분자, 전형적으로 폴리펩티드 또는 핵산 사이의 관계를 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, 야생형 단백질에 대한 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 분자의 작동가능한 연결은 단백질의 생물학적 활성이 야생형 분자에 비해 감소된 구축물을 생성할 수 있지만, 그럼에도 불구하고 둘은 작동가능하게 연결된 것으로 간주된다. 용어 "작동가능하게 연결된"이 상이한 기능을 코딩하는 다중 핵산 서열의 관계에 적용될 때, 다중 핵산 서열은 단일 핵산 분자로 조합될 때, 예를 들어 재조합 기술을 사용하여 세포 내로 도입될 때, 세포에서 특정한 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 수행할 수 있는 핵산을 제공한다. 예를 들어, 신호 서열을 코딩하는 핵산 서열은 그것이 전구단백질의 발현을 초래함으로써 신호 서열이 폴리펩티드의 분비를 용이하게 하는 경우에 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 것으로 간주될 수 있거나; 프로모터 또는 인핸서는 그것이 서열의 전사에 영향을 미치는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것으로 간주되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 그것이 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것으로 간주된다. 일반적으로, 핵산 분자와 관련하여, 용어 "작동가능하게 연결된"은 연결되는 핵산 서열이 인접하고, 분자의 분비 리더 또는 회합된 서브도메인의 경우에는 인접하고 리딩 상 내에 있음을 의미한다. 그러나, 특정 유전 요소, 예컨대 인핸서는 소정 거리에서 기능할 수 있고, 그의 효과를 제공하는 서열에 대해 인접할 필요는 없지만, 그럼에도 불구하고 작동가능하게 연결된 것으로 간주될 수 있다.

[0161] **모 폴리펩티드:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "모 폴리펩티드" 또는 "모 단백질"은 제1 "모" 폴리펩티드와 관련하여 변형된 제2 폴리펩티드 (예를 들어, 유도체 또는 변이체)의 공급원을 지정하기 위해 상호교환가능하게 사용된다. 일부 경우에, 모 폴리펩티드는 단백질의 야생형 또는 천연 발생 형태이다. 일부 경우에, 모 폴리펩티드는 추가로 변형된 천연 발생 단백질의 변형된 형태일 수 있다. 용어 "모 폴리펩티드"는 폴리펩티드 자체 또는 모 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (예를 들어, 모 폴리펩티드를 포함하는 글리코실화 또는 PEG화 형태 및/또는 융합 단백질)을 지칭할 수 있다.

[0162] **부분 효능제:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "부분 효능제"는 주어진 수용체에 특이적으로 결합하여 그를 활성화시키지만, 완전 효능제에 비해서는 수용체를 부분적으로만 활성화시키는 분자를 지칭한다. 부분 효능제는 효능제 및 길항제 효과 둘 다를 나타낸다. 예를 들어 완전 효능제 및 부분 효능제 둘 다 존재하는 경우, 부분 효능제는 수용체 결합에 대해 완전 효능제와 경쟁함으로써 경쟁적 길항제로서 작용하여, 부분 효능제의 부재하에서 수용체와 완전 효능제의 접촉에 비해 수용체 활성화에서 순 감소를 일으킨다. 임상적으로, 부분 효능제는 부적절한 양의 내인성 리간드가 존재할 때 원하는 준최대 반응을 제공하기 위해 수용체를 활성화시키기 위해 사용될 수 있거나, 또는 이들은 과량의 내인성 리간드가 존재할 때 수용체의 과자극을 감소시킬 수 있다. 부분 효능제에 의해 생성된 최대 반응 (Emax)은 그의 고유 활성으로 지칭되며, 완전 효능제가 100% 반응을 생성하는 백분율 척도로 표현될 수 있다. 본 개시내용의 IL2 부분 효능제는 비교가능한 검정에서 유사한 농도에서 평가할 때 WHO 국제 표준 (NIBSC 코드: 86/500) 야생형 성숙한 인간 IL2의 활성의 10% 초과, 대안적으로 20% 초과, 대안적으로 30% 초과, 대안적으로 40% 초과, 대안적으로 50% 초과, 대안적으로 60% 초과, 또는 대안적으로 70% 초과, 대안적으로 10% 초과이지만 100% 미만, 대안적으로 20% 초과이지만 100% 미만, 대안적으로 30% 초과이지만 100% 미만, 대안적으로 40% 초과이지만 100% 미만, 대안적으로 50% 초과이지만 100% 미만, 대안적으로 60% 초과이지만 100% 미만, 대안적으로 70% 초과이지만 100% 미만, 대안적으로 80% 초과이지만 100% 미만, 또는 대안적으로 90% 초과이지만 100% 미만을 가질 수 있다.

[0163] **PEG-IL2 뮤테인:** 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "PEG-IL2 뮤테인"은 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 분자에 공유 결합된 IL2 뮤테인을 지칭하며, 적어도 하나의 PEG 분자는 IL2 뮤테인의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유 부착된다. PEG화 폴리펩티드는 추가로 IL2 뮤테인에 부착된 1, 2, 3개의 (또는 그 초과) PEG 모이어티를 포함하는 PEG-IL2 뮤테인을 나타내기 위해 각각 모노PEG화, 디PEG화, 트리PEG화 (등)으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, PEG는 IL2 뮤테인에 (예를 들어, 리신 측쇄, 시스테인의 술폰히드릴 기 또는 N-말단 아민을 통해) 직접적으로 공유 부착될 수 있거나, 또는 임의적으로 PEG와 IL2 뮤테인 사이에 링커를 이용할 수 있다. 일부 실시양태에서, PEG-IL2 뮤테인은 상이한 아미노산 잔기에 각각 부착된 1개 초과 PEG 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG-IL2 뮤테인은 서열식별번호: 1 (천연 발생 hIL2)로부터 유래된다. IL2의 PEG화 형태 및 IL2 폴리펩티드의 PEG화 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, Katre 등의 미국 특허 4,931,544 (1990년 6월 5일 허여됨); Katre 등의 미국 특허 5,206,344 (1993년 4월 27일 허여됨); 및 Bossard 등의 미국 특허 번호 9,861,705 (2018년 1월 9일 허여됨) 참조). 일부 실시양태에서, Ptacin 등의 미국 특허 출원 공보 US20170369871A1 (2017년 12월 28일 공개됨)에 기재된 바와 같이, 부위 특이적인 PEG화를 용이하게 하기 위해 비-천연 아미노산에 비-천연 발생 아미노산 측쇄를 도입시킴으로써 IL2 뮤테인을 변형시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, Greve 등의 PCT 국제 특허 출원 번호 PCT/US2015/044462 (2016년 2월 18일에

W02016/025385로 공개됨)에 기재된 바와 같이, 시스테인 측쇄를 통한 부위-특이적인 PEG화를 용이하게 하기 위해 IL2 분자 내의 다양한 위치에서 시스테인 잔기가 도입될 수 있다.

[0164] **폴리펩티드**: 본원에서 사용된 바와 같이, 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체성 형태를 지칭하고, 이는 유전적으로 코딩된 및 비-유전적으로 코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된 또는 유도체화된 아미노산, 및 변형된 폴리펩티드 백본을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 용어 폴리펩티드에는 이중성 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질; 이중성 및 상동성 리더 서열을 갖는 융합 단백질; N-말단 메티오닌 잔기가 있거나 없는 융합 단백질; 정제를 용이하게 하는 아미노산 서열, 예컨대 킬레이트화 펩티드를 갖는 융합 단백질; 면역학적으로 태그부착된 단백질을 갖는 융합 단백질; 면역학적으로 활성인 폴리펩티드 단편 (예를 들어 항원성 디프테리아 또는 파상풍 독소 또는 독소이드 단편)을 갖는 펩티드를 포함하는 융합 단백질 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 융합 단백질이 포함된다.

[0165] **예방하다**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "예방하다", "예방하는", "예방" 등은 일반적으로 유전적, 실험적 또는 환경적 요인으로 인해 특정한 질환, 장애 또는 상태를 가질 경향이 있는 대상체의 맥락에서 대상체의 질환, 장애, 상태 등의 발생 위험 (예를 들어 임상적 증상의 부재에 의해 결정됨)을 일시적으로 또는 영구적으로 방지하거나, 저해하거나, 억제하거나 또는 감소시키기 위해 또는 그의 개시를 지연시키기 위해 질환, 장애, 상태 또는 그의 증상의 개시 전에 대상체에 대해 개시되는 개시되는 작용 과정을 지칭한다. 특정 경우에, 용어 "예방하다", "예방하는", "예방"은 또한 질환, 장애 또는 상태가 현재 상태에서 더욱 해로운 상태로 진행되는 것을 늦추는 것을 지칭하기 위해 사용된다.

[0166] **수용체**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "수용체"는 리간드에 특이적으로 결합하는 도메인을 갖는 폴리펩티드를 지칭하며, 리간드 결합은 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 성질을 변화시킨다. 일부 실시양태에서, 수용체는 세포 표면과 회합하지 않는 "가용성" 수용체이다. hCD25의 가용성 형태는 hIL2에 특이적으로 결합하는 가용성 수용체의 예이다. 일부 실시양태에서, 수용체는 세포의 도메인 (ECD), 및 ECD를 세포 표면에 고정시키는 역할을 하는 막 회합된 도메인을 포함하는 세포 표면 수용체이다. 세포 표면 수용체의 일부 실시양태에서, 수용체는 세포내 도메인 (ICD), 및 전형적으로 막횡단 도메인 (TM)으로 지칭되는 막에 걸쳐 있는 도메인에 의해 연결된 세포외 도메인 (ECD)을 포함하는 막에 걸쳐 있는 폴리펩티드이다. 리간드와 수용체의 결합은 수용체의 형태를 변화시켜, 측정가능한 생물학적 효과를 일으킨다. 일부 경우에, 수용체가 ECD, TM 및 ICD를 포함하는 막에 걸쳐 있는 폴리펩티드인 경우, 리간드와 ECD의 결합은 리간드와 ECD의 결합에 대한 반응으로 ICD의 하나 이상의 도메인에 의해 매개되는 측정가능한 세포내 생물학적 효과를 일으킨다. 일부 실시양태에서, 수용체는 세포내 신호전달을 용이하게 하는 다성분 복합체의 성분이다. 예를 들어, 리간드는 임의의 세포내 신호전달 단백질과 연관된 세포 표면 분자에 결합할 수 있지만, 리간드 결합시 이중다량체성, 예컨대 이중이량체성 (예를 들어, 중간 친화도 CD122/CD132 IL2 수용체), 이중삼량체성 (예를 들어, 고친화도 CD25/CD122/CD132 hIL2 수용체) 또는 동중다량체성 (예를 들어, 동중이량체성, 동중삼량체성, 동중사량체) 복합체의 형성을 용이하게 하여, 세포내 신호전달 캐스케이드 (예를 들어, Jak/STAT 경로)를 활성화시킨다.

[0167] **재조합**: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합"은 폴리펩티드, 핵산 또는 세포를 재조합 DNA 기술을 사용하여 변형시키는 방법을 지칭하는 형용사로서 사용된다. "재조합 단백질"은 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 단백질이고, 단백질을 생성하는 방법을 나타내기 위해 단백질 명칭 앞에 소문자 "r"로 빈번하게 약칭된다 (예를 들어, 재조합적으로 생성된 인간 성장 호르몬은 통상적으로 "rhGH"로 약칭됨). 유사하게, 세포가 재조합 DNA 기술을 사용하여 외인성 핵산 (예를 들어, ssDNA, dsDNA, ssRNA, dsRNA, mRNA, 바이러스 또는 비-바이러스 벡터, 플라스미드, 코스미드 등)의 혼입 (예를 들어, 형질감염, 형질도입, 감염)에 의해 변형된 경우에 세포는 "재조합 세포"로 지칭된다. 재조합 DNA 기술을 위한 기술 및 프로토콜은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.

[0168] **반응**: 용어 "반응", 예를 들어 세포, 조직, 기관 또는 유기체의 "반응"은 평가가능한 생화학적 또는 생리학적 파라미터 (예를 들어, 농도, 밀도, 부착, 증식, 활성화, 인산화, 이동, 효소적 활성, 유전자 발현의 수준, 유전자 발현의 속도, 에너지 소비의 속도, 분화의 수준 또는 상태)에서의 정량적 또는 정성적 변화를 포괄하며, 여기서 변화는 외인성 작용제 또는 내부 메카니즘, 예컨대 유전적 프로그래밍에 의한 또는 그와 접촉시킨 활성화, 자극 또는 치료와 상관관계가 있다. 특정한 맥락에서, 용어 "활성화", "자극" 등은 내부 메카니즘에 의해서 뿐만 아니라 외부 또는 환경적 요인에 의해 조절되는 세포 활성화를 지칭하는 반면에; 용어 "억제", "하향조절" 등은 반대의 효과를 지칭한다. "반응"은 시험관내에서, 예컨대 검정 시스템, 표면 플라즈몬 공명, 효소 활성, 질량 분광분석법, 아미노산 또는 단백질 서열분석 기술의 사용을 통해 평가될 수 있다. "반응"은 객관적 생리학적 파라미터, 예컨대 체온, 체중, 중앙 부피, 혈압, X선 또는 다른 영상화 기술의 결과의 평가에 의해 정량적

으로 또는 웰빙, 우울증, 초조 또는 통증의 보고된 주관적 느낌의 변화를 통해 정성적으로 생체내 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD3 활성화된 1차 인간 T-세포의 증식 수준은 문헌 [Crouch, et al. (1993) J. Immunol. Methods 160: 81-8]에 기재된 바와 같이 배양물에 존재하는 세포의 수에 정비례하는 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 신호를 생성하는 생물발광 검정에서 또는 상업적으로 입수가 가능한 검정, 예컨대 실질적으로 제조업체에 의해 제공된 지침에 따라 프로메가 코포레이션 (위스콘신주 53711 매디슨)으로부터 카탈로그 번호 G9241 및 G9681로서 상업적으로 입수가 가능한 셀타이터-글로® 2.0 세포 생존을 검정 또는 셀타이터-글로® 3D 세포 생존을 키트의 사용을 통해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시험 작용제의 투여에 반응한 T 세포의 활성화 수준은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 따라 STAT (예를 들어, STAT1, STAT3, STAT5) 인산화의 수준에 의해 기재되고 결정된 바와 같은 유동 세포측정 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, STAT5 인산화는 문헌 [Horta, et al., 상기 문헌], [Garcia, et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같은 유동 세포측정 기술, 또는 상업적으로 입수가 가능한 키트, 예컨대 포스포-STAT5 (Tyr694) 키트 (퍼킨-엘머 (매사추세츠주 월섬)로부터 파트 번호 64AT5PEG로서 상업적으로 입수가 가능함)를 사용하여 실질적으로 제조업체에 의해 제공된 지침에 따라 수행하여 측정될 수 있다.

[0169] 선택적인: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "선택적인"은 이러한 세포 집단의 특정한 성질을 기반으로 하여 특정한 세포 유형에 우세하게 결합하고/거나 그를 활성화시키는 작용제의 성질을 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 뮤테인이 CD132 수용체를 발현하는 세포에 비해 CD25 및/또는 CD25/CD122 수용체를 발현하는 세포의 우선적인 활성화를 나타낸다는 점에서 CD25 선택적인 뮤테인을 제공한다. 선택성은 전형적으로 리간드/수용체 결합에 대한 반응으로 유도된 활성의 특징인 검정에서 측정되는 활성에 의해 평가된다. 일부 실시양태에서, 선택적인 IL2 뮤테인은 유의하게 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 선택성은 CD25를 발현하는 세포 (예를 들어 YTCD25POS 또는 YTCD25+ 세포)의 활성화 대 유의하게 더 낮은 (바람직하게는 검출 불가능한) 수준의 CD25를 디스플레이하는 세포 (예를 들어 YTCD25NEG 또는 YTCD25- 세포)의 활성화에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 선택성은 CD25를 발현하는 T 세포 (예를 들어 Treg) 대 낮은 수준의 CD25를 발현하는 세포 (예를 들어 자극되지 않은 CD8+ 또는 CD4+ T 세포)의 활성화에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 동일한 검정에서 측정되는 바와 같이 CD25+ 대 CD25- 세포에 대한 EC₅₀에서 적어도 3배, 대안적으로 적어도 5배, 대안적으로 적어도 10배, 대안적으로 적어도 20배, 대안적으로 적어도 30배, 대안적으로 적어도 40배, 대안적으로 적어도 50배, 대안적으로 적어도 100배, 대안적으로 적어도 200배 차이를 갖는다.

[0170] 유의하게 감소된 결합: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유의하게 감소된 결합을 나타낸다"는 제1 분자의 모 형태에 비해 제2 분자 (예를 들어 수용체)에 대한 친화도의 유의한 감소를 나타내는 제1 분자 (예를 들어 리간드)의 변이체와 관련하여 사용된다. 항체 변이체와 관련하여, 변이체가 유래된 모 항체의 20% 미만, 대안적으로 약 10% 미만, 대안적으로 약 8% 미만, 대안적으로 약 6% 미만, 대안적으로 약 4% 미만, 대안적으로 약 2% 미만, 대안적으로 약 1% 미만, 또는 대안적으로 약 0.5% 미만의 친화도로 수용체의 천연 형태에 결합할 때, 항체 변이체는 "유의하게 감소된 결합을 나타낸다". 유사하게, 변이체 리간드와 관련하여, 변이체 리간드가, 변이체 리간드가 유래된 모 리간드의 20% 미만, 대안적으로 약 10% 미만, 대안적으로 약 8% 미만, 대안적으로 약 6% 미만, 대안적으로 약 4% 미만, 대안적으로 약 2% 미만, 대안적으로 약 1% 미만, 또는 대안적으로 약 0.5% 미만의 친화도로 수용체에 결합할 때, 변이체 리간드는 "유의하게 감소된 결합을 나타낸다". 유사하게, 변이체 수용체와 관련하여, 변이체 수용체의 친화도가 변이체 수용체가 유래된 모 수용체의 20% 미만, 대안적으로 약 10% 미만, 대안적으로 약 8% 미만, 대안적으로 약 6% 미만, 대안적으로 약 4% 미만, 대안적으로 약 2% 미만, 대안적으로 약 1% 미만, 또는 대안적으로 약 0.5% 미만의 친화도로 결합할 때, 변이체 리간드는 "유의하게 감소된 결합을 나타낸다".

[0171] 소분자(들): 용어 "소분자"는 약 10 kDa 미만, 약 2 kDa 미만, 또는 약 1 kDa 미만인 분자량을 갖는 화학적 화합물 (전형적으로 제약 활성 화합물)을 지칭한다. 소분자는 무기 분자, 유기 분자, 무기 성분을 함유하는 유기 분자, 방사성 원자를 포함하는 분자 및 합성 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "소분자"는 제약 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 이해되는 용어이고, 전형적으로 유기 화학적 화합물을 생물체로부터 구별하는데 사용된다.

[0172] 가용성 hCD25: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가용성 CD25", "가용성 인간 CD25", "가용성 hCD25" 및 "shCD25"는 막횡단 및 세포내 도메인이 결여된 hCD25의 ECD를 포함하는 hCD25 분자를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 이전에 언급된 바와 같이, 인간 CD25 ("hCD25")는 21개 아미노산 신호 서열을 포함하는 272개 아미노산 전구-단백질로서 발현되며, 이는 번역후 제거되어 251개 아미노산 성숙한 단백질이

된다. 아미노산 22-240 (성숙한 단백질의 아미노산 1-219)은 세포의 도메인에 상응한다. 아미노산 241-259 (성숙한 단백질의 아미노산 220-238)는 막형단 도메인에 상응한다. 아미노산 260-272 (성숙한 단백질의 아미노산 239-251)는 세포내 도메인에 상응한다. hCD25의 성숙한 형태의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2로서 제공된다.

[0173] 특이적으로 결합한다: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합한다"는 한 분자가 또 다른 것에 결합하는 선택성 또는 친화도의 정도를 지칭한다. 결합 쌍 (예를 들어 리간드/수용체, 항체/항원, 항체/리간드, 항체/수용체 결합 쌍)의 맥락에서, 결합 쌍의 제1 분자가 샘플에 존재하는 다른 성분에 유의한 양으로 결합하지 않을 때, 결합 쌍의 제1 분자는 결합 쌍의 제2 분자에 특이적으로 결합한다고 한다. 제2 분자에 대한 제1 분자의 친화도가 샘플에 존재하는 다른 성분에 대한 제1 분자의 친화도의 적어도 2배 초과, 대안적으로 적어도 5배 초과, 대안적으로 적어도 10배 초과, 대안적으로 적어도 20배 초과, 또는 대안적으로 적어도 100배 초과일 때, 결합 쌍의 제1 분자는 결합 쌍의 제2 분자에 특이적으로 결합한다고 한다. 특정한 실시양태에서, 결합 쌍의 제1 분자가 항체일 때, 예를 들어 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 결정시 항체와 결합 쌍의 제2 분자 사이의 평형 해리 상수가 약 10^6 M 초과, 대안적으로 약 10^8 M 초과, 대안적으로 약 10^{10} M 초과, 대안적으로 약 10^{11} M 초과, 대안적으로 약 10^{10} M 초과, 약 10^{12} M 초과인 경우, 항체는 결합 쌍의 제2 분자 (예를 들어 단백질, 항원, 리간드, 또는 수용체)에 특이적으로 결합한다 (Munsen, et al. 1980 *Analyt. Biochem.* 107:220-239). 한 실시양태에서, 리간드가 IL2 뮤테인이고, 수용체가 직교식 CD122 ECD를 포함할 때, IL2 뮤테인/직교식 CD122 ECD의 평형 해리 상수가 약 10^5 M 초과, 대안적으로 약 10^6 M 초과, 대안적으로 약 10^7 M 초과, 대안적으로 약 10^8 M 초과, 대안적으로 약 10^9 M 초과, 대안적으로 약 10^{10} M 초과, 또는 대안적으로 약 10^{11} M 초과인 경우, IL2 뮤테인은 특이적으로 결합한다. 특이적인 결합은 경쟁 ELISA, 방사성 리간드 결합 검정 (예를 들어, 포화 결합, 스캐차드 플롯, 비선형 곡선 피팅 프로그램 및 경쟁 결합 검정); 비-방사성 리간드 결합 검정 (예를 들어, 형광 편광 (FP), 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 및 표면 플라즈몬 공명 검정 (예를 들어, 문헌 [Drescher et al., *Methods Mol Biol* 493:323-343 (2009)]를 참조하며, 지이 헬쓰케어 바이오-사이언시즈(GE Healthcare Bio-Sciences)로부터 상업적으로 입수가 가능한 장비, 예컨대 비아코어(Biacore) 8+, 비아코어 S200, 비아코어 T200 (지이 헬쓰케어 바이오-사이언시즈, 메사추세츠주 01752 말보로 리절즈 웨이 100)에 의해); 액체 상 리간드 결합 검정 (예를 들어, 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 (RT-qPCR), 및 면역 침전); 및 고체 상 리간드 결합 검정 (예를 들어, 다중웰 플레이트 검정, 온-비드 리간드 결합 검정, 온-컬럼 리간드 결합 검정, 및 여과기 검정)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 평가될 수 있다.

[0174] 대상체: 용어 "수용체", "개체", "대상체", 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 진단, 치료 또는 요법을 필요로 하는 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 지칭한다. 치료의 목적을 위해 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 양, 염소, 돼지 등을 비롯한 포유동물로서 분류되는 임의의 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0175] 를 앓고 있는: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "를 앓고 있는"은 대상체가 필요로 하거나 또는 그로부터 이익을 얻는 X-선, CT-스캔, 통상적인 실험실 진단 검사 (예를 들어 혈구 카운트 등), 게놈 데이터, 단백질 발현 데이터, 면역조직화학을 포함하나 이에 제한되지는 않는 질환, 장애 또는 상태의 확인을 위한 분야에서 허용되는 이용가능한 정보를 기반으로 하여 대상체에 대해 의사에 의해 이루어지는 결정을 지칭한다. 용어 "를 앓고 있는"은 전형적으로 "신생물성 질환을 앓고 있는"과 같이 특정한 질환 상태와 관련하여 사용되고, 신생물이 존재하는 것으로 진단된 대상체를 지칭한다.

[0176] 실질적으로 순수한: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로 순수한"은 조성물의 성분이 조성물의 총 함량의 약 50% 초과, 대안적으로 약 60% 초과, 대안적으로 약 70% 초과, 대안적으로 약 80% 초과, 대안적으로 약 90% 초과, 대안적으로 약 95% 초과를 구성하는 것을 나타낸다. "실질적으로 순수한" 단백질은 조성물의 총 함량의 약 50% 초과, 대안적으로 약 60% 초과, 대안적으로 약 70% 초과, 대안적으로 약 80% 초과, 대안적으로 약 90% 초과, 대안적으로 약 95% 초과를 구성한다.

[0177] T-세포: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "T-세포" 또는 "T 세포"는 통상적인 관점에서 흉선에서 분화하고, 특이적인 세포-표면 항원 수용체를 가지며, 세포-매개된 및 체액성 면역의 개시 또는 억제제를 제어하는 것들 및 항원-보유 세포를 용해시키는 다른 것들을 포함하는 림프구를 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, T 세포에는 비제한적으로 나이브 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 나이브 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들어 T_H1 , T_H2 , T_H9 , T_H11 , T_H22 , T_{FH} ; 조절성 T 세포, 예를 들어 T_{R1} , Treg, 유도성 Treg; 기억 T 세포, 예를 들어 중

주 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포, NKT 세포, 중앙 침윤 림프구 (TIL), 및 이러한 T-세포의 조작된 변이체, 예컨대 비제한적으로 CAR-T 세포, 재조합적으로 변형된 TIL 및 TCR 조작된 세포가 포함된다.

[0178] 말단(Terminus/Terminal): 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리펩티드 구조의 맥락에서, "N-말단" (또는 "아미노 말단") 및 "C-말단" (또는 "카르복실 말단")은 각각 폴리펩티드의 극단의 아미노 및 카르복실 말단을 지칭하는 반면에, 용어 "N-말단" 및 "C-말단"은 각각 N-말단 및 C-말단을 향하는 폴리펩티드의 아미노산 서열에서의 상대적인 위치를 지칭하며, 각각 N-말단 및 C-말단의 잔기를 포함할 수 있다. "바로 N-말단"은 인접한 폴리펩티드 서열에서 제2 아미노산 잔기에 대한 제1 아미노산 잔기의 위치를 지칭하며, 제1 아미노산은 폴리펩티드의 N-말단에 더 가깝다. "바로 C-말단"은 인접한 폴리펩티드 서열에서 제2 아미노산 잔기에 대한 제1 아미노산 잔기의 위치를 지칭하며, 제1 아미노산은 폴리펩티드의 C-말단에 더 가깝다.

[0179] 치료 유효량: 본원에서 사용된 바와 같이, 단일 용량으로 또는 일련의 용량의 일부로서, 단독으로 또는 제약 조성물 또는 치료 요법의 일부로서, 대상체에게 작용제를 투여하는 것과 관련하여 문구 "치료 유효량"은 대상체에게 투여될 때 질환, 장애 또는 상태의 임의의 증상, 측면 또는 특징에 대해 임의의 검출가능한 긍정적인 효과를 가질 수 있는 양이다. 치료 유효량은 관련 약리학적 효과를 측정함으로써 확인될 수 있고, 투여 요법과 관련하여 및 대상체 상태의 진단 분석 등에 대한 반응으로 조정될 수 있다. 작용제의 치료 유효량을 결정하는 평가에 대한 파라미터는 연령, 체중, 성별, 전반적인 건강, ECOG 점수, 관찰가능한 약리학적 파라미터, 혈액 수준, 혈압, 심전도, 컴퓨터 단층촬영, X-선 등과 같은 지표를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에서 허용되는 진단 기준을 이용하여 의사에 의해 결정된다. 대안적으로, 또는 추가로, 임상 설정에서 일반적으로 평가되는 다른 파라미터, 예컨대 체온, 심박수, 혈액 화학의 정규화, 혈압의 정규화, 콜레스테롤 수준의 정규화, 또는 질환, 장애 또는 상태의 임의의 증상, 측면 또는 특징, 생체마커 (예컨대 염증성 시토카인, IFN- γ , 그랜자임 등), 혈청 종양 마커의 감소, 고형 종양의 반응 평가 기준에서의 개선 (RECIST), 면역-관련된 반응 기준에서의 개선 (irRC), 생존 기간의 증가, 무진행 생존의 연장된 기간, 진행까지의 시간의 연장, 치료 실패까지 증가된 시간, 무사건 생존의 연장된 기간, 다음 치료까지의 시간 연장, 객관적인 반응률의 개선, 반응 연장에서의 개선, 종양 부담의 감소, 완전 반응, 부분 반응, 안정한 질환 등 (작용제의 투여에 대한 반응으로 대상체 상태의 개선을 평가하기 위한 분야에서 임상가가 의존하는 것임)은 작용제의 치료 유효량이 대상체에게 투여되었는지를 결정하기 위해 모니터링될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 표적 병변과 관련하여 용어 "완전 반응 (CR)", "부분 반응 (PR)", "안정한 질환 (SD)" 및 "진행성 질환 (PD)" 및 비-표적 병변과 관련하여 용어 "완전 반응 (CR)", "불완전 반응/안정한 질환 (SD)" 및 진행성 질환 (PD)은 RECIST 기준에서 정의되는 바와 같이 이해된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역-관련된 완전 반응 (irCR)," "면역-관련된 부분 반응 (irPR)," "면역-관련된 진행성 질환 (irPD)" 및 "면역-관련된 안정한 질환 (irSD)"은 면역-관련된 반응 기준 (irRC)에 따라 정의되는 바와 같다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역-관련된 반응 기준 (irRC)"은 문헌 [Wolchok, et al. (2009) Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria, Clinical Cancer Research 15(23): 7412-7420]에 기재된 바와 같이 면역요법에 대한 반응의 평가를 위한 시스템을 지칭한다. 치료 유효량은 투여 요법 및/또는 대상체 상태의 평가 및 상기 인자에서의 변화와 관련하여 대상체의 치료 과정에 걸쳐 조정될 수 있다. 한 실시양태에서, 치료 유효량은 단독으로 또는 또 다른 작용제와 조합되어 사용될 때 포유동물 대상체에 대한 투여 과정에서 비가역적인 심각한 유해 사례를 일으키지 않는 작용제의 양이다.

[0180] 막횡단 도메인: 용어 "막횡단 도메인" 또는 "TM"은 막에 걸쳐 있는 폴리펩티드가 세포막과 회합할 때, 세포막에 매립되고, 막에 걸쳐 있는 폴리펩티드의 세포외 도메인 (ECD) 및 세포내 도메인 (ICD)과 펩티드 연결된 막에 걸쳐 있는 폴리펩티드 (예를 들어 막에 걸쳐 있는 폴리펩티드, 예컨대 CD122 또는 CD132 또는 CAR)의 도메인을 지칭한다. 막횡단 도메인은 세포외 및/또는 세포내 도메인 중 하나 또는 둘 다와 상동성 (천연적으로 회합됨) 또는 이종성 (천연적으로 회합되지 않음)일 수 있다. 막횡단 도메인은 세포외 및/또는 세포내 도메인 중 하나 또는 둘 다와 상동성 (천연적으로 회합됨) 또는 이종성 (천연적으로 회합되지 않음)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 수용체가 제1 모 수용체로부터 유래된 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체이고, 제2 세포외 도메인은 제2 상이한 모 수용체로부터 유래되고, 키메라 수용체의 막횡단 도메인은 키메라 수용체가 유래된 모 수용체의 ICD 또는 ECD와 정상적으로 회합되는 막횡단 도메인이다. 대안적으로, 수용체의 막횡단 도메인은 원형질막에 걸쳐 있는 인공 아미노산 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 수용체가 제1 모 수용체로부터 유래된 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체이고, 제2 세포외 도메인은 제2 상이한 모 수용체로부터 유래되고, 키메라 수용체의 막횡단 도메인은 키메라 수용체가 유래된 모 수용체의 ICD 또는 ECD와 정상적으로 회합되는 막횡단 도메인이다.

- [0181] 치료하다: 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 등은 질환, 장애 또는 상태, 또는 그의 증상이 대상체에서 진단되고, 관찰되는 등의 후에, 대상체에서 발병한 이러한 질환, 장애 또는 상태의 근본적인 원인 중 적어도 하나 또는 이러한 질환, 장애 또는 상태와 연관된 증상 중 적어도 하나를 일시적으로 또는 영구적으로 제거하거나, 감소시키거나, 저해하거나, 완화시키거나 또는 개선시키기 위해, 대상체에 대해 개시되는 작용 과정 (예컨대 IL2 뮤테인, 또는 그를 포함하는 제약 조성물의 투여)이다. 치료는 작용 과정이 대상체에서 질환을 억제하는 (예를 들어, 질환, 장애 또는 상태의 발달을 정지시키고, 또는 그와 연관된 하나 이상의 증상을 개선시키는), 질환을 앓고 있는 대상체에 대해 취해지는 작용 과정을 포함한다.
- [0182] Treg 세포 또는 조절성 T 세포. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조절성 T 세포" 또는 "Treg 세포"는 이펙터 T 세포 (Teff)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 T 세포의 반응을 저해할 수 있는 유형의 $CD4^{+}$ T 세포를 지칭한다. Treg 세포는 IL2 수용체 (CD25)의 α -서브유닛인 CD4, 및 전사 인자 포크헤드 박스 P3 (FOXP3)의 발현을 특징으로 한다 (Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62 (2004)). "통상적인 $CD4^{+}$ T 세포"는 조절성 T 세포 이외의 $CD4^{+}$ T 세포를 의미한다.
- [0183] 변이체: 용어 "단백질 변이체" 또는 "변이체 단백질" 또는 "변이체 폴리펩티드"는 적어도 하나의 아미노산 변형에 의해 모 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 모 폴리펩티드는 천연 발생 또는 야생형 (WT) 폴리펩티드일 수 있거나, 또는 WT 폴리펩티드의 변형된 버전 (즉, 뮤테인)일 수 있다.
- [0184] 야생형: "야생형" 또는 "WT" 또는 "천연"은 본원에서 대립유전자 변이를 비롯하여 천연에서 발견되는 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 야생형 단백질, 폴리펩티드, 항체, 면역글로불린, IgG 등은 인간에 의해 변형되지 않은 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 갖는다.
- [0185] 명명법 규정:
- [0186] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 wt hIL2 (서열식별번호: 1) 아미노산 서열에 비해 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다. 잔기는 본원에서 1-문자 또는 3-문자 아미노산 코드에 이어 wt hIL2 아미노산 위치에 의해 지정될 수 있고, 예를 들어 "Cys125" 또는 "C125"는 wt hIL2 (서열식별번호: 1)의 위치 125에서의 시스테인 잔기를 지칭한다. 하기 명명법은 치환, 결실 또는 삽입을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 치환은 본원에서 wt hIL2 잔기에 대한 1문자 아미노산 코드에 이어 IL2 아미노산 위치에 이어 새로운 치환된 아미노산에 대한 1문자 아미노산 코드에 의해 지정된다. 예를 들어, "K35A"는 서열식별번호: 1의 위치 35의 리신 (K) 잔기의 알라닌 (A) 잔기로의 치환을 지칭한다. 결실은 "des"에 이어 아미노산 잔기 및 wt hIL2 (서열식별번호: 1)에서의 그의 위치로 지정된다. 예를 들어, 용어 "des-Ala1" 또는 "desA1"은 wt hIL2의 폴리펩티드 (서열식별번호: 1)의 위치 1에서의 알라닌의 결실을 지칭한다.
- [0187] hIL2 뮤테인
- [0188] 일부 실시양태에서, 부분 효능제인 본 개시내용의 방법의 실시예에 유용한 hIL2 뮤테인은 wt hIL2와 비교하여 1개 이상의 감소된 기능을 갖는다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2 (서열식별번호: 1)와 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 아미노산 치환, 변형 또는 결실로 이루어진다.
- [0189] 본 개시내용은 신생물성 질환의 치료 및/또는 예방에 유용한 인간 IL2 ("hIL2") 뮤테인을 포함하는 조성물 및 그를 사용하는 방법을 제공하며, 여기서 인간 IL2 뮤테인은 하기 화학식 1 (서열식별번호: 10)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 야생형 hIL2 ("wt hIL2", 서열식별번호: 1) 폴리펩티드에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타낸다:

(AA1)_a-(AA2)_b-(AA3)_c-(AA4)_d-(AA5)_e-(AA6)_f-(AA7)_g-(AA8)_h-(AA9)_i-T10-Q11-L12-Q13-L14-E15-H16-L17-(AA18)-L19-D20-L21-(AA22)-M23-I24-L25-N26-G27-I28-N29-N30-Y31-K32-N33-P34-(AA35)-L36-T37-(AA38)-(AA39)-L40-T41-F42-K43-F44-Y45-M46-P47-K48-K49-A50-T51-E52-L53-K54-(AA55)-L56-Q57-C58-L59-E60-E61-E62-L63-K64-P65-L66-E67-E68-(AA69)-L70-N71-L72-A73-(AA74)-S75-K76-N77-F78-H79-(AA80)-(AA81)-P82-R83-D84-(AA85)-(AA86)-S87-N88-(AA89)-N90-(AA91)-(AA92)-V93-L94-E95-L96-(AA97)-G98-S99-E100-T101-T102-F103-(AA104)-C105-E106-Y107-A108-(AA109)-E110-T111-A112-(AA113)-I114-V115-E116-F117-L118-N119-R120-W121-I122-T123-F124-(AA125)-(AA126)-S127-I128-I129-(AA130)-T131-L132-T133

1

상기 식에서:

- 각각의 a, b, c, d, e, f, g, h 및 i는 0 또는 1로부터 개별적으로 선택되고;
- AA1은 A (야생형, a=1)이거나 또는 결실되고 (a=0);
- AA2는 P (야생형, b=1)이거나 또는 결실되고 (b=0);
- AA3은 T (야생형, c=1), C, A, G, Q, E, N, D, R, K, P이거나 또는 결실되고 (c=0);
- AA4는 S (야생형, d=1)이거나 또는 결실되고 (d=0);
- AA5는 S (야생형, e=1)이거나 또는 결실되고 (e=0);
- AA6은 S (야생형, f=1)이거나 또는 결실되고 (f=0);
- AA7은 T (야생형, g=1)이거나 또는 결실되고 (g=0);
- AA8은 K (야생형, h=1)이거나 또는 결실되고 (h=0);
- AA9는 K (야생형, i=1)이거나 또는 결실되고 (i=0);
- AA18은 L (야생형) 또는 R, L, G, M, F, E, H, W, K, Q, S, V, I, Y, H, D 또는 T이고;
- AA22는 Q (야생형) 또는 F, E, G, A, L, M, F, W, K, S, V, I, Y, H, R, N, D, T 또는 F이고;
- AA35는 K (야생형) 또는 E이고;
- AA38은 R (야생형), W 또는 G이고;
- AA39는 M (야생형), L 또는 V이고;
- AA55는 H (야생형) 또는 Y이고;
- AA69는 V (야생형) 또는 A이고;
- AA74는 Q (야생형), P, N, H, S이고;
- AA80은 L (야생형), F 또는 V이고;
- AA81은 R (야생형), I, D 또는 T이고;
- AA85는 L (야생형) 또는 V이고;
- AA86은 I (야생형) 또는 V이고;
- AA89는 I (야생형) 또는 V이고;
- AA91은 V (야생형), R 또는 K이고;
- AA92는 I (야생형) 또는 F이고;
- AA97은 K (야생형) 또는 Q이고;

- [0218] • AA104는 M (야생형) 또는 A이고;
- [0219] • AA109는 D (야생형), C 또는 활성화된 측쇄를 갖는 비-천연 아미노산이고;
- [0220] • AA113은 T (야생형) 또는 N이고;
- [0221] • AA125는 C (야생형), A 또는 S이고;
- [0222] • AA126은 Q (야생형) 또는 H, M, K, C, D, E, G, I, R, S 또는 T이고;
- [0223] • AA130은 S (야생형), T, G 또는 R이다.
- [0224] 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 hIL2 뮤테인이 hCD132 (또는 그의 세포외 도메인)에 대한 wt hIL2 (서열식별번호: 1)의 친화도의 <70%, 대안적으로 <65%, 대안적으로 <60%, 대안적으로 <55%, 대안적으로 <50%, 대안적으로 <45%, 대안적으로 <40%, 대안적으로 <35%, 대안적으로 <25%, 대안적으로 <20%, 대안적으로 <15%, 대안적으로 <10%, 또는 대안적으로 <5%로 결합하는 경우에 hCD132 (서열식별번호: 5) 또는 hCD132의 세포외 도메인에 대해 감소된 결합 친화도를 보유한다.
- [0225] 특정 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 CD122/CD132 상호작용이 야생형 hIL2에 비해 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 50%, 약 75%, 약 90%, 약 95% 또는 그 초과만큼 감소되도록 CD122와 CD132의 회합을 파괴한다.
- [0226] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, CD122 및/또는 CD25에 대해 유의한 결합 친화도를 보유한다.
- [0227] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 hCD122 (서열식별번호: 3), 또는 그의 ECD (서열식별번호: 4)에 대한 결합 친화도를 나타낸다. IL2 뮤테인은 hIL2 뮤테인이 hCD122 (또는 그의 ECD)에 야생형 인간 CD122 (서열식별번호: 3) 또는 그의 ECD에 대한 wt hIL2 (서열식별번호: 1)의 결합 친화도의 약 50% 초과, 대안적으로 >60%, 대안적으로 >65%, 대안적으로 >70%, 대안적으로 >75%, 대안적으로 >80%, 대안적으로 >85%, 대안적으로 >90%, 대안적으로 >90%, 대안적으로 >95%, 대안적으로 >100%, 대안적으로 >105%, 대안적으로 >110%, 대안적으로 >115%, 대안적으로 >125%, 대안적으로 >150%, 대안적으로 >200%, 대안적으로 >300%, 대안적으로 >400%, 대안적으로 >500%로 결합하는 경우에, wt hIL2에 필적하거나 그 초과인 hCD122 (또는 그의 ECD)에 대한 결합 친화도를 보유한다.
- [0228] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD25에 대한 결합 친화도를 보유한다. IL2 뮤테인은 hIL2 뮤테인이 야생형 hCD25 (서열식별번호: 2) 및/또는 shCD25에 대한 wt hIL2 (서열식별번호: 1)의 친화도의 약 50% 초과, 대안적으로 >60%, 대안적으로 >65%, 대안적으로 >70%, 대안적으로 >75%, 대안적으로 >80%, 대안적으로 >85%, 대안적으로 >90%, 대안적으로 >90% (야생형 IL2의 친화도), 대안적으로 >95%, 대안적으로 >100% (야생형 IL2의 친화도), 대안적으로 >105%, 대안적으로 >110%, 대안적으로 >115%, 대안적으로 >125%, 대안적으로 >150%, 대안적으로 >200%, 대안적으로 >300%, 대안적으로 >400%, 대안적으로 >500%의 친화도로 hCD25에 결합하는 경우에, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 hCD25에 대한 결합 친화도를 보유한다.
- [0229] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122 및 CD25에 대한 결합 친화도를 보유한다.
- [0230] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 비해 hCD25/hCD122 수용체 복합체 및/또는 고친화도 hCD25/hCD122/hCD132 수용체 복합체에 대해 증가된 결합 친화도를 나타낸다.
- [0231] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 hCD25/hCD122 수용체 복합체에 대한 결합 친화도를 나타낸다. hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, hIL2 뮤테인이 hCD25/hCD122 수용체 복합체에 대한 wt hIL2 (서열식별번호: 1)의 친화도의 약 50% 초과, 대안적으로 >60%, 대안적으로 >65%, 대안적으로 >70%, 대안적으로 >75%, 대안적으로 >80%, 대안적으로 >85%, 대안적으로 >90%, 대안적으로 >90% (야생형 IL2의 친화도), 대안적으로 >95%, 대안적으로 >100% (야생형 IL2의 친화도), 대안적으로 >105%, 대안적으로 >110%, 대안적으로 >115%, 대안적으로 >125%, 대안적으로 >150%, 대안적으로 >200%, 대안적으로 >300%, 대안적으로 >400%, 대안적으로 >500%로 hCD25/hCD122 복합체에 결합하는 경우에 wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 hCD25/hCD122 수용체

복합체에 대한 결합 친화도를 나타낸다.

- [0232] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 hCD25/hCD122/CD132 수용체 복합체에 대한 결합 친화도를 나타낸다. hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, hIL2 뮤테인이 hCD25/hCD122/hCD132 수용체 복합체에 대한 wt hIL2 (서열식별번호: 1)의 친화도의 약 50% 초과, 대안적으로 >60%, 대안적으로 >65%, 대안적으로 >70%, 대안적으로 >75%, 대안적으로 >80%, 대안적으로 >85%, 대안적으로 >90%, 대안적으로 >90% (야생형 IL2의 친화도), 대안적으로 >95%, 대안적으로 >100% (야생형 IL2의 친화도), 대안적으로 >105%, 대안적으로 >110%, 대안적으로 >115%, 대안적으로 >125%, 대안적으로 >150%, 대안적으로 >200%, 대안적으로 >300%, 대안적으로 >400%, 대안적으로 >500%로 hCD25/hCD122/CD132 복합체에 결합하는 경우에 wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 hCD25/hCD122/CD132 수용체 복합체에 대한 결합 친화도를 나타낸다.
- [0233] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, wt hIL2에 비해 hCD25/hCD122 수용체 복합체 및 고친화도 hCD25/hCD122/hCD132 수용체 복합체에 대해 증가된 결합 친화도를 나타낸다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내고, CD25, 막 결합된 CD25 또는 sCD25의 존재 하에 wt hIL2에 필적하거나 그보다 큰 CD122에 대한 증가된 결합 친화도를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 CD132 수용체 결합을 감소시키는 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD132 수용체 결합 친화도를 감소시키는 1개 이상의 아미노산 치환은 hIL2와 hCD132 사이의 계면에 있는 아미노산으로부터 선택된다. hIL2의 결정 구조 및 그의 hCD132와의 계면이 공개되었고, CD132에 대한 hIL2의 결합과 상호작용하는 것으로 확인된 hIL2 분자의 위치를 확인한 다른 연구가 수행되었고, 이들 위치는 잔기 L18, Q22, Q126, T123, S127, I129 및 S130을 포함한다. 일부 실시양태에서, L18에서의 치환은 L18R, L18G, L18M, L18F, L18E, L18H, L18W, L18K, L18Q, L18S, L18V, L18I, L18Y, L18H, L18D, L18N 및 L18T를 포함한다. 일부 실시양태에서, Q22에서의 치환은 Q22F, Q22E, Q22G, Q22A, Q22L, Q22M, Q22F, Q22W, Q22K, Q22S, Q22V, Q22I, Q22Y, Q22H, Q22R, Q22N, Q22D, Q22T 및 F를 포함한다. 일부 실시양태에서, Q126에서의 치환은 Q126H, Q126M, Q126K, Q126C, Q126D, Q126E, Q126G, Q126I, Q126R, Q126S 또는 Q126T를 포함한다. 일부 실시양태에서, S130에서의 치환은 S130R 및 S130G를 포함한다.
- [0234] 일부 실시양태에서, wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타내는 hIL2 뮤테인은 야생형 hIL2에 따라 넘버링된 위치 18, 22 및/또는 126에서 변형을 포함하는 야생형 IL2의 1차 구조에 대한 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 야생형 IL2의 1차 구조에 대한 변형이 하기 아미노산 치환: 본원에서 "LQH"로도 지칭되는 [Q126H]; 본원에서 "LEQ"로도 지칭되는 [Q22E]; 및 본원에서 "RQQ"로도 지칭되는 [L18R]을 포함하나 이에 제한되지는 않는 야생형 hIL2에 따라 넘버링된 L18, Q22 및/또는 Q126 중 하나에서 단일 치환을 포함하는 경우에 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타낸다.
- [0235] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 야생형 IL2의 1차 구조에 대한 변형이 하기 아미노산 치환 세트: 본원에서 "LEH"로도 지칭되는 [Q22E, Q126H]; 및 본원에서 "RQH"로도 지칭되는 [L18R; Q126H]를 포함하나 이에 제한되지는 않는 야생형 hIL2에 따라 넘버링된 L18, Q22 및/또는 Q126 중 하나에서 단일 치환을 포함하는 경우에 wt hIL2에 비해 hCD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타낸다.
- [0236] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 위치 18, 22 및 126에서의 치환을 포함하는 hIL2 뮤테인을 제공하며, 여기서 위치 18, 22 및 126에서의 치환은 하기로부터 선택된다:
- [0237] · L18R, L18G, L18M, L18F, L18E, L18H, L18W, L18K, L18Q, L18S, L18V, L18I, L18Y, L18H, L18D, L18N 및 L18T 중 하나;
- [0238] · Q22F, Q22E, Q22G, Q22A, Q22L, Q22M, Q22F, Q22W, Q22K, Q22S, Q22V, Q22I, Q22Y, Q22H, Q22R, Q22N, Q22D, Q22T, 및 F 중 하나; 및
- [0239] · Q126H, Q126M, Q126K, Q126C, Q126D, Q126E, Q126G, Q126I, Q126R, Q126S, 및 Q126T 중 하나.
- [0240] 하기 표 4에 제공된 바와 같은 아미노산 치환 세트를 포함하는 야생형 hIL2에 따라 넘버링된 위치 18, 22 및 126에서의 치환을 포함하는 예시적인 hIL2 뮤테인.

표 4. 18, 22 및 126 치환 hIL2 뮤테인			
	hIL2 잔기 위치		
약어	18	22	126
AEH	A	E	H
AEK	A	E	K
DEH	D	E	H
EEH	E	E	H
EEK	E	E	K
FEH	F	E	H
GEH	G	E	H
HEH	H	E	H
HEK	H	E	K
IEH	I	E	H
IEK	I	E	K
KEH	K	E	H
MEH	M	E	H
NEH	N	E	H
QEH	Q	E	H
RAH	R	A	H
RDH	R	D	H
REH	R	E	H
REE	R	E	E
REK	R	E	K
REM	R	E	M
RET	R	E	T
REV	R	E	V
REL	R	E	L
REF	R	E	F
REN	R	E	N

[0241]

표 4. 18, 22 및 126 치환 hIL2 뮤테인			
	hIL2 잔기 위치		
약어	18	22	126
RER	R	E	R
REY	R	E	Y
RFH	R	F	H
RGH	R	G	H
RHH	R	H	H
RIH	R	I	H
RKH	R	K	H
RLH	R	L	H
RMH	R	M	H
RNH	R	N	H
RRH	R	R	H
RSH	R	S	H
RTH	R	T	H
RTK	R	T	K
RVH	R	V	H
RWH	R	W	H
RYH	R	Y	H
SEH	S	E	H
TEH	T	E	H
VEH	V	E	H
VEK	V	E	K
WEH	W	E	H
YEH	Y	E	H

[0242]

[0243]

특정한 IL2 뮤테인에 대한 3 문자 약어가 위치 18, 22 및 126에서 돌연변이를 갖는 IL2 뮤테인을 반영함을 유의하며, 예를 들어 "FEH"는 치환 L18F, Q22E 및 Q126H를 포함하는 IL2 뮤테인에 대한 약칭 명명법이다. 상기 제공된 명칭은 본원에서 평가된 hIL2 뮤테인에서의 1개 이상의 아미노산 치환 세트를 지칭하기 위해 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된다.

[0244]

일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 hCD122 수용체 결합 (또는 hCD122의 ECD에 대한 결합)을 증가시키는 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD132 수용체에 대해 감소된 결합 친화도를 갖는 본 개시내용의 방법의 실시예에 유용한 hIL2 뮤테인은 CD122 결합 친화도를 증가시키는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과 돌연변이를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법의 실시예에 유용한 대상 IL2 뮤테인은 hIL2 뮤테인이 wt hIL2보다 더 높은 친화도로 CD122에 결합하도록 wt hIL2에 비해 적어도 1개의 돌연변이 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 초과 아미노산 잔기의 결실, 부가 또는 치환)를 포함한다. 특정 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 야생형 IL2보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 큰 친화도로 CD122에 결합한다. IL2 뮤테인의 결합 친화도는 또한 wt hIL2보다 CD122에 대해 1.2, 1.4, 1.5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 250배 또는 그 초과로 더 큰 친화도로 표현될 수 있다.

[0245]

일부 실시양태에서, hCD122 수용체 결합 친화도를 증가시키는 1개 이상의 아미노산 치환은 hIL2와 hCD122 사이의 계면에 있는 아미노산으로부터 선택된다. hIL2의 결정 구조와 그의 수용체에 기초하여, hCD122에 대한 hIL2의 결합과 상호작용하는 것으로 확인된 그러한 위치는 성숙한 wt hIL2에 따라 넘버링된 Q74, L80, R81, L85,

I86, I89V 및 I92를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CD122 결합 친화도를 증진시키는 아미노산 치환의 예는 Q74N, Q74H, Q74S, L80F, L80V, R81D, R81T, L85V, I86V, I89V 및/또는 I92F 또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, CD122 결합 친화도를 증가시키는 아미노산 치환은 L80F, R81D, L85V, I86V 및 I92F를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD122 결합 친화도를 증가시키는 아미노산 치환은 N74Q, L80F, R81D, L85V, I86V, I89V 및 I92F를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD122 결합 친화도를 증가시키는 아미노산 치환은 Q74N, L80V, R81T, L85V, I86V 및 I92F를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD122 결합 친화도를 증가시키는 아미노산 치환은 Q74H, L80F, R81D, L85V, I86V 및 I92F를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD122 결합 친화도를 증가시키는 아미노산 치환은 Q74S, L80F, R81D, L85V, I86V 및 I92F를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD122 결합 친화도를 증가시키는 아미노산 치환은 Q74N, L80F, R81D, L85V, I86V 및 I92F를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD122 결합 친화도를 증가시키는 아미노산 치환은 성숙한 wt hIL2에 따라 넘버링된 Q74S, R81T, L85V 및 I92F를 포함한다.

[0246] 한 측면에서, 본 개시내용은 야생형 인간 IL2 (hIL2)와 비교하여 hCD25에 대한 유의하거나 증진된 결합 친화도 및 hCD132 (또는 hCD132의 세포외 도메인) 수용체에 대한 감소된 결합 친화도를 나타내는 hIL2 뮤테인을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 hCD25 결합을 증가시키는 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, hCD25 수용체 결합 친화도를 증가시키는 1개 이상의 아미노산 치환은 hIL2와 hCD25 사이의 계면에 있는 아미노산으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 CD25와 접촉하거나 또는 CD25와 접촉하는 다른 위치의 배향을 변경시켜 CD25에 대한 증가된 친화도를 보유하는 IL2 뮤테인을 생성하는 IL2 서열의 위치에서의 1개 이상의 돌연변이를 포함한다. hIL2의 결정 구조 및 그의 수용체 및 다른 연구에 기초하여, hCD25에 대한 hIL2의 결합과 상호작용하는 것으로 확인된 그러한 위치는 성숙한 wt hIL2에 따라 넘버링된 V69 및 Q74를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 1개 이상의 치환 V69A 및 Q74P를 포함한다.

[0247] 추가 서열 변형:

[0248] CD25, CD122 및/또는 CD132에 관하여 hIL2 뮤테인의 결합 활성을 조정하는 wt hIL2 서열에 대한 상이 아미노산 치환 및 변형에 추가로, hIL2는 추가의 이익을 제공하는 1차 서열에 대한 1개 이상의 변형을 임의로 제공할 수 있다.

[0249] 글리코실화 부위의 제거: 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 IL2 뮤테인이 진핵 발현 시스템, 특히 포유동물 숙주 세포, 예컨대 CHO 또는 HEK 세포에서 발현될 때 비-글리코실화 hIL2 뮤테인의 생성을 용이하게 하기 위해 위치 Thr3 (T3)에서 O-글리코실화 부위를 제거하기 위한 변형을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 인간 IL2의 위치 Thr3 (T3)에 T3에서의 O-글리코실화를 방지하기 위한 아미노산 변형, 결실 또는 치환 부위를 포함한다. 한 실시양태에서, T3에서의 변형은 아미노산 치환이다. 예시적인 아미노산 치환은 T3A, T3G, T3Q, T3E, T3 N, T3D, T3R, T3K, 및 T3P를 포함하며, 이는 생물학적 활성을 제거하지 않으면서 위치 3에서 글리코실화 부위를 제거한다 (미국 특허 번호 5,116,943; 문헌 [Weiger et al., (1989) Eur. J. Biochem., 180:295-300] 참조). 한 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 아미노산 치환 T3A를 포함한다.

[0250] 혈관 누출 증후군의 최소화: 본 개시내용의 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 실질적인 효능을 상실시키지 않고 인간에서 IL2 요법 사용에 대한 실질적으로 부정적이며 용량을 제한하는 부작용인 혈관 누출 증후군을 피하기 위해 아미노산 치환을 포함한다. Epstein 등의 미국 특허 번호 7,514,073B2 (2009년 4월 7일 허여됨)를 참조한다. 한 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 R38W, R38G, R39L, R39V, F42K 및 H55Y로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0251] 산화 저항성 M104A: 본 개시내용의 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 메티오닌 104의 알라닌 잔기로의 아미노산 치환을 포함한다 (M104A). 이러한 IL2 뮤테인은 산화 및 활성의 상실에 대해 보다 저항성일 수 있다 (Koths 등의 미국 특허 4,752,585 참조 (1988년 6월 21일 허여됨)).

[0252] Cys125: wt hIL2 서열은 위치 125에 쌍형성되지 않은 시스테인 잔기를 포함한다. 쌍형성되지 않은 시스테인은 시스테인 술폰히드릴 기 사이의 부정확한 디설피드 가교에 의한 단백질의 미스폴딩에 대한 기회를 제시한다. 이는 hIL2 뮤테인이 박테리아에서 재조합적으로 발현되고 봉입체로부터 분리되는 경우에 특정한 문제일 수 있다. 결과적으로, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 임의로 위치 125에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치환은 C125A 또는 C125S이다.

[0253] V91: 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법의 실시예 유용한 CD25 편향된 IL2 뮤테인은 위치 91에서 아미노산

치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 V91K, V91R, V91K로부터 선택된 위치 91에서의 치환을 포함하는 IL2 뮤테인을 사용한 신생물성 질환의 치료를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 V91K, V91R, V91K로부터 선택된 위치 91에서의 치환을 포함하는 IL2 뮤테인을 사용한 신생물성 질환의 치료를 포함하며, 이는 Gavin 등의 미국 특허 9,580,486 B2 (2017년 2월 28일 승인됨) (그의 개시내용은 위치 91에서의 치환을 포함하는 IL2 뮤테인의 Fc 융합체의 구축과 관련하여 본원에 참조로 포함됨)에 보다 완전히 기재된 바와 같이 Fc 융합체의 형태로 사용된다.

[0254] 비-천연 아미노산의 혼입: 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법의 실시예에 유용한 CD25 편향된 IL2 뮤테인은 CD132에 대한 결합을 방해하고 CD25+ T 세포에 대한 분자의 활성을 편향시키는 PEG 구조의 혼입을 포함한다. 염증성 및 자가면역 적응증의 치료에 유용한 것으로 개시된 이러한 분자의 예는 Ptacin 등의 PCT 국제 출원 번호 PCT/US2018/045257 (2018년 8월 3일에 출원되고, 2019년 2월 7일에 국제 공개 번호 WO 2019/028419 A1로서 공개됨)에 기재된 것을 포함한다. 이러한 PEG IL2 뮤테인의 한 실시양태는 문헌 [Ptacin, et al. (2019) THOR-809: An IL2 Engineered from an Expanded Genetic Alphabet for the Potential Treatment of Autoimmune Disorders, Abstract 89, 2019 PACR/ARP Annual Meeting, November 8-13, 2019 Atlanta; Arthritis Rheumatol 2019:71 (supplement 10)]에 기재된 바와 같이 THOR-809로서 확인된 PEG화 IL2 분자이다.

[0255] 친화도 성숙: 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 CD25 및/또는 CD122에 대한 그의 친화도를 증진시키도록 친화도 성숙되어 hIL2 뮤테인의 아미노산 서열을 변형시킬 수 있다. "친화도 성숙" 폴리펩티드는 변경(들)을 보유하지 않는 모 폴리펩티드에 비해 그의 수용체에 대한 폴리펩티드의 친화도, 또는 그 반대의 경우의 친화도를 개선시키는 1개 이상의 잔기에 1개 이상의 변경(들)을 갖는 것이다. 친화도 성숙은 IL2 뮤테인의 결합 친화도를 모 IL2 뮤테인 폴리펩티드에 비해 적어도 약 10%, 대안적으로 적어도 약 50%, 대안적으로 적어도 약 100%, 대안적으로 적어도 약 150%, 또는 2배, 3배, 4배 또는 5배 증가시키도록 수행될 수 있다.

[0256] N-말단 결실: hIL2 뮤테인은 hIL2 활성 및 CD132에 대한 감소된 결합 친화도를 유지하면서 위치 1-9 (a, b, c, d, e, f, g, h 및 i 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물), 대안적으로 위치 1-8 (a, b, c, d, e, f, g 및 h 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물), 대안적으로 위치 1-7 (a, b, c, d, e, f 및 g 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물), 대안적으로 위치 1-6 (a, b, c, d, e 및 f 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물), 대안적으로 위치 1-5 (a, b, c, d 및 e 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물), 대안적으로 위치 1-4 (a, b, c 및 d 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물), 대안적으로 위치 des1-3 (a, b 및 c 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물), 대안적으로 위치 1-2 (a 및 b 모두 0인 상기 화학식 1의 화합물) 중 하나 이상에서, 또는 대안적으로 위치 1 (a가 0인 상기 화학식 1의 화합물)에서 N-말단 아미노산의 제거를 추가로 포함할 수 있다.

[0257] IL2 뮤테인은 처음 2개의 아미노산의 결실 (desAla1-desPro2), 뿐만 아니라 선택적 N-말단 변형, 특히 시스테인의 술폰히드릴 기의 PEG화를 용이하게 하기 위한 Thr3 글리코실화의 시스테인 잔기로의 치환을 포함할 수 있다 (예를 들어, Katre 등의 미국 특허 번호 5,206,344 (1993년 4월 27일 허여됨) 참조).

[0258] wt hIL2는, 포유동물 세포에서 내인성으로 발현되는 경우에, 포유동물 세포에서 효율적으로 절단되어 성숙한 hIL2 폴리펩티드의 N-말단 아미노산이 알려진 잔기 (Ala1)가 되도록 하는 신호 펩티드를 포함하는 전구-단백질로서 발현된다. 포유동물 세포에서 hIL2 뮤테인의 발현이 가능하지만, 이는 전형적으로 박테리아 세포 생성보다 더 비싸고, 포유동물 세포에서의 발현은 또한 사용된 세포주에 따라 hIL2의 비-천연 글리코실화를 유발할 수 있다. 결과적으로, 박테리아 세포에서의 hIL2 뮤테인의 생성은 특정 상황에서 바람직할 수 있다. 그러나, 박테리아 세포에서의 hIL2 펩티드의 직접 발현 (즉, 융합 단백질로서가 아님)은 N-말단 메티오닌 잔기의 부가를 유발한다. wt IL2 서열의 Ala1이 유지되는 경우에, 이는 N-말단 메티오닌에 비해 +2 위치에 프롤린을 생성한다. 프롤린이 N-말단 메티오닌에 대해 +2 위치에 존재할 때, 내인성 박테리아 메티오닐 아미노 펩티다제 (MAP)는 N 말단 메티오닌을 효율적으로 절단하지 않는다. 결과적으로, Met-IL2의 박테리아 직접 발현은 N-말단을 갖는 분획인 IL2 종과 N-말단 메티오닌이 결합된 또 다른 종의 혼합물을 생성한다. 이러한 IL2 종의 혼합물은 IL2 뮤테인을 N-말단 모이어티, 예컨대 표적화 모이어티 또는 PEG 분자에 접합시키려고 시도할 때 프로세싱 증가, 생성물의 손실을 초래하고 어려움을 생성하는 전형적인 제조 절차에 의해 해결하기 어렵다. 그러나, IL2 뮤테인으로부터 Ala1을 결실시킴으로써, N-말단 메티오닌에 비해 +2 위치의 잔기는 트레오닌 (T3)이고, 이것은 N-말단 메티오닌의 매우 효율적인 절단을 일으키고 IL2 뮤테인의 박테리아 생성을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 위치 1에서 알라닌의 결실을 포함하는 hIL2 뮤테인 (des-Ala1; hIL2에 따라 넘버링된 des-A1)을 제공한다.

[0259] 효능제 활성: 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 면역 세포, 예컨대 조작된 T 세포 또는 단리된

T 세포를 포함한 T 세포의 활성화 및/또는 증식과 관련하여 부분 효능제, 완전 효능제 또는 과효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 면역 세포에서의 STAT5 인산화의 부분 효능제, 완전 효능제 또는 과효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 STAT5 인산화를 자극하는 수준의 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 미만인 수준으로 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서 STAT5 인산화를 유도하는 부분 효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 STAT5 인산화를 자극하는 수준의 95% 내지 105%의 수준으로 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서 STAT5 인산화를 유도하는 완전 효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 STAT5 인산화를 자극하는 수준의 105% 초과, 대안적으로 110% 초과, 대안적으로 120% 초과, 대안적으로 150% 초과, 대안적으로 200% (2배), 대안적으로 300% (3배) 초과 수준으로 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서 STAT5 인산화를 유도하는 과효능제이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포는 새로 단리된 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 새로 단리된 CD8+ 세포는 TIL이다. 다른 실시양태에서, CD8+ T 세포는 활성화된 CD8+ T 세포이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 CAR T 세포, TCR 조작된 세포, 조작된 Treg 또는 조작된 NK 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 조작된 면역 세포이다.

[0260] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서의 pERK1/ERK2 신호전달의 부분 효능제, 완전 효능제 또는 과효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 pERK1/ERK2 신호전달을 자극하는 수준의 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 미만인 수준으로 pERK1/ERK2 신호전달을 자극하는 부분 효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 pERK1/ERK2 신호전달을 자극하는 수준의 95% 내지 105%의 수준으로 pERK1/ERK2 신호전달을 자극하는 완전 효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 pERK1/ERK2 신호전달을 자극하는 수준의 105% 초과, 대안적으로 110% 초과, 대안적으로 120% 초과, 대안적으로 150% 초과, 대안적으로 200% (2배), 대안적으로 300% (3배) 초과 수준으로 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서 pERK1/ERK2 신호전달을 자극하는 과효능제이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포는 새로 단리된 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 새로 단리된 CD8+ 세포는 TIL이다. 다른 실시양태에서, CD8+ T 세포는 활성화된 CD8+ T 세포이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 CAR T 세포, TCR 조작된 세포, 조작된 Treg 또는 조작된 NK 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 조작된 면역 세포이다.

[0261] STAT5 및 ERK1/2 신호전달은, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 STAT5 및 ERK1/2의 인산화에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, STAT5 및 ERK1/2 인산화는 이들 분자의 인산화 버전에 특이적인 항체를 사용하여 측정될 수 있다.

[0262] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법의 실시예 유용한 본 개시내용 뮤테인의 hIL2 뮤테인은 야생형 hIL2와 비교하여 림프구 증식을 유도하는 hIL2 뮤테인의 능력에 의해 측정시 부분, 완전 또는 과효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 림프구 증식을 유도하는 수준의 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 미만인 수준으로 림프구 증식을 유도하는 부분 효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 림프구 증식을 유도하는 수준의 95% 내지 105%의 수준으로 림프구 증식을 유도하는 완전 효능제이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 야생형 IL2가 동일한 세포 유형에서 림프구 증식을 유도하는 수준의 105% 초과, 대안적으로 110% 초과, 대안적으로 120% 초과, 대안적으로 150% 초과, 대안적으로 200% (2배) 초과, 대안적으로 300% (3배) 초과 수준으로 hIL2 수용체 양성 면역 세포에서 림프구 증식 신호전달을 유도하는 과효능제이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포는 새로 단리된 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 새로 단리된 CD8+ 세포는 TIL이다. 다른 실시양태에서, CD8+ T 세포는 활성화된 CD8+ T 세포이다. 특정한 실시양태에서, 면역 세포는 CAR T 세포, TCR 조작된 세포, 조작된 Treg 또는 조작된 NK 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 조작된 면역 세포이다. 일부 실시양태에서, 림프구는 T 세포이다. 특정한 실시양태에서, 림프구는 1차 CD8+ T 세포이다. 다른 실시양태에서, 림프구는 활성화된 CD8+ T 세포이다. 면역 세포 증식은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 림프구 증식은 본원에 기재된 바와 같이 카르복시플루오레스세인 디아세테이

트 숙신이미딜 디에스테르 (CFSE) 희석 검정을 사용하여 또는 [31-1]-티미딘 혼입에 의해 측정될 수 있다.

[0263] 화학식 1의 hIL2 뮤테인은 CD122 및 CD132 수용체 성분 둘 다에 대한 결합을 보유하기 때문에, hIL2 뮤테인은 자연 킬러 (NK) 세포의 부분 효능제로서 작용할 수 있다. NK 세포의 IL2 활성화는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 IL2 유도된 CD69 발현 및/또는 세포독성을 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0264] hIL2 뮤테인의 시험관내 평가:

[0265] 본 개시내용의 야생형 hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 갖는 hIL2 뮤테인의 활성 및 CD25 발현 세포의 그의 우선적 활성화를 입증하기 위해, 일련의 hIL2 뮤테인을 제조하고, YT 세포, IL2 수용체의 중간 친화도 이량체 형태를 발현하는 NK 세포, 및 고친화도 삼량체 IL2 수용체의 모든 3종의 성분을 발현하는 인간 면역 세포를 생성하는 그의 표면 상에 CD25를 발현하도록 변형된 YT 세포 (iCD25+)인 YT CD25로 지칭되는 YT 세포 변이체의 선택적 활성화를 제공하는 그의 능력에 대해 평가하였다.

[0266] CD132와 계면에 있는 위치 18, 22 및/또는 126에서의 아미노산 치환을 포함하는 화학식 1의 일련의 예시적인 hIL2 뮤테인을 제조하고 시험하였다. 분자는 실질적으로 본원의 실시예 1-7의 교시에 따라 제조되고 시험되었다. 이들 실험의 결과는 첨부된 도면의 도 1, 2 및 3에 제공된다. 도 1에 도시된 바와 같이, 위치 18, 22 및/또는 126에서 hIL2의 hCD132에 대한 결합에 관여하는 아미노산 치환을 포함하는 hIL2 뮤테인은 pSTAT5 신호전달의 유의한 증가를 입증하였으며, 이는 YT CD25 세포에서 hIL2 뮤테인이 wt hIL2에 비해 유의한 hIL2 활성을 보유함을 입증한다. 도 2에 예시된 바와 같이, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 CD25 음성 YT 세포에 비해 CD25 양성 YT CD25 세포에 대해, 야생형 hIL2에 비해 우선적인 pSTAT5 신호전달 활성을 입증하였다. 이들 분자의 희석으로부터의 데이터는 첨부된 도면의 도 3에 제공된다.

[0267] CD4 양성 인간 T 세포, 3F8 세포에서의 활성에 대해 본 개시내용의 추가의 hIL2 뮤테인을 평가하기 위해 추가의 연구를 수행하였다. 3F8 세포주는 EBV 형질전환된 B 세포주 JY로 건강한 인간 공여자로부터 수득된 PBMC의 활성화에 의해 생성하였다. CD4 양성 T 세포 클론 3F8은 CD25 및 CD122를 발현하고, IL-2에 대한 반응으로 IFN γ 를 증식 및 생성한다. 하기 표 5에 상술된 바와 같은 화학식 1의 추가의 대표적인 hIL2 뮤테인을 본원의 실시예 8의 교시에 따라 3F8 세포에서의 증식 활성 및 IFN γ 생성에 대해 평가하였다. 이 실험으로부터의 데이터는 하기 표 5 및 첨부된 도면의 도 4 (세포 증식) 및 도 5 (IFN γ) 생성에 제공된다. IC₅₀을 형질감염 상청액 중 단백질 농도에 대해 보정하였다.

표 5. hIL2 뮤테인에 대한 반응으로 인간 CD4 양성 T 세포 클론 3F8에 의한 증식 및 IFN γ 생성		
구축물	증식 IC ₅₀ (pM)	IFN γ 생성 IC ₅₀ (pM)
IL-2	30.7	19.7
REK	14.2	17.7
REE	33.0	18.4
REM	32.6	12.7
REV	20.8	21.2
REL	68.4	33.8
REF	37.6	38.3
REN	13.7	15.7
RER	13.1	13.1
REY	19.3	22.1
AEK	13.7	19.0
EEK	36.0	58.7
VEK	15.5	4.6
HEK	20.9	30.4
IEK	10.0	8.8
RTK	62.8	NA

[0268]

[0269] 표 5 및 도 4 및 5의 상기 데이터는 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 갖는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인이 CD25+/CD122+ 인간 면역 세포로부터의 IFN γ 의 증식 및 생성을 자극하는데 효과적이라는 것을 입증한다.

[0270] 항신생물 활성의 평가

- [0271] 본 개시내용은 신생물성 질환의 치료 및/또는 예방에 hIL2 뮤테인을 사용하는 조성물 및 방법을 제공하며, 여기서 인간 IL2 뮤테인은 다른 특성 중에서 wt hIL2에 비해 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 나타낸다. 이러한 접근법의 유용성을 입증하기 위해, 설치류 및 비-인간 영장류에서 치료 효능, 독성 및 약동학을 평가하기 위한 추가의 시험관내 특징화 연구 및 생체내 연구를 하기에 보다 상세하게 기재된 바와 같이 수행하였다. 누적하면, 이들 연구의 결과는 치료상 유효하고 내약성이 우수한 용량 및 노출에서 본 개시내용의 hIL2 뮤테인이 (a) 고친화도 hIL-2 수용체를 발현하는 인간 면역 세포, 특히 항원 활성화된 T 세포, 항원 경험 T 세포 및 조절 T 세포의 선택적 활성화 및/또는 증식; (b) 혈관 누출 증후군 (VLS)의 보다 낮은 증거를 비롯하여 wt hIL2 보다 유의하게 더 낮은 독성을 제공하면서; (c) NK 세포 또는 나이브 CD25 음성 T 세포에 대해 유의하게 감소된 생물학적 활성을 나타내는 것을 입증한다.
- [0272] hIL2 뮤테인 시험 작용제: 포유동물 대상체에서 신생물성 질환의 효과적인 치료에서 본 개시내용의 hIL2 뮤테인의 유용성을 입증하는 이들 광범위한 시험관내 특징화 연구 및 생체내 연구를 수행하기 위해, 위치 L18, Q22 및 Q126 치환에서 아미노산 치환을 포함하는 화학식 1의 예시적인 hIL2 뮤테인을 화학식 1의 화합물의 대표적인 구성원으로서 평가하였다. 이전에 논의된 바와 같이, 위치 L18, Q22 및 Q126에서의 hIL2의 변형은 hCD132에 대해 조정된 친화도를 갖는 hIL2 뮤테인을 제공하지만, 전형적으로 wt hIL2에 필적하는 hCD25 및 hCD122에 대한 결합을 나타낸다. 2개의 대표적인 L18, Q22 및 Q126-변형된 hIL2 뮤테인 (STK-008 및 STK-011) 및 대응 무린 IL2 (mIL2) 뮤테인 (STK-014) (그의 구조는 하기 제공됨)을 이들 연구에 사용하였다.
- [0273] STK-008: 화학식 1의 예시적인 hIL2 뮤테인은 아미노산 치환 L18R, Q22E 및 Q126H를 포함하고 추가로 본원에서 des-Ala1 REH, REH 및 STK-008로 지칭되는 Ala1의 결실을 포함하는 인간 IL2 뮤테인이다. STK-008의 아미노산 서열은 하기에 제공된다 (서열식별번호: 7):
- PTSSSTKKTQLQLEHLRLDLEMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL
QCLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA
TIVEFLNRWITFC~~HS~~SHSTLT (SEQ ID NO:7)
- [0274] STK-011: 화학식 1의 제2의 예시적인 hIL2 뮤테인은 아미노산 치환 L18R, Q22E 및 Q126K를 포함하고 추가로 본원에서 des-Ala1 REK, REK 및 STK-011로 지칭되는 Ala1의 결실을 포함하는 인간 IL2 뮤테인이다. STK-011의 아미노산 서열은 하기에 제공된다 (서열식별번호: 8):
- PTSSSTKKTQLQLEHLRLDLEMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL
KHLQCLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY
ADETATIVEFLNRWITFC~~K~~SHSTLT (SEQ ID NO:8)
- [0275] STK-011 및 STK-008 폴리펩티드의 샘플을 통상적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 이. 콜라이(E. coli)에서 재조합적으로 생성하고, 투석, 이온 교환 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 포함한 통상적인 절차에 의해 실질적으로 순수한 형태로 분리하였다. hIL2 분자의 위치 1에 전형적으로 존재하는 알라닌을 결실시킴으로써, N-말단 메티오닌은 알라닌보다는 N 말단 메티오닌 옆의 위치에서의 프롤린에 의해 박테리아 생성자 세포에 의해 보다 효율적으로 제거되고, 이는 추가의 작용제, 예컨대 담체 또는 표적화 분자가 hIL2 폴리펩티드의 N-말단에 접합되는 경우에 보다 일관된 시약을 생성하는 실질적으로 순수한 균질한 단백질 생성물을 생성하기 위한, 증가된 공정 효율, 보다 낮은 비용, 및 단순화된 정제 및 재폴딩과 같은 경제적 및 기술적 이점 둘 다를 제공하는 실질적으로 보다 많은 hIL2 균질한 생성물의 발현 및 회수를 발생시킨다. 이전 보고에 나타나고 본 연구에 의해 확인된 바와 같이, 위치 1에서의 알라닌의 제거는 생성된 hIL2 폴리펩티드의 생물학적 활성을 실질적으로 변형시키지 않는다.
- [0276] wt hIL2에 비해 STAT5의 인산화에 의해 평가된 바와 같은 IL2 수용체를 통한 신호전달을 제공하는 REH 및 REK의 능력을 실질적으로 이전 연구에 따라 및 실시예 1-7에 보다 완전히 기재된 바와 같이 YT CD25 (CD25 양성) 및 YT (CD25 음성) 세포에서 평가하였다. 간략하게, 293T 세포를 IL-2 뮤테인 구축물로 형질감염시키고, 2-3일 후, 가용성 hIL2 뮤테인을 함유하는 상청액을 제거하였다. 상청액을 20분 자극 후에 YT 및 YT CD25 세포에 첨가하였다. YT 세포는 검출가능한 수준의 CD25를 내인성으로 발현하지 않는 NK 림프종 세포주이다. YT 세포 및 CD25를 외인성으로 발현하는 유도체 YT 세포 ("YT CD25")의 IL-2 반응을 비교하였다. YT CD25 세포 상의 IL-2 수용체의 성분의 발현을 형광 유동 세포측정법에 의해 확인하고, 데이터를 첨부된 도면의 도 6에 제시하였으며, 패널 A 및 B는 각각 YT 세포 및 YT CD25 세포에 의한 CD25 (IL2R α), CD122 (IL2R β) 및 CD132 (IL2R γ)의 발현을 입증한다. 채워진 히스토그램은 염색된 세포를 나타내고, 파선 히스토그램은 비염색된 대조군 세포를 나타낸다. 게이트는 각각의 염색에 대한 퍼센트 양성 세포를 나타낸다. pSTAT5 수준을 유동 세포측정법에 의해

A P T S S S T S S S T A E A Q Q Q Q H L E Q L R
M D L E E L L S R M E N Y R N L K L P R M L T F K
F Y L P K Q A T E L K D L Q C L E D E L G P L R H
V L D L T Q S K S F Q L E D A E N F I S N I R V T
V V K L K G S D N T F E C Q F D D E S A T V V D F
L R R W I A F C H S I I S T S P Q (서열식별번호: 11)

[0286]

[0287]

상기 IL2 폴리펩티드는 상기 STK-010 및 STK-012의 제조에 사용된 바와 같은 구조의 PEG 링커로 N-말단 PEG화되어 STK-014 분자를 완성한다.

[0288]

STK-014가 STK-012에 대한 유효한 대응물임을 입증하기 위해, 연구를 수행하여 마우스 및 인간 세포에 대한 표적 특이성을 평가하였다. 항-CD3/항-CD28 자극에 의해 활성화된 1차 인간 CD8+ T 세포 및 1차 인간 NK 세포에서 포스포-STAT5 (pSTAT5)를 유도하는데 있어서 각각의 분자의 EC₅₀을 비교함으로써 인간 야생형 IL-2 (huIL-2) 및 STK-012의 상대 효력을 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 세포 유형 둘 다를 신선한 공여자 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)로부터 분리하였다. STK-014는 무린 IL2 뮤테인이기 때문에, 이를 마우스 비장으로부터 새로 분리된 동등한 세포 집단에 대해 시험하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 8에 제공된다:

표 8. pSTAT5 검정에서의 인간 및 무린 IL2 뮤테인의 효력			
시험 조건	hIL2	STK-012	STK-014
CD25+ CD8+ / NK 선택성 (p-STAT5)	5.6	> 10 ³	> 10 ⁶
CD25+ CD8+ / CD25- CD8 선택성 (p-STAT5)	1.75	> 10 ³	> 10 ⁶

[0289]

[0290]

표 8에 제공된 데이터는 STK-014가 STK-012가 인간 세포 상에서 나타나는 것과 유사한 마우스 세포 상에서의 표적 특이성을 보유하기 때문에 STK-014가 생체내 효능 모델에서 사용하기 위한 STK-012에 대한 유효한 대응물을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0291]

마우스에서 STK-014를 사용한 생체내 효능 연구

[0292]

여러 생체내 효능 및 생체내 약리학 연구를 인간 STK-012에 대한 마우스 대응물로서 작용하는 STK-014를 갖는 마우스에서 수행하였다. 이들 연구를 수행하여 생체내에서 항원 활성화된 T 세포를 확장 및 활성화시키는 STK-014의 능력을 평가하고, 마우스 종양 모델에서 STK-014 단독 및 항-PD-1과 조합된 것의 항종양 효능 및 독성을 시험하였다. 추가적으로, 투여된 분자의 독성을 독성학 연구에 수반된 동물에서 평가하였다. STK-014의 활성을 PEG화 야생형 마우스 IL-2 (mPEG-IL-2)와 비교하였다. STK-014는 mPEG-IL-2와 비교하여 T 세포에 의한 개선된 항종양 활성 및 증가된 종양 침윤, 뿐만 아니라 유의하게 감소된 치사율 및 모세혈관 누출 증후군 (CLS)의 감소된 증거를 포함한 mPEG-IL-2에 비해 개선된 독성을 나타냈다. STK-014는 유의한 CLS의 치사율 또는 증거를 나타내지 않았다.

[0293]

STK-014의 최대 허용 용량의 확립: 임상 종양학 실시에서 IL-2는 재조합 IL-2의 짧은 반감기를 극복하기 위해 높은 혈청 노출을 유지하도록 1일당 3x 용량 스케줄로 최대 허용 용량 (MTD)으로 또는 그에 근접하여 투여된다 (Atkins, et al. 상기 문헌). 생체내 연구를 위한 PEGmIL2 및/또는 STK-014의 최대 허용 용량을 확립하기 위해, 재조합 mIL-2, N-말단에 공유 연결된 40 kD PEG 모이어터를 갖는 PEG화 마우스 야생형 IL-2 (PEGmIL-2) 및 STK-014에 대한 MTD를 확립하였다. C57BL/6 마우스에게 5일 동안 1일 3회 투여하였다. wt IL-2를 3x/일 투여하였다. 모든 다른 분자는 격일로, 제3일에 틀리게 투여하여 투여하였고, 따라서 제0일-제2일-제3일-제5일-제7일-제9일에 재조합 mIL-2를 투여하고, 격일로 PEG-mIL2 또는 STK-014를 도 9의 범례에 제공된 투여량으로 투여하였고, 연구 결과의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 플롯은 첨부된 도면의 도 9에 제시된다. 도 9에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, 치사율은 mIL-2 및 PEGmIL-2 (5 µg q.o.d.의 용량에서) 둘 다에서 관찰되었으나 STK-014에서는 그렇지 않았다. 상기 데이터는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인이 wt hIL2에 비해 감소된 독성을 보유한다는 것을 입증하고, HD-hIL2에 비해 유의한 안전성 이점을 시사한다.

[0294]

PEGmIL-2 및 STK-014에 대한 반응으로 모세혈관 누출의 평가: HD-IL-2를 받은 환자는 3일 이상의 연속 HD-IL-2 치료 또는 8시간 간격으로 주어진 8회 용량의 중앙값을 받은 후에 급성 저혈압 및 CLS를 갖는다. MTD를 확립하기 위한 상기 언급된 연구에서, 폐를 연구 종료 시에 또는 조기 종결 또는 사망 시에 (mIL-2 처리된 동물에서) 수거하였다. CLS에 대한 척도로서, mIL-2 또는 STK-014로 처리된 마우스로부터의 폐의 물 함량을 신선한 폐의 중량에서 건조 후 폐 중량을 뺀 차이로서 계산하였다. 본 연구의 결과는 첨부된 도면의 도 10에 제시되어

있다. 도 10에 제공된 데이터가 예시하는 바와 같이, HD-IL-2 또는 PEGmIL-2로 처리된 동물은 모세관 누출을 나타내는 증가된 부종 폐 중량을 가졌지만, STK-014에 의한 마우스는 그렇지 않았다.

[0295] CLS의 조기 발병 동안 STK-014를 IL-2와 직접 비교하기 위해, 마우스를 3일 동안 PEG-mIL2 또는 STK-014의 2회 용량으로 2일 간격으로 도 11의 범례에 나타난 용량 수준으로 처리하였다. 추가로, wt mIL2 (PEG화되지 않음)를 12.2 ug (HD-마우스 IL-2)의 용량으로 투여하여 HD-hIL2 요법을 시뮬레이션하였다. 부종 폐 중량을 총 출발 체중과 관련하여 결정하였다. 본 연구의 결과는 첨부된 도면의 도 11에 제시되어 있다. 도 11에 제공된 데이터가 예시하는 바와 같이, HD-IL-2, PEGmIL-2로 처리된 동물은 모세관 누출을 나타내는 증가된 부종 폐 중량 대 체중 비를 가졌지만, STK-014를 갖는 마우스는 그렇지 않았다. 상기 데이터는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인이 wt hIL2에 비해 CLS의 감소된 위험을 보유함을 입증하고, 인간 대상체의 치료에서 HD-hIL2에 비해 유의한 안전성 이점을 시사한다.

[0296] 동계 CT26 결장암 모델에서의 STK-014의 평가:

[0297] STK-014의 항종양 효능을 Balb/C 마우스의 무린 CT-26 결장 암종 모델에서 시험하였다. 연구 설계 및 처리군은 하기 표 9에 요약된다:

표 9 STK-014의 항-종양 효능을 평가하는 연구 설계				
그룹	세포	처리	용량 및 투약	마우스/그룹
1	CT-26 (3x10 ⁵ 개 세포)	PBS	qod.	9마리
2	CT-26 (3x10 ⁵ 개 세포)	mIL-2 천연	10 µg q.d.	9마리
3	CT-26 (3x10 ⁵ 개 세포)	PEG-mIL-2	2µg qod	9마리
4	CT-26 (3x10 ⁵ 개 세포)	STK-014	10 µg qod	9마리

[0298]

[0299] 간략하게, CT-26 결장 암종 (3 x 10⁵ 개 세포)을 피하로 주사하고, 종양을 >100 mm³의 종양 크기로 성장시키고, 종양 세포 이식 후 10일 후에 처리를 시작하였다. 마우스에게 표 9에 따라 투여하였다. 치료 단계 동안, 종양 크기를 캘리퍼 측정에 의해 1주에 2회 측정하였다. 이러한 CT26 연구의 결과는 첨부된 도면의 도 12에 그래프로 제시된다. 도 12에 제시된 바와 같이, STK-014 처리군 (군 4)만이 CT-26 결장 암종 모델에서 마우스의 50% 초과에서 종양의 거부를 발생시켰다. 이 데이터는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인 (그의 PEG화 변이체 포함)이 wt hIL2 요법에 비해 인간 대상체에서 개선된 항종양 효능을 보유함을 시사한다.

[0300] CT-26 종양 모델에서의 종양 침윤 T 세포의 분석: 상기 CT26 종양 모델 연구의 동물로부터 수거된 기관을 면역 조직화학에 의해 평가하였다. 조직의 면역조직화학적 분석은 STK-014 처리된 마우스의 종양이 PEG-mIL-2와 비교하여 종양내 CD8+ T 세포의 강건한 확장을 나타냈음을 입증한다 (도 13 패널 A). 종양내 CD25+ CD8+ T 세포의 훨씬 더 큰 확장이 종양에서 관찰되었으며, 이는 STK-014의 CD25 선택성을 나타낸다 (도 13 패널 B). Treg를 포함한 CD25+ T 세포는 또한 STK-014 처리에 의해 강하게 확장되었고, 비장에서 PEG-IL-2에 의해 더 적은 정도로 확장되었다 (도 14). 인간 종양에서의 T 세포의 침윤은 종양 병기결정에 관계없이 개선된 환자 생존과 예후적으로 연관된다 (Fridman, et al. 2012). 유사하게, 면역 체크포인트 차단에 대한 반응은 종양에서의 CD8+ T 세포의 높은 침윤과 상관관계가 있다 (Tumeh, et al. 2014). 결과적으로, 화학식 1의 hIL2 뮤테인의 무린 대용물인 STK-014로 관찰된 CD8+ T의 증가된 종양내 침윤은 본 개시내용의 hIL2 뮤테인이 유사하게 인간 암 환자에서 개선된 임상 결과와 연관된 종양내 T 세포의 이러한 증가를 나타낸다는 것을 시사한다.

[0301] MC38 동계 결장암 모델:

[0302] 상기 CT-26 결장 암종 연구에 추가로, 본 개시내용의 대표적인 조성물 및 방법을 MC-38 결장암 모델에서 평가하였다. MC38 연구를 위한 연구 설계 및 처리군은 하기 표 10에 요약된다:

표 10. MC-38 결장 암종의 항-종양 효능을 평가하는 연구 설계				
그룹	세포	처리	용량	마우스/그룹
1	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	PBS	q.d.	8마리
2	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	PEG-mIL-2	2 µg q.o.d.	8마리
3	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	STK-014	3.3 µg q.o.d.	8마리
4	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	STK-014	10 µg q.o.d.	8마리

[0303]

[0304]

간략하게, MC-38 결장암 세포 (1 x 10⁶ 개 세포)를 마우스에 피하 주사하고, 18일 동안 국부 종양을 형성하도록 하였다. 마우스를 비처리 상태로 두거나 또는 제18일부터 STK-014로 처리하였다. STK-014 처리는 관찰 기간 전반에 걸쳐 계속되었다. 본 연구의 결과는 첨부된 도면의 도 15에 제시되어 있다. 예시된 바와 같이, STK-014로의 처리는 종양 제어 및 퇴행을 유도한 반면, PEG-mIL-2 단독요법은 종양을 제어하는 감소된 능력을 나타냈다.

[0305]

증가된 종양내 CD8+ T 세포: 상기 MC38 종양 모델 연구의 동물로부터 수거된 기관을 면역조직화학에 의해 평가하였다. 조직의 면역조직화학적 분석은 STK-014 처리된 마우스의 종양이 PEG-mIL-2와 비교하여 종양내 CD8+ T 세포의 강건한 확장을 나타냈음을 입증한다. 도 16a에 제시된 바와 같이, PEG-mIL-2로의 처리는 MC-38 종양에서 종양내 CD8+ T 세포의 수를 증가시켰지만, STK-014로의 처리는 MC-38 종양 내로의 T 세포 침윤을 추가로 개선시켰다. 유사하게, 도 16b에 제시된 바와 같이, STK-014는 또한 MC-38 종양에서 CD8+ CD25+ T 세포의 수를 증가시켰다.

[0306]

혈관 누출 증후군: 이전에 논의된 바와 같이, wt hIL2 (특히 HD-hIL2) 요법은 특히 혈관 누출 증후군 ("VLS")으로부터 발생하는 유의한 독성을 유발한다. 본 개시내용의 예시적인 hIL2 뮤테인을 하기에 보다 상세하게 논의된 바와 같이 마우스 및 비-인간 영장류에서 생체내 평가하였다. 마우스 독성 모델에서 STK-014는 혈관 누출 증후군의 유도 없이 감소된 독성을 나타냈다. 동계 마우스 종양 모델에서 STK-014를 사용한 효능 연구에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 wt hIL2에 비해 유리한 독성을 제공한다.

[0307]

마우스에서의 VLS의 평가: VLS는 체중 증가 및 부종 기관 중량 증가와 연관되지만, 무기력증으로 인한 전체 체중 감소와 연관된다. 간략하게, 마우스에게 대조군으로서 포스페이트 완충 염수, 1.25, 2.5, 5 및 10 마이크로그램의 투여량으로 STK-014를 매일 투여하는 실험을 수행하였다. 도 18에 제시된 바와 같은 이러한 실험의 결과는 유의한 체중 감소를 입증하지 않았고 (시험 동물에서 8% 미만), 이는 본 개시내용의 조성물로의 처리에 대한 반응으로 마우스에서의 VLS의 부재를 나타낸다. VLS와 연관된 체중 증가 이외에, 체중의 실질적인 감소는 마우스에서의 전신 독성을 나타낸다. 1일 3회 제공된 12.2 마이크로그램의 용량에서의 야생형 무린 IL2 뿐만 아니라 2.5, 5 및 10 마이크로그램의 투여량에서의 40 kD N-말단 PEG화 wt mIL2 분자의 효과를 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 실험의 결과는 첨부된 도면의 도 19에 그래프 포맷으로 제공된다. 도 19에 제시된 바와 같이, wt mIL2는 마우스에서 유의한 체중 감소를 유발하며, 이는 연장된 지속기간 PEG화 wt mIL2 분자에 의해 악화된다. 대조적으로, 도 19의 데이터는 유사하게 PEG화된 mIL2 REH 변이체가 유의한 체중 감소를 유도하지 않았음을 입증한다. 집합적으로, 이들 데이터는 본 개시내용의 분자가 천연 및 장기-작용 형태 둘 다에서 야생형 IL2에 비해 감소된 독성을 보유한다는 것이다.

[0308]

마우스에서의 생체내 약리학 데이터의 요약: 면역 요법의 이익은 종종 이펙터 T 세포 대 조절 T 세포의 상대적 증가와 상관관계가 있다. STK-014는 종양에서 CD8/Treg 비를 가장 유의하게 증가시켰다 (도 17). 동계 마우스에서 STK-014를 사용한 효능 연구에서, STK-014는 wt-mIL-2와 비교하여 종양내 T 세포의 유의하게 더 강한 활성화 및 확장을 유도한다. 처리된 마우스의 종양에서의 T 세포의 분석은 PEG-IL-2와 비교하여 STK-014에 대한 반응으로 종양내 CD8+ T 세포의 강건한 확장을 나타냈다. CD25+ CD8+ T 세포에서 훨씬 더 큰 증가가 관찰되었으며, 이는 STK-014의 CD25 선택성을 나타낸다. Treg를 포함한 CD25+ T 세포는 또한, 비장에서 STK-014 처리에 의해 강하게 확장되었고, PEG-IL-2에 의해 더 적은 정도로 확장되었다. 추가로 STK-014 처리는 마우스에서 HD-IL-2 연관 치사율 및 모세혈관 누출 증후군을 유도하지 않았다. STK-014는 동계 종양 모델에서 종양 제어 / 완전 반응을 유도하였다. STK-014 투여는 종양 침윤 CD8+ T 세포, CD25+CD8+ T 세포 및 그랜자임 (데이터는 제시되지 않음) 발현 세포의 수를 증가시킨다.

[0309]

STK-014와 항-PD-1의 조합 효능: 항-PD-1 면역 체크포인트 차단인 인간 종양의 면역 요법의 특징이다. 항-PD-1을 사용한 STK-014 조합 치료를 항-PD-1 요법에 부분적으로 반응성인 MC-38 종양에서 평가하였다. 면역 조정

종양 미세환경이 발생하도록 하기 위해 치료의 시작 전에 MC-38 종양을 잘 확립하였다. 마우스를 항-PD-1, PEG-mIL-2 또는 STK-014 단독으로 또는 조합으로 처리하였다 (표 11).

표 11. MC38 종양 모델에서의 STK-014 및 PD1 억제제를 사용한 조합 치료를 위한 연구 설계

그룹	세포	처리	용량	마우스
1	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	PBS	q.d.	10마리
2	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	항-PD-1	10 mg/kg q4d	10마리
3	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	PEG-mIL-2	0.125 mg/kg qod	10마리
4	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	STK-014	0.5 mg/kg qod	8마리
5	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	항-PD-1 / PEG-mIL-2	10 mg/kg q4d / 0.125 mg/kg qod	10마리
6	MC-38 (1x10 ⁶ 개 세포)	항-PD-1 / STK-014	10 mg/kg q4d / 0.5 mg/kg qod	8마리

상기 연구의 결과는 첨부된 도면의 도 20에 제공된다. PEG-IL-2 및 STK-014 둘 다는 이 종양 모델에서 부분 반응을 유도하는 단일 작용제 효능을 가졌다. 어느 하나의 작용제와 항-PD-1의 조합은 STK-014 + 항-PD-1 조합물에서 항종양 효능을 100% 완전 반응으로 증가시켰다 (도 20). 추가로, 종양내 T 세포의 존재를 상기와 같이 평가하고, 결과를 첨부된 도면의 도 21에 제공하였다. 제시된 바와 같이, STK-014 및 항-PD-1의 조합은 마우스 모델에서 종양 근질을 발생시키고, 종양내 CD8+ T 세포의 증가된 수와 연관된다.

비-인간 영장류 연구:

마우스에서의 상기 독성 연구에 추가로, STK-012를 비-인간 영장류 (NHP) 독성학 연구에서 평가하였다. STK-012는 2주 약동학 (PK) 및 내약성 연구에서 과-효능 용량 및 노출에서 내약성이 있었다. 요약하면, STK-012 및 그의 묶린 대용물 STK-014는 유의하게 더 높은 노출에도 불구하고 PEG화 묶린 IL-2와 연관된 독성을 나타내지 않았다.

비-인간 영장류에서의 STK-012의 비-GLP 내약성 및 독성학 연구: 시노물구스 원숭이에서의 STK-012에 대한 비-GLP 내약성 및 독성동태학적 다중 상승 용량 (MAD) 연구를 스폰서에 의해 수행하였다. 비인간 영장류 (NHP)에게 최대 2주 동안 및 최대 2회 용량 동안 하기 STK-012를 투여하였다 (표 12):

표 12. 비-인간 영장류에서의 비-GLP 내약성 및 독성학 연구에 대한 용량 빈도 및 용량 수준

그룹	시험 물질	투여 빈도	용량 수준 (mg/kg)	
			제1일	제8일
1	프로류킨 (대조군)	단일 투여	0.037	-
2	STK-012	q7d	0.01	0.05
3	STK-012	q7d	0.1	0.36

혈청 PK, 시토카인 분석, 세포 유동 세포측정법, 임상 화학 및 혈액학 분석을 연구 전반에 걸쳐 수행하였다. 기관의 육안 및 현미경 분석을 말단 테이크다운에서 수행하였다. 재조합 인간 IL-2 (프로류킨)를 양성 대조군으로서 사용하였다.

STK-012의 독성동태학적 분석: STK-012의 혈청 농도는 STK-012 SC 주사 후에 급속하게 증가하여, 주사 후 (PI) 24시간에 C_{max}에 도달하였다. STK-012 노출은 T_{1/2}가 11시간인 중간 IL-2 수용체에 결합하는 유사한 크기의 PEG-IL-2 묶체인 (Milla, et al. 2018)과 비교하여, 용량 사이에 느린 클리어런스 (7일)로 안정하였다 (도 22). STK-012의 T_{1/2}는 제1 용량 후 23-27시간이었다 (표 13).

표 13. 시노물구스 원숭이에서의 STK-012의 약동학적 데이터

그룹	STK-012 / 일	투여 빈도	용량 (mg/kg)		$T_{1/2}$ (h)	AUC (h*ng/mL)
			용량 (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)		
1	프로류킨	단일 투여	0.037	7.66	n.d.	n.d.
2	STK-012 제1일	q7d	0.01	154	27.53	13,800
2	STK-012 제8일	q7d	0.5	970	19.18	60,400
3	STK-012 제1일	q7d	0.1	1570	23.43	155,000
3	STK-012 제8일	q7d	0.36	2920	13.78	210,000

STK-012의 약역학적 평가: STK-012는 NHP 연구에서 T 세포의 CD25+ CD122+ 하위세트로 제한된 STAT5 인산화를 포함한 생물학적 활성을 나타냈다 (도 24). 0.05 mg/kg 이상의 STK-012 용량은 혈액 중 CD25+CD4+ T 세포의 하위세트에서 인산화 STAT5 (P-STAT5)를 유도하였다. STK-012는 용량 간격 전반에 걸쳐 STK-012 감수성 집단에서 P-STAT5 양성을 유지하기에 충분한 수준으로 지속되었다 (도 23). STK-012는 최근 TCR 매개된 CD25 및 CD122의 상향조절을 갖는 T 세포를 특이적으로 표적화하는 것을 목표로 한다. 농도에 따라, STK-012는 표면 상에 높은 수준의 CD25 및 CD122를 발현하는 세포에서 STAT5 인산화를 특이적으로 유도하였다 (도 24). STK-012는 시험관내 및 시노물구스 원숭이에서 CD25+ T 세포에 특이적으로 결합하고 이를 활성화시킨다 (도 24). STK-012 특이성을 바탕으로, CD25+ CD8+ T 세포는 CD25- CD8+ T 세포보다 STK-012에 대한 반응으로 더 조기에 및 더 높은 백분율로 증식하였다 (KI-67+에 의해 검출됨) (도 25). CD25- CD8+ T 세포의 증식은 STK-012 투여 및 CDD25+ CD8+ T 세포의 증식과 관련하여 지연되고, 이는 CD25+ T 세포에 의한 wt IL-2 분비의 결과일 수 있다. CD28+ CD95+ CD8+ 중심 기억 T 세포 (Tcm)는 항원 경험 T 세포 집단을 나타낸다. 흑색종 환자에서, 항-PD-1 항체를 사용한 치료는 종양 반응과 상관관계가 있는 CD28+ Tcm의 증식 및 확장을 유도한다 (Huang, et al. 2017). STK-012 처리는 NHP의 혈액에서 CD28+ CD95+ CD8+ T 세포의 확장을 유도하였다 (도 26).

비임상 연구에서의 임상 관찰의 요약: 제8일에 0.36 mg/kg의 STK-012의 투여는 구부린 자세, 무기력증, 안검 폐윤, 각질이 일어난 피부, 무른 액체 분변을 포함한 임상 관찰에서의 거동 변화와 연관되었다. 수컷에서는 제9일, 제12일, 제14일 및 제15일에 및 암컷에서는 제14일 및 제15일에 구부린 자세가 나타났다. 수컷 동물에서 또한 제9일 및 제12일에 무기력증, 제12일에 감소된 활성, 제15일에 양측 안검 폐윤, 제9일 및 제12일에 좌측 뒷다리에 각질이 일어난 피부, 제11일 내지 제13일에 무른 분변 및 제9일 및 제10일에 액체 분변이 나타났다. 다른 STK-012 용량 수준의 동물에서는 시험 물품-관련 임상 관찰이 나타나지 않았다. 따라서, 본 연구에서 가장 높은 비-중증 독성 용량 (HNSTD)은 100 µg/kg이다.

병리학 평가 요약: 시험 물품-관련 현미경적 소견은 STK-012를 투여한 동물의 간, 신장 및 비장에서 주목되었다: 간에서의 최소 내지 중등도 혈관주위 혼합 염증 세포 침윤 (STK-012, 0.01/0.05 및 0.1/0.36 mg/kg); 비장 적색 속질에서의 단핵 세포의 최소 증가된 세포충실성 (STK-012, 0.1/0.36 mg/kg); 신장에서의 피질의 경도 단핵 세포 침윤 (STK-012, 0.01/0.05 및 0.1/0.36 mg/kg). 이환 부위는 문맥 및 중심 정맥 둘 다를 포함한 혈관주위 부위를 주로 포함하였지만, 간세포의 명백한 변성 또는 괴사는 관찰되지 않았다. 혈청 트랜스아미나제는 주목할 만하지 않았다.

STK-012는 고친화도 인간 IL-2R (CD25, CD122 및 CD132)에만 결합하고 이를 활성화시키는 구조적으로 변형된 IL-2이다. 이러한 표적 세포 선택성은 표적 매개 클리어런스를 감소시킬 수 있다. STK-012는 문헌 (Milla, Ptacin et al. 2018)에 기재된 프로류킨 (본 연구) 또는 다른 유사하게 PEG화된 IL-2와 비교 시 감소된 클리어런스를 나타냈고 높은 노출을 가졌다. 높은 혈청 노출에도 불구하고 STK-012는 높은 혈청 농도를 지속하면서 최대 100 µg/kg의 용량에서 내약성이 있다. STK-012는 CD25+ T 세포에서의 P-STAT5에 의해 나타난 바와 같이 강력하고 지속적인 생물학적 활성을 나타냈다.

변형된 약동학을 갖는 hIL2 뮤테인:

본 개시내용은 변형된 약동학적 (PK) 특성을 갖는 변형된 hIL2 뮤테인을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 변형된 PK 특성을 갖는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 포유동물 대상체에서 그의 작용 지속기간을 증가시키도록 변형된다. 이러한 PK 변형의 예는 1개 이상의 담체 단백질에의 접합, PEG화, 아실화, 또는 hIL2 뮤테인의 아미노산 서열 변형, 치환 또는 결실을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

일부 실시양태에서, 변형된 약동학적 (PK) 특성을 갖는 변형된 hIL2 뮤테인은 인간 대상체에서의 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 14일 또

는 30일 초과와 혈장 반감기를 포함한다.

- [0329] 아미노산 변형: 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 연장된 생체내 수명을 일으키도록 hIL2 뮤테인의 PK를 변형시키는 특정 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Dakshinamurthi, et al. (International Journal of Bioinformatics Research (2009) 1(2):4-13)]은 hIL2 폴리펩티드에서의 치환 V91R, K97E 및 T113N 중 1개 이상이 증진된 안정성 및 활성을 갖는 hIL2 변이체를 제공한다고 언급한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 V91R, K97E 및/또는 T113N 변형 중 1개, 2개 또는 3개 모두를 포함한다.
- [0330] 담체 분자에 대한 접합: 일부 실시양태에서, 변형된 PK 특성을 갖는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 1개 이상의 담체 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 PEG화, 글리코실화, 지방산 아실화 등에 의해 IgG, 알부민 또는 다른 분자의 Fc 도메인에 공유 연결되어 그의 반감기를 연장시킬 수 있다.
- [0331] 일부 실시양태에서, 변형된 PK 특성을 갖는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 연장된 생체내 노출을 용이하게 하기 위해 관련 기술분야에 공지된 알부민 분자 (예를 들어 인간 혈청 알부민)를 갖는 융합 단백질로서 발현된다. 본 발명의 한 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 알부민에 접합되며, 이는 본원에서 "hIL2 뮤테인 알부민 융합"으로 지칭된다. hIL2 유사체 알부민 융합의 맥락에서 사용된 용어 "알부민"에는 인간 혈청 알부민 (HSA), 시노 혈청 알부민, 및 소 혈청 알부민 (BSA)과 같은 알부민이 포함된다. 일부 실시양태에서, HSA는 야생형 HSA 서열에 비해 C34S 또는 K573P 아미노산 치환을 포함한다. 본 개시내용에 따라, 알부민은 카르복실 말단에서, 아미노 말단에서, 카르복실 및 아미노 말단 둘 다에서, 및 내부에서 hIL2 뮤테인에 접합될 수 있다 (예를 들어, USP 5,876,969 및 USP 7,056,701 참조). 본 개시내용에서 고려되는 HSA-hIL2 뮤테인 폴리펩티드 접합체에서, 다양한 형태의 알부민, 예컨대 알부민 분비 전구-서열 및 그의 변이체, 단편 및 그의 변이체, 및 HSA 변이체가 사용될 수 있다. 이러한 형태는 일반적으로 하나 이상의 원하는 알부민 활성을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 알부민, 알부민 단편, 및 알부민 변이체 등에 직접적으로 또는 간접적으로 융합된 hIL2 유사체 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 수반하며, 융합 단백질은 융합되지 않은 약물 분자에 비해 더 높은 혈장 안정성을 갖고/거나, 융합 단백질은 융합되지 않은 약물 분자의 치료 활성을 유지한다. 일부 실시양태에서, 간접적인 융합은 하기에서 더욱 충분하게 논의되는 바와 같이 링커, 예컨대 펩티드 링커 또는 그의 변형된 버전에 의해 이루어진다.
- [0332] 대안적으로, hIL2 뮤테인 알부민 융합은 알부민 결합 도메인 (ABD) 폴리펩티드 서열 및 IL2 뮤테인 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질인 IL2 뮤테인을 포함한다. 상기 언급된 바와 같이, 알부민 결합 도메인 (ABD) 폴리펩티드 서열 및 hIL2 유사체 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 HSA를 코딩하는 핵산, 또는 그의 단편을 하나 이상의 IL2 뮤테인 서열을 코딩하는 핵산에 연결시키는 유전자 조작에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 알부민-결합 펩티드는 아미노산 서열 ICLPRWGCLW (서열식별번호: 6)를 포함한다.
- [0333] 일부 실시양태에서, 변형된 PK 특성을 갖는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 크고 느리게 대사되는 거대분자, 예컨대 단백질; 다당류, 예컨대 세파로스, 아가로스, 셀룰로스, 또는 셀룰로스 비드; 중합체형 아미노산, 예컨대 폴리글루탐산, 또는 폴리리신; 아미노산 공중합체; 불활성화된 바이러스 입자; 불활성화된 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아, 파상풍, 콜레라, 또는 류코톡신 분자로부터의 유독소; 불활성화된 박테리아, 수지상 세포, 티로글로불린; 파상풍 유독소; 디프테리아 유독소; 폴리아미노산, 예컨대 폴리(D-리신:D-글루탐산); 로타바이러스의 VP6 폴리펩티드; 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌, 인플루엔자 바이러스 핵단백질; 키홀 림펫(Keyhole Limpet) 헤모시아닌 (KLH); 및 B형 간염 바이러스 코어 단백질 및 표면 항원과의 접합에 의해 달성된다. 이러한 접합된 형태는 필요한 경우 본 개시내용의 폴리펩티드에 대한 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0334] 일부 실시양태에서, 변형된 PK 특성을 갖는 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 PEG화와 유사한 연장된 기간을 제공하는 XTEN에의 접합에 의해 달성되고, 이. 콜라이(E. coli)에서 재조합 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 본 개시내용의 IL2 뮤테인과 함께 사용하기에 적합한 XTEN 중합체는 문헌 [Podust, et al. (2016) "Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers", J Controlled Release 240:52-66 and Haeckel et al. (2016) "XTEN as Biological Alternative to PEGylation Allows Complete Expression of a Protease-Activatable Killin-Based Cytostatic" PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0157193 June 13, 2016]에 제공된다. XTEN 중합체 융합 단백질은 XTEN 폴리펩티드와 IL2 뮤테인 사이에 프로테아제 민감성 절단 부위, 예컨대 MMP-2 절단 부위를 포함할 수 있다.
- [0335] 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 널리 공지된 화학적 접합 방법을 이용하여 이러한 담체 분자에 화학적으로 접합될 수 있다. 이관능성 가교 시약, 예컨대 관련 기술분야에 널리 공지된 동종기능성 및 이종기능성 가교 시약이 이

목적에 의해 사용될 수 있다. 사용하기 위한 가교 시약의 유형은 IL2 뮤테인에 커플링되는 분자의 성질에 따라 좌우되고, 관련 기술분야의 기술자에 의해 용이하게 확인될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, IL2 뮤테인 및 /또는 그가 접합되는 것으로 의도되는 분자는 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같이 두 개가 별도의 반응으로 접합될 수 있도록 화학적으로 유도체화될 수 있다.

[0336] PEG화: 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 하나 이상의 수용성 중합체에 접합된다. 본 발명의 실시예에 유용한 수용성 중합체의 예에는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리-프로필렌 글리콜 (PPG), 다당류 (폴리비닐피롤리돈, 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리올레핀성 알콜, 다당류, 폴리-알파-히드록시 산, 폴리비닐 알콜 (PVA), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린 (POZ), 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 또는 이들의 조합물이 포함된다.

[0337] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 접합되거나 또는 "PEG화"된다. IL2 뮤테인에 대한 PEG 부착의 방법 또는 부위가 다양할 수 있지만, 특정한 실시양태에서, PEG화는 IL2 뮤테인 활성을 변경시키지 않거나 또는 최소한으로만 변경시킨다.

[0338] 일부 실시양태에서, 시스템은 특정한 화학을 이용하여 N-말단 PEG화를 용이하게 하기 위해 위치 3에서 트레오닌을 치환시킬 수 있다 (3TC).

[0339] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인의 선택적인 PEG화 (예를 들어, Ptacin 등 (PCT 국제 출원 번호 PCT/US2018/045257 (2018년 8월 3일에 출원되고, 2019년 2월 7일에 국제 공개 번호 WO 2019/028419 A1로 공개됨)에 의해 기재된 바와 같이 선택적인 PEG 접합 화학을 용이하게 하기 위해 측쇄를 갖는 비-천연 아미노산을 포함시킴으로써)를 이용하여, IL2 수용체 복합체의 하나 이상의 서브유닛 (예를 들어 CD25, CD132)에 대해 감소된 친화도를 갖는 IL2 뮤테인을 생성할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 34-45, 61-72 및 105-109를 비롯하여 CD25와 상호작용하는 것으로 확인된 IL2의 이들 서열 또는 잔기에서 PEG화 가능한 특이적인 모이어티를 갖는 비-천연 아미노산을 포함하는 hIL2 뮤테인은 전형적으로 CD25에 대해 감소된 결합을 갖는 IL2 뮤테인을 제공한다. 유사하게, 아미노산 18, 22, 109, 126, 또는 119-133을 비롯하여 hCD132와 상호작용하는 것으로 확인된 IL2의 이들 서열 또는 잔기에서 PEG화 가능한 특이적인 모이어티를 갖는 비-천연 아미노산을 포함하는 hIL2 뮤테인은 hCD132에 대해 감소된 결합을 갖는 IL2 뮤테인을 제공한다.

[0340] 특정한 실시양태에서, 반감기에서의 증가는 생물학적 활성에서의 임의의 감소보다 크다. 폴리펩티드 서열에 대한 접합에 적합한 PEG는 일반적으로 실온에서 수용성이며, 일반식 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ 을 갖고, 여기서 R은 수소 또는 보호기, 예컨대 알킬 또는 알칸올 기이고, n은 1 내지 1000의 정수이다. R이 보호기인 경우, 이는 일반적으로 1 내지 8개의 탄소를 갖는다. 폴리펩티드 서열에 접합된 PEG는 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형 PEG 유도체, "스타-PEG" 및 다중-아암 PEG는 본 개시내용에서 고려된다.

[0341] 본 개시내용에서 사용되는 PEG의 분자량은 임의의 특정한 범위로 제한되지 않는다. PEG-IL2 뮤테인의 PEG 성분은 약 5 kDa 초과, 약 10 kDa 초과, 약 15 kDa 초과, 약 20 kDa 초과, 약 30 kDa 초과, 약 40 kDa 초과, 또는 약 50 kDa 초과인 분자량을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자량은 약 5 kDa 내지 약 10 kDa, 약 5 kDa 내지 약 15 kDa, 약 5 kDa 내지 약 20 kDa, 약 10 kDa 내지 약 15 kDa, 약 10 kDa 내지 약 20 kDa, 약 10 kDa 내지 약 25 kDa 또는 약 10 kDa 내지 약 30 kDa이다. 약 2,000 내지 약 80,000 달톤, 대안적으로 약 2,000 내지 약 70,000 달톤, 대안적으로 약 5,000 내지 약 50,000 달톤, 대안적으로 약 10,000 내지 약 50,000 달톤, 대안적으로 약 20,000 내지 약 50,000 달톤, 대안적으로 약 30,000 내지 약 50,000 달톤, 대안적으로 약 20,000 내지 약 40,000 달톤, 대안적으로 약 30,000 내지 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 PEG 분자. 본 발명의 한 실시양태에서, PEG는 2개의 20 kD 아암을 포함하는 40 kD 분지형 PEG이다.

[0342] 본 개시내용은 또한 접합체의 조성물을 고려하며, PEG는 상이한 n 값을 갖고, 따라서 다양한 상이한 PEG가 특정한 비로 존재한다. 예를 들어, 일부 조성물은 n=1, 2, 3 및 4인 접합체의 혼합물을 포함한다. 일부 조성물에서, n=1인 접합체의 백분율은 18-25%이고, n=2인 접합체의 백분율은 50-66%이고, n=3인 접합체의 백분율은 12-16%이고, n=4인 접합체의 백분율은 5% 이하이다. 이러한 조성물은 관련 기술분야에 공지된 반응 조건 및 정제 방법에 의해 생성될 수 있다. 크로마토그래피는 접합체 분획을 분해하기 위해 이용될 수 있고, 예를 들어 원하는 수의 PEG가 부착된 접합체를 함유하는 분획을 확인하고, 변형되지 않은 단백질 서열로부터 및 다른 수의 PEG가 부착된 접합체로부터 정제한다.

[0343] 폴리펩티드 서열에 대한 접합에 적합한 PEG는 일반적으로 실온에서 수용성이며, 일반식 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ 을 갖고, 여기서 R은 수소 또는 보호기, 예컨대 알킬 또는 알칸올 기이고, n은 1 내지 1000의 정수이다. R이 보호

기인 경우, 이는 일반적으로 1 내지 8개의 탄소를 갖는다.

- [0344] 2가지 널리 사용되는 1 세대 활성화된 모노메톡시 PEG (mPEG)는 숙신이미딜 카르보네이트 PEG (SC-PEG; 예를 들어 문헌 [Zalipsky, et al. (1992) Biotechnol. Appl. Biochem 15:100-114] 참조) 및 벤조트리아졸 카르보네이트 PEG (BTC-PEG; 예를 들어 Dolence 등의 미국 특허 번호 5,650,234 참조)이며, 이들은 리신 잔기와 우선적으로 반응하여 카르바메이트 연결을 형성하지만, 히스티딘 및 티로신 잔기와도 반응하는 것으로 공지되어 있다. PEG-알데히드 링커의 사용은 환원성 아미노화를 통한 폴리펩티드의 N-말단 상의 단일 부위를 표적화한다.
- [0345] PEG화는 폴리펩티드의 N-말단의 α-아미노 기, 리신 잔기의 측쇄 상의 엡실론 아미노 기, 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이미다졸 기에서 가장 빈번하게 발생한다. 대부분의 재조합 폴리펩티드가 단일 알파 및 수많은 엡실론 아미노 및 이미다졸 기를 갖기 때문에, 링커 화학에 따라 수많은 위치 이성질체가 생성될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 일반적인 PEG화 전략이 본원에서 적용될 수 있다.
- [0346] PEG는 하나 이상의 폴리펩티드 서열의 유리 아미노 또는 카르복실 기와 폴리에틸렌 글리콜 사이의 결합을 매개하는 말단 반응성 기 ("스페이서")를 통해 본 개시내용의 IL2 뮤테인에 결합될 수 있다. 유리 아미노 기에 결합될 수 있는 스페이서를 갖는 PEG는 N-히드록시숙시닐이미드 폴리에틸렌 글리콜을 포함하며, 이는 폴리에틸렌 글리콜의 숙신산 에스테르를 N-히드록시숙시닐이미드에 의해 활성화시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0347] 일부 실시양태에서, 부위 특이적인 PEG화를 용이하게 하기 위해 독특한 측쇄를 보유하는 비-천연 아미노산을 포함시킴으로써 IL2 뮤테인의 PEG화가 용이하게 된다. 이러한 폴리펩티드의 부위 특이적인 PEG화를 달성하기 위해 기능적 모이어티를 제공하도록 비-천연 아미노산을 폴리펩티드에 포함시키는 것은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Ptacin 등의 PCT 국제 출원 번호 PCT/US2018/045257 (2018년 8월 3일에 출원되고, 2019년 2월 7일에 국제 공개 번호 WO 2019/028419 A1로 공개됨)을 참조한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 IL2 뮤테인은 IL2 뮤테인의 위치 D109에서 비-천연 아미노산을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, IL2 뮤테인은 IL2 뮤테인의 위치 109에서 약 20 kD, 대안적으로 약 30 kD, 대안적으로 약 40 kD의 분자량을 갖는 PEG 분자로 PEG화된다.
- [0348] 폴리펩티드 서열에 접합된 PEG는 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형 PEG 유도체, "스타-PEG" 및 다중-아암 PEG가 본 개시내용에서 고려된다. 본 발명의 실시예 유용한 구체적인 실시양태 PEG에는 10 kDa 선형 PEG-알데히드 (예를 들어, 선브라이트(Sunbright)® ME-100AL, 엔오에프 아메리카 코퍼레이션(NOF America Corporation), 미국 뉴욕주 10601 화이트 플레인즈 원 노쓰 브로드웨이), 10 kDa 선형 PEG-NHS 에스테르 (예를 들어, 선브라이트® ME-100CS, 선브라이트® ME-100AS, 선브라이트® ME-100GS, 선브라이트® ME-100HS, NOF), 20 kDa 선형 PEG-알데히드 (예를 들어 선브라이트® ME-200AL, NOF, 20 kDa 선형 PEG- NHS 에스테르 (예를 들어, 선브라이트® ME-200CS, 선브라이트® ME-200AS, 선브라이트® ME-200GS, 선브라이트® ME-200HS, NOF), 2개의 10 kDa 선형 PEG 분자를 포함하는 20 kDa PEG-알데히드인 20 kDa 2-아암 분지형 PEG-알데히드 (예를 들어, 선브라이트® GL2-200AL3, NOF), 2개의 10 kDa 선형 PEG 분자를 포함하는 20 kDa PEG-NHS 에스테르인 20 kDa 2-아암 분지형 PEG-NHS 에스테르 (예를 들어, 선브라이트® GL2-200TS, 선브라이트® GL200GS2, NOF), 2개의 20 kDa 선형 PEG 분자를 포함하는 40 kDa PEG-알데히드인 40 kDa 2-아암 분지형 PEG-알데히드 (예를 들어, 선브라이트® GL2-400AL3), 2개의 20 kDa 선형 PEG 분자를 포함하는 40 kDa PEG-NHS 에스테르인 40 kDa 2-아암 분지형 PEG-NHS 에스테르 (예를 들어, 선브라이트® GL2-400AL3, 선브라이트® GL2-400GS2, NOF), 선형 30 kDa PEG-알데히드 (예를 들어, 선브라이트® ME-300AL) 및 선형 30 kDa PEG-NHS 에스테르가 포함된다.
- [0349] 이전에 언급된 바와 같이, PEG는 IL2 뮤테인에 직접적으로 또는 링커 분자를 통해 부착될 수 있다. 적합한 링커에는 일반적으로 변형된 폴리펩티드 서열과 연결된 성분 및 분자 사이의 일부 움직임을 허용하도록 충분한 길이로 갖는 "가요성 링커"가 포함된다. 링커 분자는 일반적으로 약 6-50 원자 길이이다. 링커 분자는 또한 예를 들어 아릴 아세틸렌, 2-10개의 단량체 단위를 함유하는 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민, 이산, 아미노산, 또는 이들의 조합물일 수 있다. 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고, 임의의 적합한 길이, 예컨대 1개 아미노산 (예를 들어, Gly), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50개 또는 50개 초과 아미노산일 수 있다. 가요성 링커의 예에는 글리신 중합체 (G)_n, 글리신-세린 중합체, 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 다른 가요성 링커가 포함된다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 구조화되지 않으며, 따라서 성분들 사이의 중성 테더로서 작용할 수 있다. 가요성 링커의 추가의 예에는 글리신 중합체 (G)_n, 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 글리신-세린 중합체가 포함된다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 구조화되지 않으며, 따라서 성분들 사이의 중성 테더로서 작용할 수 있다. 이들 링커 서열의 다량체 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 또는 30-50개)는 함께 연결되어, 본원에 개시된 폴리펩티드에

이중성 아미노산 서열을 접합시키기 위해 사용될 수 있는 가요성 링커를 제공할 수 있다.

- [0350] 추가로, 이러한 링커를 이용하여, 본원에 기재된 추가의 이중성 폴리펩티드 성분에 IL2 뮤테인을 연결시킬 수 있고, 이중성 아미노산 서열은 신호 서열 및/또는 융합 파트너, 예컨대, 알부민, Fc 서열 등일 수 있다.
- [0351] 아실화: 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 문헌 [Resh (2016) Progress in Lipid Research 63: 120-131]에 기재된 바와 같이 지방산 분자에 접합시킴으로써 아실화될 수 있다. 접합될 수 있는 지방산의 예에는 미리스테이트, 팔미테이트 및 팔미톨레산이 포함된다. 미리스토일레이트는 전형적으로 N-말단 글리신에 연결되지만, 리신 또한 미리스토일화될 수 있다. 팔미토일화는 전형적으로 유리 시스테인 -SH 기의 효소적 변형에 의해 달성되며, 예컨대 DHHC 단백질은 S-팔미토일화를 촉매한다. 세린 및 트레오닌 잔기의 팔미톨레일화는 전형적으로 PORCN 효소를 이용하여 효소적으로 달성된다.
- [0352] 아세틸화: 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 N-말단 아세틸트랜스퍼라제, 예를 들어 아세틸 CoA에 의한 효소 반응에 의해 N-말단에서 아세틸화된다. 대안적으로, 또는 N-말단 아세틸화 외에도, IL2 뮤테인은 예를 들어 리신 아세틸트랜스퍼라제에 의한 효소 반응에 의해 하나 이상의 리신 잔기 아세틸화될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Choudhary et al. (2009) Science 325 (5942):834L2 ortho840]을 참조한다.
- [0353] Fc 융합: 일부 실시양태에서, IL2 융합 단백질은 IgG 중쇄 가변 영역이 결합된 항체의 IgG 서브클래스로부터 유래된 Fc 영역을 포함할 수 있다. "Fc 영역"은 파파인에 의한 IgG의 소화에 의해 생성되는 IgG C-말단 도메인에 상동성인 천연 발생 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. IgG Fc는 대략 50 kDa의 분자량을 갖는다. 돌연변이체 IL2 폴리펩티드는 전체 Fc 영역, 또는 일부인 키메라 폴리펩티드의 순환 반감기를 연장시키는 능력을 유지하는 더 작은 부분을 포함할 수 있다. 또한, 전장 또는 단편화된 Fc 영역은 야생형 분자의 변이체일 수 있다. 즉, 이들은 폴리펩티드의 기능에 영향을 미칠 수 있거나 또는 미칠 수 없는 돌연변이를 함유할 수 있고; 하기에 추가로 기재되는 바와 같이, 천연 활성이 모든 경우에 필요하거나 또는 바람직한 것은 아니다. 특정한 실시양태에서, IL2 뮤테인 융합 단백질 (예를 들어, 본원에 기재된 IL2 부분 효능제 또는 길항제)은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 예시적인 Fc 영역은 보체 고정 및 Fc 수용체 결합을 억제하는 돌연변이를 포함할 수 있거나, 또는 이는 용해성일 수 있고, 즉, 또 다른 메카니즘, 예컨대 항체-의존적인 보체 용해 (ADCC)를 통해 보체에 결합하거나 세포를 용해시킬 수 있다.
- [0354] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 Fc-융합 키메라 폴리펩티드 분자의 기능적 도메인을 포함한다. Fc 융합 접합체는 생물약제의 전신 반감기를 증가시키는 것으로 나타났고, 따라서 생물약제 생성물은 덜 빈번한 투여를 필요로 할 수 있다. Fc는 혈관을 라이닝하는 내피 세포에서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 결합하고, 결합시 Fc 융합 분자는 분해로부터 보호되고, 순환으로 재방출되어, 분자가 더 오래 순환되게 유지시킨다. 이 Fc 결합은 내인성 IgG가 그의 긴 혈장 반감기를 유지하는 메카니즘인 것으로 믿어진다. 더욱 최근의 Fc-융합 기술은 생물약제의 단일 카피를 항체의 Fc 영역에 연결시켜, 전통적인 Fc-융합 접합체와 비교하여 생물약제의 약동학적 및 약력학적 성질을 최적화시킨다. Fc 융합의 제조에 유용한 "Fc 영역"은 파파인에 의한 IgG의 소화에 의해 생성되는 IgG C-말단 도메인에 상동성인 천연 발생 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. IgG Fc는 대략 50 kDa의 분자량을 갖는다. IL2 뮤테인은 전체 Fc 영역, 또는 일부인 키메라 폴리펩티드의 순환 반감기를 연장시키는 능력을 유지하는 더 작은 부분을 제공한다. 추가로, 전장 또는 단편화된 Fc 영역은 야생형 분자의 변이체일 수 있다. 전형적인 제시에서, 이량체성 Fc의 각각의 단량체는 이중성 폴리펩티드를 보유하고, 이중성 폴리펩티드는 동일하거나 또는 상이하다.
- [0355] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인이 Fc 융합의 포맷으로 투여될 때, 특히 Fc 이량체의 각각의 서브유닛에 접합된 폴리펩티드 쇄가 상이한 이들 상황에서, Fc 융합은 "뿔-인투-홀 변형(knob-into-hole)"을 갖도록 조작될 수 있다. 뿔-인투-홀 변형은 문헌 [Ridgway, et al. (1996) Protein Engineering 9(7):617-621] 및 미국 특허 번호 5,731,168 (1998년 3월 24일 허여됨)에 더욱 상세하게 기재되어 있다. 뿔-인투-홀 변형은 CH3 도메인에서 2개의 면역글로불린 중쇄 사이의 계면에서의 변형을 지칭하며, 여기서: i) 제1 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 티로신 또는 트립토판)
- [0356] 로 대체되어, 표면으로부터 돌출부 ("뿔")를 생성하고, ii) 제2 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)로 대체되어, 제2 CH3 도메인의 계면 내에 공동 ("홀")을 생성하며, 제1 CH3 도메인 ("뿔")의 돌출 측쇄가 제2 CH3 도메인의 공동에 수용된다. 한 실시양태에서, "뿔-인투-홀 변형"은 항체 중쇄 중 하나에 아미노산 치환 T366W 및 임의적으로 아미노산 치환 S354C, 및 항체 중쇄 중 다른 하나에 아미노산 치환 T366S, L368A, Y407V 및 임의적으로 Y349C를 포함한다. 추가로, Fc 도메인은 위치 S354 및 Y349에서 시스테인 잔기를 도입하도록 변형될 수 있고, 이는 Fe 영역에서 두 항체 중쇄

사이의 디설피드 가교를 안정화시킨다 (Carter, et al. (2001) Immunol Methods 248, 7-15). 노-인트루-홀 포맷을 이용하여, "노" 변형을 갖는 제1 Fc 단량체 상의 제1 폴리펩티드 (예를 들어 IL2 뮤테인) 및 "홀" 변형을 갖는 제2 Fc 단량체 상의 제2 폴리펩티드의 발현을 용이하게 하여, 이중이량체성 폴리펩티드 접합체의 발현을 용이하게 한다.

[0357] Fc 영역은 "용해성" 또는 "비-용해성"일 수 있지만, 전형적으로 비-용해성이다. 비-용해성 Fc 영역은 전형적으로 고친화도 Fc 수용체 결합 부위 및 Clq 결합 부위가 결합되어 있다. 뮤린 IgG Fc의 고친화도 Fc 수용체 결합 부위는 IgG Fc의 위치 235에서 Leu 잔기를 포함한다. 따라서, Fc 수용체 결합 부위는 Leu 235를 돌연변이시키거나 또는 결실시킴으로써 억제될 수 있다. 예를 들어, Leu 235의 Glu로의 치환은 Fc 영역이 고친화도 Fc 수용체에 결합하는 것을 억제한다. 뮤린 Clq 결합 부위는 IgG의 Glu 318, Lys 320, 및 Lys 322 잔기를 돌연변이시키거나 또는 결실시킴으로써 기능적으로 파괴될 수 있다. 예를 들어, Glu 318, Lys 320, 및 Lys 322의 Ala 잔기로의 치환은 IgG1 Fc가 항체-의존적인 보체 용해를 지시할 수 없게 만든다. 대조적으로, 용해성 IgG Fc 영역은 고친화도 Fc 수용체 결합 부위 및 Clq 결합 부위를 갖는다. 고친화도 Fc 수용체 결합 부위는 IgG Fc의 위치 235에서 Leu 잔기를 포함하고, Clq 결합 부위는 IgG 1의 Glu 318, Lys 320, 및 Lys 322 잔기를 포함한다. 용해성 IgG Fc는 이들 부위에서 야생형 잔기 또는 보존적인 아미노산 치환을 갖는다. 용해성 IgG Fc는 항체 의존적인 세포 세포독성 또는 보체 유도 세포용해 (CDC)를 위해 세포를 표적화할 수 있다. 인간 IgG에 대한 적절한 돌연변이 또한 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Morrison et al., The Immunologist 2:119-124, 1994; 및 Brekke et al., The Immunologist 2: 125, 1994] 참조).

[0358] 특정한 실시양태에서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인의 아미노- 또는 카르복실- 말단은 면역글로불린 Fc 영역 (예를 들어, 인간 Fc)과 융합되어, 융합 접합체 (또는 융합 분자)를 형성할 수 있다. Fc 융합 접합체는 생물약제의 전신 반감기를 증가시키는 것으로 나타났으며, 따라서 생물약제 생성물은 덜 빈번한 투여를 필요로 할 수 있다. Fc는 혈관을 라이닝하는 내피 세포에서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 결합하고, 결합시 Fc 융합 분자는 분해로부터 보호되고, 순환으로 재방출되어, 분자가 더 오래 순환되게 유지시킨다. 이 Fc 결합은 내인성 IgG가 그의 긴 혈장 반감기를 유지하는 메카니즘인 것으로 믿어진다. 더욱 최근의 Fc-융합 기술은 생물약제의 단일 카피를 항체의 Fc 영역에 연결시켜, 전통적인 Fc-융합 접합체와 비교하여 생물약제의 약동학적 및 약력학적 성질을 최적화시킨다.

[0359] 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단량체는 미국 특허 번호 10,259,859B2 (그의 전체 교시 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 야생형 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 영역에 비해 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 야생형 인간 IgG Fc 영역을 갖는 폴리펩티드와 비교하여 식균작용 검정에서 식균작용의 감소를 나타낸다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단량체는 제2 Fc 도메인 단량체를 포함하는 제2 폴리펩티드에 연결되어 Fc 도메인 이량체를 형성한다.

[0360] 키메라 폴리펩티드/융합 단백질: 일부 실시양태에서, 실시양태, IL2 뮤테인은 키메라 폴리펩티드의 기능적 도메인을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 IL2 뮤테인 융합 단백질은 IL2 뮤테인의 N-말단 또는 C-말단에서 융합 파트너를 코딩하는 핵산 서열과 프레임 내에서 IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 구축함으로써 관련 기술분야에 공지된 기술에 의해 재조합 DNA 방법에 의해 용이하게 생성될 수 있으며, 서열은 임의적으로 링커 또는 스페이서 폴리펩티드를 코딩하는 프레임 내에서 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0361] 항원 태그: 다른 실시양태에서, IL2 뮤테인은 항원 태그, 예컨대 FLAG 서열로서 기능하는 추가의 폴리펩티드 서열을 포함하도록 임의로 변형될 수 있다. FLAG 서열은 본원에 기재된 바와 같이 비오티화되고, 고도로 특이적인, 항-FLAG 항체로서 인식된다 (예를 들어, 문헌 [Blancar et al. (1992) Science 256:1014 및 LeClair, et al. (1992) PNAS-USA 89:8145] 참조). 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인 폴리펩티드는 C-말단 c-myc 에피토프 태그를 추가로 포함한다.

[0362] 본 개시내용의 hIL2 뮤테인에 대한 접합을 위한 추가의 후보 분자는 단리 또는 정제에 적합한 것을 포함한다. 특정한 비제한적인 예에는 결합 분자, 예컨대 비오티 (비오티-아비딘 특이적인 결합 쌍), 항체, 수용체, 리간드, 펩티드, 또는 고체 지지체, 예를 들어 플라스틱 또는 폴리스티렌 비드, 플레이트 또는 비드, 자성 비드, 시험 스트립, 및 막을 포함하는 분자가 포함된다.

[0363] His 태그: 일부 실시양태에서, 본 발명의 hIL2 뮤테인 (이러한 IL2 뮤테인의 융합 단백질 포함)은 하나 이상의 전이-금속 킬레이팅 폴리펩티드 서열을 갖는 융합 단백질로서 발현된다. Smith 등의 미국 특허 번호 4,569,794 (1986년 2월 11일 허여됨)에 기재된 바와 같이, 이러한 전이-금속 킬레이팅 도메인의 포함은 고정된 금속 친화

도 크로마토그래피 (IMAC)의 정제를 용이하게 한다. 본 발명의 실시예에 유용한 전이-금속 킬레이팅 폴리펩티드의 예는 상기 Smith 등의 문헌 및 Dobeli 등의 미국 특허 번호 5,320,663 (1995년 5월 10일 허여됨)에 기재되어 있으며, 전체 교시내용은 본원에 참조로 포함된다. 본 발명의 실시예에 유용한 특정한 전이 금속 킬레이팅 폴리펩티드는 3-6개 연속의 히스티딘 잔기 (서열식별번호: 12)를 포함하는 펩티드, 예컨대 6-히스티딘 펩티드 (His)₆ (서열식별번호: 13)이고, 관련 기술분야에서 흔히 "His-태그"로 지칭된다.

[0364] 표적화된 hIL2 뮤테인: 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은, 임의로 IL2 뮤테인 서열과 융합 단백질의 표적화 도메인의 서열 사이에 1-40개 (대안적으로 2-20개, 대안적으로 5-20개, 대안적으로 10-20개) 아미노산의 링커 분자를 혼입시켜, 이러한 표적화 도메인에 특이적으로 결합하는 세포 표면 분자를 발현하는 특정한 세포 유형 또는 조직에 대한 선택적 결합을 용이하게 하는 폴리펩티드 서열 ("표적화 도메인")과의 융합 단백질로서 제공된다. 다른 실시양태에서, hIL2 뮤테인 및 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 키메라 폴리펩티드가 생성될 수 있다. 키메라 단백질의 항체 또는 항원-결합 성분은 표적화 모이어티로서 기능할 수 있다. 예를 들어, 이는 키메라 단백질을 세포 또는 표적 분자의 특정한 하위세트에 국재화시키는데 사용될 수 있다. 시토킨-항체 키메라 폴리펩티드를 생성하는 방법은 예를 들어 미국 특허 번호 6,617,135 (Nucleic Acid Molecules Encoding Mutant IL2)에 기재되어 있다.

[0365] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인 융합 단백질의 표적화 도메인은 종양 세포의 세포 표면 분자에 특이적으로 결합한다. CAR-T 세포의 CAR의 ECD가 CD-19에 특이적으로 결합하는 한 실시양태에서, IL2 뮤테인은 CD-19 표적화 모이어티와의 융합 단백질로서 제공될 수 있다. 예를 들어, CAR-T 세포의 CAR의 ECD가 CD-19에 대한 특이적 결합을 제공하는 scFv 분자인 한 실시양태에서, IL2 뮤테인은 CD-19 표적화 모이어티, 예컨대 CD-19에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체 (예를 들어, scFv 또는 VHH)와의 융합 단백질로서 제공된다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질은 hIL2 뮤테인 및 항-CD19 scFv FMC63을 포함한다 (Nicholson, et al. (1997) Mol Immunol 34: 1157-1165).

[0366] 유사하게, CAR-T 세포의 CAR의 ECD가 BCMA에 특이적으로 결합하는 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 BCMA 표적화 모이어티, 예컨대 Kallal 등의 미국 특허 9,034,324 (2015년 5월 9일 허여됨)에 기재된 바와 같은 항-BMCA 항체의 CDR을 포함하는 항체 또는 Brogdon 등의 미국 특허 번호 10,174,095 (2019년 1월 8일 허여됨)에 기재된 바와 같은 CDR을 포함하는 항체와의 융합 단백질로서 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 GD2 표적화 모이어티, 예컨대 Cheung 등의 미국 특허 번호 9,315,585 (2016년 4월 19일 허여됨)에 기재된 CDR 또는 ME36.1 (Thurin et al., (1987) Cancer Research 47:1229-1233), 14G2a, 3F8 (Cheung, et al., 1985 Cancer Research 45:2642-2649), hu14.18, 8B6, 2E12, 또는 ic9로부터 유래된 CDR을 포함하는 항체와의 융합 단백질로서 제공될 수 있다.

[0367] 대안적 실시양태에서, 본 개시내용의 표적화된 hIL2 뮤테인은, 예컨대 항-FMC63 항체를 포함하는 표적화된 hIL2 뮤테인 구축물을 사용하여 IL2 활성을 CAR-T 세포에 표적화하고 고갈된 CAR-T 세포를 생체내에서 회생시키는 것에 의해, CAR-T 세포의 세포의 수용체에 기초하여 IL2 뮤테인의 CAR-T 세포로의 표적화된 전달을 제공하기 위해 CAR-T 세포 요법과 조합되어 투여될 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 실시양태는 CAR-T 세포의 특이적 세포 표면 분자와 상호작용하도록 설계된 항체 또는 리간드에 대한 상기 IL2 뮤테인의 접합에 의한 IL2 뮤테인의 표적화된 전달을 포함한다. 이러한 분자의 예는 항-FMC63-hIL2 뮤테인일 것이다.

[0368] 다른 실시양태에서, 키메라 폴리펩티드는 돌연변이체 IL2 폴리펩티드, 및 돌연변이체 IL2 폴리펩티드의 발현을 증진시키거나 또는 그의 세포 국재화를 지시하는 기능을 하는 이중성 폴리펩티드, 예컨대 Aga2p 응집소 서브유닛을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Boder and Wittrup, Nature Biotechnol. 15:553-7, 1997] 참조).

[0369] 단백질 형질도입 도메인 융합 단백질: 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 "단백질 형질도입 도메인" 또는 "PTD"에 작동가능하게 연결될 수 있다. PTD는 지질 이중층, 미셀, 세포 막, 소기관 막 또는 소포 막을 횡단하는 것을 용이하게 하는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 탄수화물 또는 유기 또는 무기 분자이다. PTD의 IL2 뮤테인으로의 혼입은 분자가 막을 횡단하는 것을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, PTD는 IL2 뮤테인의 아미노 또는 카르복시 말단에 공유 연결된다. 일부 실시양태에서, PTD는 분자의 N 또는 C 말단에서 PTD-IL2 뮤테인 융합 단백질의 일부로서 혼입된다. 예시적인 단백질 형질도입 도메인은 최소 데카펩티드 단백질 형질도입 도메인 (HIV-1 TAT의 잔기 47-57에 상응함); 세포 내로의 진입을 지시하기에 충분한 다수의 아르기닌 잔기를 포함하는 폴리아르기닌 서열 (예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10-50개 아르기닌); VP22 도메인 (Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9(6):489-96); 드로소필라(Drosophila) 안테나페디아(Antennapedia) 단백질 형질도입 도메인 (Noguchi et al. (2003) Diabetes 52(7):1732-1737); 말단절단된 인간 칼시토닌 펩티드 (Trehin

et al. (2004) Pharm. Research 21:1248-1256); 폴리리신 (Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008), 트랜스포르탄 (문헌 [Wierzbicki, et al., (2014) Folio Histomchemica et Cytobiologica 52(4): 270-280 및 Pooga, et a (1998) FASEB J 12(1)67-77]에 기재된 바와 같고, 아나스펙(AnaSpec)으로부터 카탈로그 번호 AS-61256으로서 상업적으로 입수가능함); KALA (문헌 [Wyman et al., (1997) Biochemistry 36(10) 3008-3017]에 기재된 바와 같고, 아나스펙으로부터 카탈로그 번호 AS-65459로서 상업적으로 입수가능함); 안테나페디아 펩티드 (문헌 [Pietersz et al., (2001) Vaccine 19:1397]에 기재된 바와 같고, 아나스펙으로부터 카탈로그 번호 AS-61032로서 상업적으로 입수가능함); TAT 47-57 (아나스펙으로부터 카탈로그 번호 AS-60023으로서 상업적으로 입수가능함)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0370] 보충 치료제의 접합: 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 항염증 화합물 또는 항신생물제, 치료 항체 (예를 들어 헤르셉틴), 표적화 모이어티, 예컨대 항종양 항원 항체, 면역 체크포인트 조정제, 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어 항-PD1 항체), 또는 암 백신을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 추가의 치료제에 연결될 수 있다. 항미생물제에는 아미노글리코사이드, 예컨대 겐타미신, 항바이러스 화합물, 예컨대 리팜피신, 3'-아지도-3'-데옥시티미딘 (AZT) 및 아시클로비르, 항진균제, 예컨대 아졸, 예컨대 플루코나졸, 마크로리드, 예컨대 암포테리신 B, 및 칸디시딘, 항기생충 화합물 등이 포함된다. IL2 뮤테인은 CSF, GSF, GMCSF, TNF, 에리트르포이에틴, 면역조정제 또는 시토카인, 예컨대 인터페론 또는 인터루킨, 뉴로펩티드, 생식 호르몬, 예컨대 HGH, FSH, 또는 LH, 갑상선 호르몬, 신경전달물질, 예컨대 아세틸콜린, 호르몬 수용체, 예컨대 에스트로겐 수용체와 같은 추가의 시토카인에 접합될 수 있다. 비-스테로이드성 항염증제, 예컨대 인도메타신, 살리실산 아세테이트, 이부프로펜, 숀린, 피록시카 및 나프록센, 및 마취제 또는 진통제 또한 포함된다. 방사성 동위원소, 예컨대 영상화 뿐만 아니라 요법에 유용한 것들 또한 포함된다.

[0371] IL2 뮤테인의 합성

[0372] 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 재조합 또는 고체 상 합성을 비롯하여 폴리펩티드의 구축을 위한 통상적인 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0373] 화학적 합성: 재조합 분자 생물학적 기술에 의해 변형된 핵산 분자의 발현을 통해 돌연변이체 폴리펩티드를 생성하는 것 외에도, 대상 hIL2 뮤테인은 화학적으로 합성될 수 있다. 화학적으로 합성된 폴리펩티드는 관련 기술분야의 기술자에 의해 일상적으로 생성된다. 화학적 합성에는 기재된 성질을 나타내는 IL2 뮤테인을 코딩하는 단백질 서열의 화학적 수단에 의해 펩티드의 직접적인 합성이 포함된다. 이 방법은 IL2와 CD25, CD122 및 CD132의 상호작용에 영향을 미치는 위치에서 천연 및 비천연 아미노산 둘 다를 포함할 수 있다.

[0374] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. IL2 뮤테인의 화학적 합성은 액체-상 또는 고체-상을 통해 진행될 수 있다. 고체-상 펩티드 합성 (SPPS)은 비천연 아미노산 및/또는 펩티드/단백질 백본 변형의 포함을 가능하게 한다. 다양한 형태의 SPPS가 본 개시내용의 IL2 뮤테인을 합성하는데 이용가능하며, 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10; 및 Camarero J.A. et al., (2005) Protein Pept Lett. 12:723-8]). 화학적 합성 과정에서, 알파 기능 및 임의의 반응성 측쇄는 아마이드 결합을 연결하기 위한 조건 하에 안정하지만, 형성된 펩티드 쇠를 손상시키지 않고 용이하게 절단될 수 있는 산-불안정성 또는 염기-불안정성 기로 보호될 수 있다.

[0375] 고체 상 합성에서, 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 아미노산은 적합한 지지체 물질에 커플링될 수 있다. 적합한 지지체 물질은 합성 과정의 단계적 축합 및 절단 반응을 위한 시약 및 반응 조건에 대해 불활성이고, 사용되는 반응 매질에 용해되지 않는 것들이다. 상업적으로 입수가능한 지지체 물질의 예에는 반응성 기 및/또는 폴리에틸렌 글리콜에 의해 변형된 스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 클로로메틸화된 스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 히드록시메틸화된 또는 아미노메틸화된 스티렌/디비닐벤젠 공중합체 등이 포함된다. 보호된 아미노산의 연속적인 커플링은 펩티드 합성에서 통상적인 방법에 따라, 전형적으로 자동화 펩티드 합성기에서 수행될 수 있다.

[0376] 고체 상 합성의 종료 시에, 폴리펩티드를 지지체 물질로부터 절단함과 동시에, 측쇄 보호기를 절단한다. 수득된 폴리펩티드는 소수성 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 분포 크로마토그래피, 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 및 역상 HPLC를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다.

[0377] 재조합 생성: 대안적으로, 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 재조합 DNA 기술에 생성된다. 폴리펩티드의 재조합 생성의 전형적인 실시예에서, 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 발현이 달성될 숙주 세포에 적합한 발현 벡터에 포함되고, 핵산 서열은 벡터에 의해 코딩되고 표적 숙주 세포에서 기능하는 하나 이상의 발현 제어 서열

에 작동가능하게 연결된다. 재조합 단백질은 숙주 세포의 파괴를 통해 또는 분비 리더 서열 (신호 펩티드)이 폴리펩티드에 포함되는 경우에는 세포 배지로부터 회수될 수 있다. 재조합 단백질은 혼입을 비롯한 추가의 사용을 위해 정제되고 농축될 수 있다. IL2 폴리펩티드의 재조합 생성 과정은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, Fernandes 및 Taforo의 미국 특허 번호 4,604,377 (1986년 8월 5일 허여됨)에 기재되어 있고, IL2 뮤테인에 대해서는 Mark 등의 미국 특허 번호 4,512,584 (1985년 5월 21일 허여됨), Gillis의 미국 특허 번호 4,401,756 (1983년 8월 30일 허여됨)에 기재되어 있으며, 전체 교시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0378] IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산 서열의 구축: 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산 서열 (또는 IL2 뮤테인을 포함하는 융합 단백질)을 이용하여 재조합 방법에 의해 생성된다. 원하는 hIL2 뮤테인을 코딩하는 핵산 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하여 화학적 수단에 의해 합성될 수 있다. 핵산 분자는 폴리펩티드를 코딩하는 서열로 제한되지 않으며; 코딩 서열 (예를 들어, hIL2의 코딩 서열)로부터 상류 또는 하류에 있는 비-코딩 서열 중 일부 또는 모두 또한 포함될 수 있다. 분자 생물학 분야의 통상의 기술자는 핵산 분자를 단리하기 위한 일상적인 절차에 익숙하다. 이들은 예를 들어 게놈 DNA를 제한 엔도뉴클레아제로 처리함으로써, 또는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 수행함으로써 생성될 수 있다. 핵산 분자가 리보핵산 (RNA)인 경우, 분자는 예를 들어 시험관내 전사에 의해 생성될 수 있다.

[0379] IL2 뮤테인 (및 그의 융합)을 코딩하는 핵산 분자는 천연 발생 서열, 또는 천연 발생하는 것들과 상이하지만 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 함유할 수 있다. 이들 핵산 분자는 RNA 또는 DNA (예를 들어, 게놈 DNA, cDNA, 또는 합성 DNA, 예컨대 포스포라미다이트-기반 합성에 의해 생성되는 것), 또는 이들 유형의 핵산 내에서 뉴클레오타이드의 조합 또는 변형으로 이루어질 수 있다. 추가로, 핵산 분자는 이중 가닥 또는 단일 가닥 (즉, 센스 또는 안티센스 가닥)일 수 있다.

[0380] IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산 서열은 맞춤 제작 핵산 서열을 제공하는 다양한 상업적인 공급처로부터 입수할 수 있다. 본 개시내용의 IL2 뮤테인을 생성하기 위한 IL2 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체는 관련 기술분야에 널리 공지된 유전자 코드를 기반으로 하여 코딩 서열에 적절한 뉴클레오타이드 변화를 도입시킴으로써 제조된다. 이러한 변이체는 상기 언급된 바와 같이 잔기의 삽입, 치환 및/또는 구체적인 결실을 나타낸다. 삽입, 치환 및/또는 구체적인 결실의 임의의 조합을 만들어서 최종 구축물에 도달하되, 단, 최종 구축물은 본원에 정의된 원하는 생물학적 활성을 갖는다.

[0381] 적합하게 형질전환된 숙주에서 hIL2 뮤테인을 코딩하고 이들 서열을 발현하는 DNA 서열을 구축하는 방법에는 PCR-보조 돌연변이유발 기술을 이용하는 것이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. hIL2 폴리펩티드에 아미노산 잔기의 결실 또는 부가로 이루어지는 돌연변이는 또한 표준 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다. 결실 또는 부가의 경우, hIL2를 코딩하는 핵산 분자는 임의적으로 적절한 제한 엔도뉴클레아제에 의해 소화된다. 생성된 단편은 직접적으로 발현되거나 또는 예를 들어 제2 단편에 라이게이션함으로써 추가로 조작될 수 있다. 핵산 분자의 두 말단이 서로 중첩된 상보성 뉴클레오타이드를 함유하는 경우에 라이게이션이 용이할 수 있지만, 평활-말단 단편 또한 라이게이션될 수 있다. PCR-생성 핵산 또한 다양한 돌연변이체 서열을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0382] 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 재조합에 의해 직접적으로 뿐만 아니라, 이중성 폴리펩티드, 예를 들어 신호 서열, 또는 성숙한 IL2 뮤테인의 N-말단 또는 C-말단에서 특이적인 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 생성될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 이는 벡터에 삽입되는 코딩 서열의 일부일 수 있다. 선택되는 이중성 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 가공되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 일부 실시양태에서, 신호 서열은 IL2 뮤테인 (즉, 인간 IL2 신호 서열)과 천연적으로 회합되는 신호 서열이다. 신호 서열의 포함은 그가 제조되는 재조합 세포로부터 hIL2 뮤테인을 분비하는 것이 바람직한지 여부에 따라 좌우된다. 선택된 세포가 원핵생물인 경우, 일반적으로 DNA 서열이 신호 서열을 코딩하지 않는 것이 바람직하다. 선택된 세포가 진핵생물인 경우, 일반적으로 신호 서열이 코딩되는 것이 바람직하고, 야생형 hIL2 신호 서열이 사용되는 것이 가장 바람직하다. 대안적으로, 이중성 포유동물 신호 서열, 예컨대 동일한 또는 관련된 종의 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열, 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 적합할 수 있다. 재조합 숙주 세포가 효모 세포, 예컨대 사카로마이세스 세레비시아에(Saccharomyces cerevisiae)인 경우, Singh의 미국 특허 번호 7,198,919 B1 (2007년 4월 3일 허여됨)에 기재된 바와 같이 알파 메이팅 인자 분비 신호 서열을 사용하여 배양 배지로 IL2 뮤테인의 세포 외 분비를 달성할 수 있다.

[0383] 발현될 IL2 뮤테인이 키메라 (예를 들어, IL2 뮤테인 및 이중성 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질)로서

발현되는 경우, 키메라 단백질은 hIL2 유테인의 모두 또는 일부를 코딩하는 제1 서열 및 이중성 폴리펩티드의 모두 또는 일부를 코딩하는 제2 서열을 포함하는 하이브리드 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 대상 hIL2 유테인은 헥사-히스티딘 태그 (서열식별번호: 13)에 융합되어 박테리아 발현된 단백질의 정제를 용이하게 할 수 있거나, 또는 헤마글루티닌 태그에 융합되어 진핵생물 세포에서 발현된 단백질의 정제를 용이하게 할 수 있다. 첫째로 및 둘째로, 융합 단백질 및 이중성 폴리펩티드의 요소의 배향에 제한이 있는 것으로 이해되어서는 안되며, IL2 유테인의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결될 수 있다. 예를 들어, N-말단은 표적화 도메인에 연결되고, C-말단은 헥사-히스티딘 태그 (서열식별번호: 13) 정제 핸들에 연결될 수 있다.

[0384] 발현될 폴리펩티드 (또는 융합/키메라)의 완전한 아미노산 서열을 이용하여 역-번역된 유전자를 구축할 수 있다. hIL2 유테인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 올리고머를 합성할 수 있다. 예를 들어, 원하는 폴리펩티드의 부분을 코딩하는 몇몇 소형 올리고뉴클레오티드를 합성한 다음, 라이게이션할 수 있다. 개별 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 상보성 조립을 위해 5' 또는 3' 오버행을 함유한다.

[0385] 코돈 최적화: 일부 실시양태에서, IL2 유테인을 코딩하는 핵산 서열은 특정한 숙주 세포 유형에서의 발현을 용이하게 하기 위해 "코돈 최적화"될 수 있다. 포유동물, 효모 및 박테리아 숙주 세포를 비롯한 광범위한 발현 시스템에서 코돈 최적화를 위한 기술은 널리 공지되어 있으며, 다양한 숙주 세포 유형에서의 발현을 위해 코돈 최적화된 서열을 제공하기 위한 온라인 도구가 있다. 예를 들어 문헌 [Hawash, et al., (2017) 9:46-53 and Mauro and Chappell in *Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells: Methods and Protocols*, edited by David Hacker (Human Press New York)]을 참조한다. 추가로, 코돈 최적화된 핵산 서열의 제조에 도움이 되기 위해 자유롭게 입수가능한 다양한 웹 기반 온라인 소프트웨어 패키지가 있다.

[0386] 발현 벡터:

[0387] 일단 조립되면 (합성, 부위-지정된 돌연변이유발 또는 또 다른 방법에 의해), hIL2 유테인을 코딩하는 핵산 서열은 발현 벡터에 삽입될 것이다. 다양한 숙주 세포에서 사용하기 위한 다양한 발현 벡터가 이용가능하며, 전형적으로 발현을 위한 숙주 세포를 기반으로 하여 선택된다. 발현 벡터에는 전형적으로 하기 중 하나 이상이 포함되나 이에 제한되지는 않는다: 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열. 벡터에는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 통합 벡터 등이 포함된다. 플라스미드는 비-바이러스 벡터의 예이다.

[0388] 선택가능한 마커: 발현 벡터는 일반적으로 선택가능한 마커로도 명명되는 선택 유전자를 함유한다. 이 유전자는 선택적인 배양 배지에서 성장하는 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 성장을 위해 필요한 단백질을 코딩한다. 선택 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배양 배지에서 생존하지 않을 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토크세이트, 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0389] 조절성 제어 서열: 재조합 폴리펩티드의 효율적인 발현을 용이하게 하기 위해, 발현될 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산 서열은 선택된 발현 숙주에서 기능성인 전사 및 번역 조절성 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 본 개시내용의 IL2 유테인을 위한 발현 벡터는 숙주 유기체에 의해 인식되고, IL2 유테인을 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 조절 서열을 함유한다. 용어 "조절성 제어 서열", "조절 서열" 또는 "발현 제어 서열"은 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, 문헌 [Goeddel (1990) in *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego CA USA)]을 참조하며, 조절 서열에는 여러 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구성적인 발현을 지시하는 것들, 및 특정한 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 조직-특이적인 조절 서열)의 발현을 지시하는 것들이 포함된다. 발현 벡터의 설계가 형질전환된 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 좌우될 수 있음이 관련 기술분야의 기술자에 의해 이해될 것이다. 발현 제어 서열을 선택하는데 있어서, 관련 기술분야의 기술자에 의해 이해되는 다양한 인자가 고려되어야 한다. 이들에는 예를 들어 서열의 상대적인 강도, 그의 제어가능성, 및 특히 잠재적인 이차 구조와 관련하여 대상 hIL2 유테인을 코딩하는 실제 DNA 서열과의 상용성이 포함된다.

[0390] 프로모터: 일부 실시양태에서, 조절 서열은 프로모터이며, 이는 예를 들어 발현이 추구되는 세포 유형을 기반으로 하여 선택된다. 프로모터는 그들이 작동가능하게 연결된 특정한 핵산 서열의 전사 및 번역을 제어하는 구조 유전자의 출발 코돈의 상류 (5')에 위치하는 (일반적으로 약 100 내지 1000 bp 이내에 있는) 비번역 서열이다. 이러한 프로모터는 전형적으로 2가지 클래스인 유도성 및 구성적 프로모터에 속한다. 유도성 프로모터는 배양

조건에서의 일부 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재, 또는 온도 변화에 대한 반응으로 그들의 제어 하에 DNA로부터 증가된 전사 수준을 개시하는 프로모터이다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 수많은 프로모터가 널리 공지되어 있다.

[0391] T7 프로모터는 박테리아에서 사용될 수 있고, 폴리헤드린 프로모터는 곤충 세포에서 사용될 수 있고, 시토메갈로바이러스 또는 메탈로티오네인 프로모터는 포유동물 세포에서 사용될 수 있다. 또한, 더 고등의 진핵생물의 경우, 조직-특이적인 및 세포 유형-특이적인 프로모터가 광범위하게 이용가능하다. 이들 프로모터는 체내에서 주어진 조직 또는 세포 유형에서 핵산 분자의 발현을 지시하는 그들의 능력으로 인해 그렇게 명명된다. 숙련된 기술자는 핵산의 발현을 지시하기 위해 사용될 수 있는 수많은 프로모터 및 다른 조절성 요소를 잘 알고 있다.

[0392] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 전사는 예를 들어 바이러스의 게놈, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 인간 아데노바이러스 혈청형 5), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스 (예컨대 뮤린 줄기 세포 바이러스), B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 유인원 바이러스 40 (SV40), 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터, PGK (포스포글리세레이트 키나제), 또는 면역글로불린 프로모터, 열-쇼크 프로모터로부터 수득된 프로모터에 의해 제어될 수 있으며, 이러한 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성이다. SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 편리하게는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 수득된다.

[0393] 인헨서: 더 고등의 진핵생물에 의한 전사는 종종 벡터에 인헨서 서열을 삽입함으로써 증가된다. 인헨서는 DNA의 시스-작용 요소이며, 일반적으로 약 10 내지 300 bp이고, 그의 전사를 증가시키기 위해 프로모터에 대해 작용한다. 인헨서는 상대적으로 배향 및 위치 독립적이며, 인트론 내에서 뿐만 아니라 자체 코딩 서열 내에서 전사 단위에 대해 5' 및 3'에서 발견된다. 현재 포유동물 유전자로부터의 여러 인헨서 서열 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-태아 단백질, 및 인슐린)이 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로, 진핵생물 세포 바이러스로부터의 인헨서가 사용될 것이다. 그 예에는 복제 기점의 후기 측의 SV40 인헨서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점의 후기 측의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서가 포함된다. 인헨서는 코딩 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 발현 벡터에 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다. 진핵생물 숙주 세포에서 사용되는 발현 벡터는 또한 전사의 종결을 위해 및 mRNA의 안정화를 위해 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 일반적으로 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때로는 3' 비번역 영역으로부터 입수가능하다. 상기 나열된 성분 중 하나 이상을 함유하는 적합한 벡터의 구축은 표준 기술을 이용한다.

[0394] 삽입된 핵산 분자의 전사를 용이하게 하는 서열 외에도, 벡터는 복제 기점, 및 선택가능한 마커를 코딩하는 다른 유전자를 함유할 수 있다. 예를 들어, 네오마이신-내성 (neoR) 유전자는 그가 발현되는 세포에 G418 내성을 부여하여, 형질감염된 세포의 표현형 선택을 허용한다. 마커 또는 리포터 유전자의 추가의 예에는 베타-락타마제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT), 아데노신 데아미나제 (ADA), 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR), 히그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제 (HPH), 티미딘 키나제 (TK), lacZ (베타-갈락토시다제를 코딩함), 및 크산틴 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (XGPR)가 포함된다. 관련 기술분야의 기술자는 주어진 조절성 요소 또는 선택가능한 마커가 특정한 실험 맥락에서 사용하기에 적합한지 여부를 용이하게 결정할 수 있다.

[0395] 발현 벡터의 적절한 조립은 뉴클레오타이드 시퀀싱, 제한 맵핑, 및 적합한 숙주에서 생물학적으로 활성인 폴리펩티드의 발현에 의해 확인될 수 있다.

[0396] 숙주 세포:

[0397] 본 개시내용은 본 개시내용의 hIL2 유전자를 코딩하는 핵산 분자를 함유하고 발현하는 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 추가로 제공한다. 본 개시내용의 세포는 형질감염된 세포, 즉, 핵산 분자, 예를 들어 돌연변이체 hIL2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 재조합 DNA 기술에 의해 도입된 세포이다. 이러한 세포의 자손 또한 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0398] 숙주 세포는 전형적으로 선택된 발현 벡터와의 그들의 상용성, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 생성물의 독성, 그들의 분비 특징, 폴리펩티드를 정확하게 폴딩하는 그들의 능력, 그들의 발효 또는 배양 조건, 및 DNA 서열에 의해 코딩되는 생성물의 정제의 용이성에 따라 선택된다. 본원에서 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현하는데 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 또는 더 고등의 진핵생물 세포이다.

[0399] 일부 실시양태에서, 재조합 hIL2 유전자 또는 그의 생물학적으로 활성인 변이체는 또한 진핵생물, 예컨대 효모 또는 인간 세포에서 제조될 수 있다. 적합한 진핵생물 숙주 세포에는 곤충 세포 (배양된 곤충 세포 (예를

들어, Sf9 세포)에서 단백질의 발현을 위해 이용가능한 바콜로바이러스 벡터의 예에는 pAc 시리즈 (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) 및 pVL 시리즈 (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39)가 포함됨); 효모 세포 (효모 에스. 세레비지아에에서의 발현을 위한 벡터의 예에는 pYepSecI (Baldari et al. (1987) EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123), pYES2 (인비트로젠 코퍼레이션(Invitrogen Corporation), 캘리포니아주 샌디에고), 및 pPicZ (인비트로젠 코퍼레이션, 캘리포니아주 샌디에고)가 포함됨); 또는 포유동물 세포 (포유동물 발현 벡터에는 pCDM8 (Seed (1987) Nature 329:840) 및 pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187:195)가 포함됨)가 포함된다.

[0400] 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 마우스 L 세포 (L-M[TK-], ATCC#CRL-2648), SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁액 배양물에서 성장을 위해 서브클로닝된 HEK293 또는 HEK293 세포; 아기 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO); 마우스 세르틀리 세포 (TM4); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1 587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다. 포유동물 세포에서, 발현 벡터의 제어 기능은 종종 바이러스 조절성 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 일반적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시토메갈로바이러스, 및 유인원 바이러스 40으로부터 유래된다.

[0401] hIL2 뮤테인은 원핵생물 숙주, 예컨대 박테리움 이. 콜라이, 또는 진핵생물 숙주, 예컨대 곤충 세포 (예를 들어, Sf21 세포), 또는 포유동물 세포 (예를 들어, COS 세포, NIH 3T3 세포, 또는 HeLa 세포)에서 생성될 수 있다. 이들 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (버지니아주 마나사스)를 비롯한 여러 공급처로부터 입수가 가능하다. 발현 시스템을 선택하는데 있어서는, 성분들이 서로 상용성인 것만이 중요하다. 숙련된 또는 통상의 기술자는 이러한 결정을 내릴 수 있다. 추가로, 발현 시스템을 선택하는데 지침이 필요한 경우, 숙련된 기술자는 문헌 [Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1993) 및 Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 Suppl. 1987)]에서 자문을 구할 수 있다.

[0402] 일부 실시양태에서, 수득된 hIL2 뮤테인은 뮤테인을 생성하는데 사용된 숙주 유기체에 따라 글리코실화되거나 또는 글리코실화되지 않을 것이다. 박테리아가 숙주로서 선택되는 경우, 생성된 hIL2 뮤테인은 글리코실화되지 않을 것이다. 다른 한편으로, 진핵생물 세포는 hIL2 뮤테인을 글리코실화시킬 것이지만, 아마도 천연-IL2와 동일한 방식으로 글리코실화되지는 않을 것이다.

[0403] 원핵생물 및 진핵생물 세포 둘 다에 대한 다른 추가의 발현 시스템의 경우, 문헌 [Chapters 16 and 17 of Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)]를 참조한다. 문헌 [Goeddel (1990) in Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, Calif.)]를 참조한다.

[0404] 형질감염:

[0405] 발현 구축물은 숙주 세포에 도입되어, 본원에 개시된 hIL2 뮤테인을 생성하거나 또는 그의 생물학적으로 활성인 뮤테인을 생성할 수 있다. 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 원핵생물 또는 진핵생물 세포에 도입될 수 있다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는 적합한 방법은 문헌 [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)] 및 다른 표준 분자 생물학 실험실 매뉴얼에서 확인할 수 있다.

[0406] 표적 세포의 형질감염을 용이하게 하기 위해, 표적 세포를 비-바이러스 벡터의 흡수를 용이하게 하는 조건 하에 비-바이러스 벡터에 직접적으로 노출시킬 수 있다. 포유동물 세포에 의한 외래 핵산의 흡수를 용이하게 하는 조건의 예는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 화학적 수단 (예컨대 리포펙타민(Lipofectamine)®, 썬모피셔 사이언티픽(Thermo-Fisher Scientific)), 고염, 및 자기장 (전기천공)이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0407] 세포 배양:

[0408] 세포는 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키는데

적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양될 수 있다. 포유동물 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ((MEM), 시그마), RPMI 1640 (시그마), 및 둘베코 변형된 이글 배지 ((DMEM), 시그마)가 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제, 미량 원소, 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충제 또한 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것들이며, 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0409] 제조합 단백질의 회수:

[0410] 분비 리더 서열이 사용되는 경우, 제조합적으로 생성된 IL2 뮤테인 폴리펩티드는 분비된 폴리펩티드로서 배양 배지로부터 회수될 수 있다. 대안적으로, IL2 뮤테인 폴리펩티드는 또한 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있다. 프로테아제 억제제, 예컨대 페닐 메틸 술폰일 플루오라이드 (PMSF)를 세포 용해물로부터의 회수 단계 동안에 사용하여, 정제하는 동안에 단백질 분해를 억제할 수 있으며, 항생제를 포함시켜 우발적인 오염원의 성장을 방지할 수 있다.

[0411] 정제:

[0412] 다양한 정제 단계가 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 친화도 크로마토그래피를 이용할 수 있다. 친화도 크로마토그래피는 생물학적 거대분자에 일반적으로 존재하는 고도로 특이적인 결합 부위를 사용하며, 특정한 리간드에 결합하는 그들의 능력에 따라 분자를 분리한다. 공유 결합은 리간드를 단백질 샘플에 명백하게 제시하는 방식으로 리간드를 불용성의 다공성 지지체 매질에 부착시키며, 이로써 한 분자 종의 천연 특이적인 결합을 이용하여 혼합물로부터 제2 종을 분리하고 정제한다. 항체는 일반적으로 친화도 크로마토그래피에서 사용된다. 크기 선택 단계 또한 이용될 수 있으며, 예를 들어 겔 여과 크로마토그래피 (크기-배제 크로마토그래피 또는 분자 체 크로마토그래피로도 공지됨)를 이용하여 그들의 크기에 따라 단백질을 분리한다. 겔 여과에서, 단백질 용액을 반투과성 다공성 수지로 채워진 컬럼에 통과시킨다. 반투과성 수지는 컬럼에 의해 분리될 수 있는 단백질의 크기를 결정하는 다양한 공극 크기를 갖는다.

[0413] 형질전환된 숙주에 의해 생성된 hIL2 뮤테인은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. IL2를 정제하는 다양한 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Protein Science, Vol 2. Eds: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploehg, David W. Speicher, Paul T. Wingfield, Unit 6.5 (Copyright 1997, John Wiley and Sons, Inc.)를 참조한다. hIL2 뮤테인은 이. 콜라이에서 생성된 봉입체로부터 또는 주어진 뮤테인을 생성하는 포유동물 또는 효모 배양물로부터의 조건화된 배지로부터 양이온 교환, 겔 여과, 및 또는 역상 액체 크로마토그래피를 이용하여 분리될 수 있다.

[0414] 제조합 폴리펩티드의 실질적으로 정제된 형태는 일상적인 생화학적 절차를 이용하여 발현 시스템으로부터 정제될 수 있고, 본원에 기재된 바와 같이 예를 들어 치료제로서 사용될 수 있다.

[0415] hIL2 뮤테인의 생물학적 활성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 검정될 수 있고, 실질적으로 정제된 형태로서 또는 발현을 위해 분비 리더 서열이 사용된 경우에는 세포 용해물 또는 세포 배지의 일부로서 평가될 수 있다. 이러한 활성 검정에는 CTLL-2 증식, T 세포에서 포스포-STAT5 (pSTAT5) 활성의 유도, PHA-모세포 증식 및 NK 세포 증식이 포함된다.

[0416] 제제:

[0417] 본 개시내용의 치료 방법의 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에게 IL2 뮤테인 (및/또는 IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산)을 포함하는 제약 제제를 투여하는 것을 포함한다. 대상체에게 투여는 정맥내 주사에 의해, 볼루스로서 또는 소정 기간에 걸친 연속 주입에 의해 달성될 수 있다. 대안적인 투여 경로에는 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로가 포함된다. IL2 뮤테인은 또한 적합하게는 종양내, 종양 주위, 병변내, 결절내 또는 병변 주위 경로에 의해 또는 림프로 투여되어, 국소 뿐만 아니라 전신 치료 효과를 발휘한다.

[0418] 일부 실시양태에서, 대상 hIL2 뮤테인 (및/또는 IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산)이 제약 조성물을 비롯한 조성물에 포함될 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 폴리펩티드 또는 핵산 분자 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 제약 조성물은 그의 의도된 투여 경로와 상용성하도록 제제화되고, IL2 뮤테인이 치료 또는 예방을

필요로 하는 대상체에게 투여되는 치료적 용도와 상용성이다.

- [0419] 비경구 제제: 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 hIL2 뮤테인의 비경구 투여를 포함한다. 비경구 투여 경로의 예에는 예를 들어 정맥내, 피내, 피하, 경피 (국소), 경점막, 및 직장 투여가 포함된다. 비경구 제제는 비경구 적용을 위해 사용되는 용액 또는 현탁액을 포함하고, 비히클 담체 및 완충제를 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제약 제제에는 멸균성 수성 용액 (수용성인 경우), 또는 멸균성 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 분산액 및 멸균성 분말이 포함된다.
- [0420] 담체: 담체에는 멸균성 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매가 포함된다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지시킴으로써, 계면활성제, 예를 들어 나트륨 도데실 황페이트를 사용함으로써 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체에는 생리 식염수, 정균수, 크레모포어(Cremophor) ELTM (바스프(BASF), 뉴저지주 파시패니) 또는 인산염 완충된 식염수 (PBS)가 포함된다.
- [0421] 완충제: 용어 완충제에는 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 장성을 조정하기 위한 작용제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스가 포함된다. pH는 산 또는 염기, 예컨대 일- 및/또는 이-염기성 인산나트륨, 염산 또는 수산화나트륨에 의해 (예를 들어, 약 7.2-7.8, 예를 들어, 7.5의 pH로) 조정될 수 있다.
- [0422] 분산액: 일반적으로, 분산액은 활성 화합물에 멸균성 비히클에 혼입시킴으로써 제조되며, 이는 기본 분산 매질 및 상기 나열된 것들로부터 필요한 다른 성분을 함유한다. 멸균성 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균성 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 냉동-건조이며, 이는 그의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 생성한다.
- [0423] 보존제: 대상체에게 비경구 투여를 위한 제약 제제는 멸균성이어야 하고, 용이하게 주사할 수 있도록 유체이어야 한다. 이는 제조 및 보관 조건 하에 안정해야 하고, 오염으로부터 보존되어야 한다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤과 같은 작용제; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이팅제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 멸균성 용액은 상기 나열된 성분 중 하나 또는 조합물과 함께 적절한 용매 중에서 필요한 양으로 활성 화합물을 혼입시킨 후, 필요에 따라 멸균 여과함으로써 제조될 수 있다.
- [0424] 등장화제: 여러 경우에, 조성물에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다.
- [0425] 경구 조성물: 경구 조성물은 사용되는 경우 일반적으로 비활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입되고, 정제, 트로키, 또는 캡슐, 예를 들어 젤라틴 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강 세정제로서 사용하기 위해 유체 담체를 이용하여 제조될 수 있다. 제약학적으로 상용성인 결합제 및/또는 아주반트 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키 등은 임의의 하기 성분, 또는 유사한 성질을 갖는 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 검 트래거캔스 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 붕해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔(Primogel)TM, 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 스테아르산마그네슘 또는 스테로테스(Sterotes)TM; 활주제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실산염, 또는 오렌지향.
- [0426] 흡입 제제: 흡입에 의한 투여의 경우, 대상 hIL2 뮤테인, 또는 그를 코딩하는 핵산은 적합한 추진제, 예를 들어 기체, 예컨대 이산화탄소를 함유하는 가압된 용기 또는 디스펜서, 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다. 이러한 방법에는 미국 특허 번호 6,468,798에 기재된 것들이 포함된다.
- [0427] 점막 및 경피: 대상 hIL2 뮤테인 또는 핵산의 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 투과해야 할 장벽에 적절한 침투제가 제제에서 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 경점막 투여의 경우에는, 세제, 담즙산염, 및 푸시드산 유도체가 포함된다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌제 좌제 (예를 들어, 통상적인 좌제 베이스, 예컨대 코코아 버터 및 다른 글리세리드를 사용함)의 사용을 통해 또는 직장 전달을 위한 정체 관장에 의해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 관련 기술분야에 일반적으로 공지된 연고, 고약, 겔 또는 크림

으로 제제화되고, 투과 증진제, 예컨대 에탄올 또는 라놀린을 포함할 수 있다.

- [0428] 연장된 방출 및 데포 제제: 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 치료를 필요로 하는 대상체에게 IL2 뮤테인 작용제의 연장된 방출을 제공하기 위한 제제로 투여된다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 방출 제제의 예는 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 생성될 수 있다. 한 실시양태에서, 대상 hIL2 뮤테인 또는 핵산은 신체로부터 급속한 제거로부터 돌연변이체 hIL2 폴리펩티드를 보호하는 담체를 사용하여, 예컨대 제어 방출 제제, 예컨대 임플란트 및 미세캡슐화 전달 시스템으로 제조된다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제는 표준 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 물질은 또한 알자 코퍼레이션(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티컬즈, 인크.(Nova Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 입수될 수 있다. 리포솜 현탁액 (바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체에 의해 감염된 세포에 대해 표적화된 리포솜 포함) 또한 제약상 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 방법에 따라, 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.
- [0429] IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산의 투여 (유전자 요법):
- [0430] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산은 문헌 [McCaffrey et al. (Nature 418:6893, 2002), Xia et al. (Nature Biotechnol. 20: 1006-1010, 2002), 또는 Putnam (Am. J. Health Syst. Pharm. 53: 151-160, 1996, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53:325, 1996)]에 기재된 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 형질감염 또는 감염에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 재조합 발현 벡터의 제약상 허용되는 제제의 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 한 실시양태에서, 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 재조합 벡터는 재조합 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노 연관된 바이러스 (rAAV) 또는 재조합 아데노바이러스 (rAd), 특히 인간 아데노바이러스 혈청형 3 및/또는 5로부터 유래된 복제 결핍 아데노바이러스이다. 일부 실시양태에서, 복제 결핍 아데노바이러스는 인간 세포에서 세포 주기 및/또는 아포토시스 경로를 개시하는 바이러스의 능력을 방해하는 E1 영역에 대한 하나 이상의 변형을 갖는다. 복제 결핍 아데노바이러스 벡터는 임의적으로 E3 도메인에서 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스는 복제 적격 아데노바이러스이다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스는 림프구에서 선택적으로 복제하도록 조작된 복제 적격 재조합 바이러스이다.
- [0431] 한 실시양태에서, IL2 뮤테인 제제는 Fernandes 및 Taforo의 미국 특허 번호 4,604,377 (1986년 8월 5일 허여됨) (그의 교시내용은 본원에 참조로 포함됨) 및 Yasui 등의 미국 특허 번호 4,645,830의 교시내용에 따라 제공된다.
- [0432] 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 시린지 또는 다중 용량 바이알에 동봉될 수 있다. 한 실시양태에서, 제제는 비경구 투여를 위해 사전 충전된 시린지에 제공된다.
- [0433] 치료 방법
- [0434] 본 개시내용은 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 IL2 뮤테인 (또는 IL2 뮤테인을 코딩하는 재조합 벡터를 포함하는 IL2 뮤테인을 코딩하는 핵산)의 투여에 의한 신생물성 질환 장애 또는 상태를 앓고 있는 대상체의 치료에서의 IL2 뮤테인의 사용 방법을 제공한다.
- [0435] 본 개시내용은 CD132에 대한 감소된 결합 친화도를 갖지만 야생형 인간 IL2의 친화도에 필적하는 CD122 및/또는 CD25에 대한 유의한 결합 친화도를 보유하는 hIL2 뮤테인의 치료 유효량의 투여에 의한 신생물성 질환, 장애 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 방법 및 조성물을 제공한다.
- [0436] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CD132에 대한 감소된 결합 친화도를 갖지만, 야생형 hIL2의 활성화에 필적하는 CD122 및/또는 CD25에 대한 유의한 결합 친화도를 보유하는, 화학요법제, 면역 체크포인트 조절제, 방사선요법 및/또는 물리적 개입 치료 방법, 예컨대 수술 중 1종 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는 보충제와 조합된 인간 IL2 뮤테인의 치료 유효량의 투여에 의한 신생물성 질환, 장애 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 방법 및 조성물을 개시한다.
- [0437] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 신생물성 질환의 치료를 위해 1개 이상의 IL2 수용체에 변형된 결합 특성을 제공하는 인간 인터류킨-2 (IL2) 뮤테인을 제공한다.

- [0438] 치료에 적용가능한 신생물: 본 개시내용의 조성물 및 방법은 양성 및 악성 신생물을 포함한 신생물의 존재를 특징으로 하는 신생물성 질환을 앓고 있는 대상체, 및 신생물성 질환의 치료에 유용하다.
- [0439] 본 개시내용의 조성물 및 방법을 사용한 치료에 적용가능한 양성 신생물의 예는 선종, 섬유종, 혈관종 및 지방종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 조성물 및 방법을 사용한 치료에 적용가능한 전암성 신생물의 예는 증식증, 비정형증, 화생 및 이형성증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 조성물 및 방법을 사용한 치료에 적용가능한 악성 신생물의 예는 암종 (상피 조직, 예컨대 피부 또는 내부 기관을 라이닝하는 조직으로부터 발생하는 암), 백혈병, 림프종, 및 전형적으로 골 지방, 근육, 혈관 또는 결합 조직으로부터 유래된 육종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 용어 신생물에는 바이러스 유발 신생물, 예컨대 사마귀 및 EBV 유발 질환 (즉, 감염성 단핵구증), 반흔 형성, 과다증식성 혈관 질환, 예컨대 내막 평활근 세포 증식증, 재협착 및 혈관 폐쇄 등이 포함된다.
- [0440] 용어 "신생물성 질환"은 유방암; 육종 (골육종 및 혈관육종 및 섬유육종을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 백혈병, 림프종, 비뇨생식기암 (난소암, 요도암, 방광암 및 전립선암을 포함하나 이에 제한되지는 않음); 위장암 (결장 식도암 및 위암을 포함하나 이에 제한되지는 않음); 폐암; 골수종; 췌장암; 간암; 신장암; 내분비암; 피부암; 및 신경교종 및 신경모세포종, 성상세포종, 골수이형성 장애를 포함한 악성 또는 양성 뇌 또는 중추 및 말초 신경계 (CNS) 종양; 자궁경부 상피내 암종; 장 폴립증; 구강 백반증; 조직구증, 켈로이드 반흔, 혈관종을 포함한 과다증식성 반흔; 과다증식성 동맥 협착, 건선, 염증성 관절염; 과다각화증 및 관절염을 동반한 구진편평상피 발진을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 고형 종양 및 비-고형 종양을 특징으로 하는 암을 포함한다.
- [0441] 용어 신생물성 질환은 암종을 포함한다. 용어 "암종"은 호흡기계 암종, 위장계 암종, 비뇨생식기계 암종, 고형 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비계 암종 및 흑색종을 포함한 상피 또는 내분비 조직의 악성종양을 지칭한다. 용어 신생물성 질환은 선암종을 포함한다. "선암종"은 선상 조직으로부터 유래된 암종 또는 종양 세포가 인식가능한 선상 구조를 형성하는 암종을 지칭한다.
- [0442] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조혈 신생물성 장애"는, 예를 들어 골수성, 림프성 또는 적혈구 계통으로부터 발생하는 조혈 기원의 과형성/신생물성 세포, 또는 그의 전구체 세포를 수반하는 신생물성 질환을 지칭한다.
- [0443] 골수성 신생물은 골수증식성 신생물, 호산구증가증을 동반한 골수성 및 림프성 장애, 골수증식성/골수이형성 신생물, 골수이형성 증후군, 급성 골수성 백혈병 및 관련 전구체 신생물, 및 모호 계통의 급성 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용에 따른 치료에 적용가능한 예시적인 골수성 장애는 급성 전골수성 백혈병 (APML), 급성 골수 백혈병 (AML) 및 만성 골수 백혈병 (CML)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0444] 림프성 신생물은 전구체 림프성 신생물, 성숙한 B-세포 신생물, 성숙한 T-세포 신생물, 호지킨 림프종, 및 면역결핍-연관 림프증식성 장애를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용에 따른 치료에 적용가능한 예시적인 림프성 장애는 B-계통 ALL 및 T-계통 ALL을 포함하는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 전림프구성 백혈병 (PLL), 모발상 세포 백혈병 (HLL) 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0445] 일부 경우에, 조혈 신생물성 장애는 불량하게 분화된 급성 백혈병 (예를 들어, 적혈모구성 백혈병 및 급성 거핵모구성 백혈병)으로부터 발생한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조혈 신생물성 장애"는 비-호지킨 림프종 및 그의 변이체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 악성 림프종, 말초 T 세포 림프종, 성인 T-세포 백혈병/림프종 (ATL), 피부 T 세포 림프종 (CTCL), 거대 과립 림프구성 백혈병 (LGF), 호지킨병 및 리드-스탬버그병을 지칭한다.
- [0446] 대상체가 "신생물성 질환을 앓고 있는"지 여부의 결정은 대상체가 치료를 필요로 하거나 또는 치료로부터 이익을 얻을 것인, X선, CT-스캔, 통상적인 실험실 진단 시험 (예를 들어 혈구 계수 등), 게놈 데이터, 단백질 발현 데이터, 면역조직화학을 포함하나 이에 제한되지는 않는 질환, 장애 또는 상태의 확인을 위해 관련 분야에서 허용되는 이용가능한 정보에 기초하여 대상체에 대해 의사에 의해 이루어진 결정을 지칭한다.
- [0447] 종양 돌연변이 부담 및 면역요법: 적응 면역계는 종양 돌연변이에 반응하여 신생물성 세포의 인식 및 제거를 용이하게 하는 특정 세포 표면 단백질의 디스플레이를 인식한다. 보다 높은 종양 돌연변이 부담 (TMB)을 보유하는 종양은 이러한 "종양 항원"을 나타낼 가능성이 더 크다. 사실, 임상 경험은 높은 종양 돌연변이 부담을 나타내는 신생물성 세포로 구성된 종양이 면역 체크포인트 차단을 포함한 면역 요법에 반응할 가능성이 더 크다는 것을 보여준다 (Rizvi, et al. (2015) Science 348(6230): 124-128; Marabelle, et al. (2020) Lancet Oncol 21(10):1353-1365). 종양 돌연변이 부담은 면역 요법, 예컨대 본 개시내용에 제공된 것에 대해 증가된 감수성

을 갖는 종양을 확인하기 위한 바이오마커로서 유용하다.

[0448] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물 및 방법은 중간 또는 높은 종양 돌연변이 부담 (TMB)을 나타내는 고형 종양의 형성과 연관된 신생물성 질환의 치료에 유용하다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물 및 조성물 및 방법은 중간 또는 높은 종양 돌연변이 부담 (TMB)을 나타내는 면역 감수성 고형 종양의 치료에 유용하다. 본 개시내용의 조성물 및 방법을 사용한 치료에 적용가능한 중간 또는 높은 종양 돌연변이 부담을 갖는 고형 종양의 형성과 연관된 신생물성 질환의 예는 비소세포 폐암 및 신세포암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 조성물 및 방법은 중간 또는 높은 TMB를 나타내는 비소세포 폐암 (NSCLC)의 치료에 유용하다. NSCLC 세포는 전형적으로 유의한 수의 돌연변이를 보유하고, 따라서 면역 요법에 보다 감수성이다. NSCLC에 대한 현행 표준 관리는 암 개시 메커니즘에 의해 계층화되어 있고, 일반적으로 NCCN 또는 ASCO의 권고를 따른다. NSCLC의 큰 비율은 증가된 TMB를 갖고, 따라서 초기에 면역 요법에 보다 감수성이다. 그러나, 대부분의 종양은 결국 면역 체크포인트 억제제에 재발한다. 재발성 종양을 갖는 환자는 전형적으로 면역 체크포인트 억제 전의 병변과 비교하여 종양에서의 감소된 T 세포 침윤, 전신 T 세포 소진 및 억제된 면역 반응을 나타낸다. 따라서, 고갈된 회귀 종양 침윤 T 세포를 재활성화 및 확장시키는 개선된 면역 요법이 요구된다.

[0449] 종양 돌연변이 부담: 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "종양 돌연변이 부담 (TMB)"은 종양 샘플 내 핵산의 적어도 0.2 메가염기가 서열분석되는, 대안적으로 종양 샘플 내 핵산의 적어도 0.5 메가염기가 서열분석되는, 대안적으로 종양 샘플 내 핵산의 적어도 1 메가염기가 서열분석되는, 또는 대안적으로 종양 샘플 내 핵산의 적어도 5 메가염기 또는 대안적으로 적어도 10 메가염기가 서열분석되는, 핵산 서열분석에 의해 결정된 바와 같은 메가염기당 돌연변이의 수로서 표현되는 종양 샘플에 존재하는 체세포 돌연변이의 수를 지칭한다. 종양 돌연변이 부담의 비율은 신생물성 질환에 따라 달라지므로, 종양 돌연변이 부담은 주어진 질환 유형의 맥락에서 평가되어야 하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 특정 유형의 암은 메가염기당 1개 미만의 돌연변이 내지 메가염기당 수백개의 돌연변이의 광범위한 돌연변이 비율을 나타낸다. 문헌 [Chalmers, et al. (2017) Genome Medicine 9:34]에 기재된 바와 같이, 낮은 종양 돌연변이 부담 (낮은 TMB)을 평가하는데 있어서의 정확도는 파운데이션원 (FoundationOne)® 검정 (파운데이션 메디신 (Foundation Medicine; 매사추세츠주 캠프리지), 문헌 [Frampton, et al. (2013) Nature Biotechnology 31:1023-31; He, et al. (2016) Blood 127:3004-14]에 기재된 바와 같음)을 사용하여 개선된다.

[0450] 높은, 낮은 및 중간 TMB: 종양은 통상적으로 임상 실시에서 "높은", "낮은" 또는 "중간" 종양 돌연변이 부담을 나타내는 것을 특징으로 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "중간 종양 돌연변이 부담"은 특정한 문맥에서 용어 낮은 돌연변이 부담에 적용된 종양 돌연변이 부담의 수준의 상위 한계값보다 더 큰 종양 돌연변이 부담을 의미한다. 일부 실시양태에서, 용어 중간 종양 돌연변이 부담은 서열분석된 메가염기당 약 15개 초과 돌연변이이지만 서열분석된 메가염기당 약 100개 미만의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 약 10개 초과 돌연변이이지만 서열분석된 메가염기당 75개 미만의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 약 5개 초과 돌연변이이지만 서열분석된 메가염기당 50개 미만의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 약 1개 초과 돌연변이이지만 서열분석된 메가염기당 30개 미만의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 약 1개 초과 돌연변이이지만 서열분석된 메가염기당 20개 미만의 돌연변이이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 높은 종양 돌연변이는 서열분석된 메가염기당 100개 이상의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 75개 이상의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 50개 이상의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 30개 이상의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 20개 이상의 돌연변이, 또는 대안적으로 서열분석된 메가염기당 10개 이상의 돌연변이의 중간 종양 돌연변이 부담을 초과하는 종양 돌연변이 부담이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "낮은 종양 돌연변이 부담"은 서열분석된 메가염기당 15개 이하의 돌연변이, 서열분석된 메가염기당 10개 이하의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 7개 이하의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 5개 이하의 돌연변이, 대안적으로 서열분석된 메가염기당 2개 이하의 돌연변이, 또는 대안적으로 서열분석된 메가염기당 1개 이하의 돌연변이의 종양 돌연변이 부담을 의미한다. TMB를 평가하기 위한 서열분석은 관련 기술분야에 널리 확립된 차세대 서열분석 (NGS) 기술을 사용하는 부분 게놈 서열분석, 전체 엑솜 서열분석 (WES) 또는 전체 게놈 서열분석 (WGS)을 포함한 관련 기술분야에서 허용되는 임의의 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. TMB의 평가의 정확도는 서열분석된 핵산의 양에 따라 증가하지만, TMB를 갖는 샘플에서 백분율 편차는 더 낮아서, 높은 TMB는 단지 수백개의 유전자의 표적화된 서열분석에 의해 효과적으로 확인될 수 있고, 반면 중간 TMB는 서열분석된 적어도 0.5 Mb의 서열에 의해 개선되고, 반면 낮은 TMB의 신뢰할만한 평가는 종양 샘플에서 5 메가염기, 대안적으로 10 메가염기 또는 그 초과 핵산의 서열분석에 의해 개선된다.

[0451] 항신생물성 효능의 평가: 암의 치료에서의 본 개시내용의 방법의 효능의 결정은 일반적으로 관련 기술분야에서

인식되는 1개 이상의 파라미터, 예컨대 병변의 감소, 특히 전이성 병변의 감소, 전이의 감소, 종양 부피의 감소, ECOG 점수의 개선 등의 달성과 연관된다. 치료에 대한 반응을 결정하는 것은 IL2 뮤테인 요법에 대한 대상체의 반응의 존재 및 정도, 및 이러한 요법에 의해 유발된 부작용의 존재 및 정도를 포함한, IL2 뮤테인 요법의 임의의 측면에서 유용한 재현가능한 정보를 제공할 수 있는 바이오마커의 측정을 통해 평가될 수 있다. 예로서, 비제한적으로, 바이오마커는 IFN γ 의 증진, 및 그랜자임 A, 그랜자임 B 및 퍼포린의 상향조절; CD8+ T-세포 수 및 기능의 증가; IFN γ 의 증진, CD8+ T-세포 상에서의 ICOS 발현의 증가, IL-10 발현 T_{Reg} 세포의 증진을 포함한다. 치료에 대한 반응은 완전 반응 (CR), 부분 반응 (PR), 안정 질환 (SD)과 같이 사용될 수 있는 임상 효능의 통상적인 척도에서의 개선을 특징으로 할 수 있고, 표적 병변과 관련하여 RECIST에 의해 정의된 바와 같은 완전 반응 (CR), 불완전 반응/안정 질환 (SD) 뿐만 아니라 면역-관련 반응 기준 (irRC)에 의해 정의된 바와 같은 면역-관련 완전 반응 (irCR), 면역-관련 부분 반응 (irPR), 및 면역-관련 안정 질환 (irSD)은 포유동물 (예를 들어 인간) 대상체에서의 신생물성 질환의 치료에서 효능을 입증하는 것으로서 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고려된다.

[0452] 혈청 농도의 유지: 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CD132에 대해 감소된 결합 친화도를 갖지만 야생형 hIL2에 필적하는 CD122 및/또는 CD25에 대한 유의한 결합 친화도를 보유하는 치료 유효량의 hIL2 뮤테인의 투여에 의한 신생물성 질환, 장애 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 방법 및 조성물을 제공하고, 여기서 hIL2 뮤테인의 혈청 농도는 상기 IL2 뮤테인과 관련하여 CD3-활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 촉진하기에 충분한 IL2 뮤테인의 유효 농도 이상 (예를 들어, EC₁₀^{PRO} 이상, 대안적으로 EC₂₀^{PRO} 이상, 대안적으로 EC₃₀^{PRO} 이상, 대안적으로 EC₄₀^{PRO} 이상, EC₅₀^{PRO} 이상, 대안적으로 EC₆₀^{PRO} 이상)의 혈청 농도에서, 그러나 T-세포의 활성화를 유도하기에 충분한 상기 IL2 뮤테인의 혈청 농도에서의 유효 농도 이하 (예를 들어, EC₁₀₀^{PRO} 이하, 대안적으로 EC₉₀^{PRO} 이하, 대안적으로 EC₈₀^{PRO} 이하, 대안적으로 EC₇₀^{PRO} 이하, EC₆₀^{PRO} 이하, 대안적으로 EC₅₀^{PRO} 이하)의 혈청 농도에서, 대부분 (즉, 기간의 약 50% 초과, 대안적으로 약 60% 초과, 대안적으로 약 70% 초과, 대안적으로 약 80% 초과, 대안적으로 약 90% 초과)의 기간 (예를 들어, 적어도 24시간, 대안적으로 적어도 48시간, 대안적으로 적어도 72시간, 대안적으로 적어도 96시간, 대안적으로 적어도 120시간, 대안적으로 적어도 144시간, 대안적으로 적어도 7일, 대안적으로 적어도 10일, 대안적으로 적어도 12일, 대안적으로 적어도 14일, 대안적으로 적어도 28일, 대안적으로 적어도 45일, 대안적으로 적어도 60일, 또는 그 초과) 동안 유지된다.

[0453] IL2 뮤테인과 보충 치료제의 조합:

[0454] 본 개시내용은 1개 이상의 추가의 활성제 ("보충제")와 조합된 본 개시내용의 IL2 뮤테인의 용도를 제공한다. 이러한 추가의 조합은 "보충 조합" 또는 "보충 조합 요법"으로 상호교환가능하게 지칭되고, 본 개시내용의 IL2 뮤테인과 조합되어 사용되는 치료제는 "보충제"로 지칭된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "보충제"에는 별도로 투여되거나 또는 도입될 수 있는, 예를 들어 별도의 투여를 위해 별도로 제제화될 수 있는 (예를 들어 키트에서 제공될 수 있는 바와 같이) 작용제 및/또는 hIL2 뮤테인과 조합되어 투여되거나 또는 도입될 수 있는 요법이 포함된다.

[0455] 조합되어: 본원에서 사용된 바와 같이, 대상체에게 다중 작용제의 투여와 관련하여 사용될 때 용어 "조합되어"는 대상체에게 제1 작용제 적어도 하나 추가의 (즉, 제2, 제3, 제4, 제5 등) 작용제의 투여를 지칭한다. 본 발명의 목적을 위해, 제1 작용제의 투여로 인한 생물학적 효과가 제2 작용제의 투여시 대상체에서 지속되어, 제1 작용제 및 제2 작용제의 치료 효과가 중첩되는 경우, 한 작용제 (예를 들어 hIL2 뮤테인)는 제2 작용제 (예를 들어, 면역 체크포인트 경로의 조정제)와 조합되어 투여되는 것으로 고려된다. 예를 들어, PD1 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어 니볼루맙 또는 펌브롤리주맙)는 전형적으로 2주마다 또는 3주마다 IV 주입에 의해 투여되는 반면에, 본 개시내용의 hIL2 뮤테인은 전형적으로 더욱 빈번하게, 예를 들어 매일, BID, 또는 매주 투여될 수 있다. 그러나, 제1 작용제 (예를 들어 펌브롤리주맙)의 투여는 연장된 시간에 걸쳐 치료 효과를 제공하고, 제2 작용제 (예를 들어 hIL2 뮤테인)의 투여는 그의 치료 효과를 제공하는 반면에, 제1 작용제의 치료 효과는 계속 유지되어, 제2 작용제는 제1 작용제와 조합되어 투여되는 것으로 고려되지만, 제1 작용제는 제2 작용제의 투여 시점으로부터 유의하게 떨어진 시점에 (예를 들어, 수일 또는 수주) 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 작용제가 동시에 (서로 30분 내에), 동시에 또는 순차적으로 투여되는 경우, 한 작용제는 제2 작용제와 조합되어 투여되는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 작용제가 서로 약 24시간 내에, 바람직하게는 서로 약 12시간 내에, 바람직하게는 서로 약 6시간 내에, 바람직하게는 서로 약 2시간 내에, 또는

바람직하게는 서로 약 30분 내에 투여되는 경우, 제1 작용제는 제2 작용제와 "동시에" 투여되는 것으로 간주된다. 용어 "조합되어"는 또한 제1 작용제 및 제2 작용제가 단일 제약상 허용되는 제제로 공동 제제화되고, 공동-제제가 대상체에게 투여되는 것인 상황에 적용되는 것으로 이해되어야 한다. 특정한 실시양태에서, hIL2 뮤테인 및 보충제(들)은 순차적으로 투여되거나 또는 적용되고, 예를 들어 한 작용제는 하나 이상의 다른 작용제 이전에 투여된다. 다른 실시양태에서, hIL2 뮤테인 및 보충제(들)은 동시에 투여되고, 예를 들어 2가지 이상의 작용제가 동일한 시간에 또는 대략 동일한 시간에 투여되고; 2가지 이상의 작용제가 2가지 이상의 별도의 제제에 존재하거나 또는 단일 제제 (즉, 공동-제제)로 조합될 수 있다. 작용제가 순차적으로 또는 동시에 투여되는지 여부와는 무관하게, 이들은 본 개시내용의 목적을 위해 조합물로 투여되는 것이 고려된다.

[0456] 최적 조합 요법의 확립: 추가 실시양태는 조합물 중 작용제(들)의 최적량을 결정하는 방법 또는 모델을 포함한다. 최적량은, 예를 들어 대상체 또는 대상체 집단에서 최적 효과를 달성하는 양, 또는 작용제 중 1종 이상과 연관된 유해 효과를 최소화 또는 제거하면서 치료 효과를 달성하는 양일 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체 (예를 들어, 인간) 또는 대상체 집단에서 본원에 기재된 질환, 장애 또는 상태 (예를 들어, 암성 상태)를 치료 또는 예방하는데 효과적인 것으로 공지되어 있거나 또는 효과적인 것으로 결정된 hIL2 뮤테인 및 보충제의 조합을 수반하고, 한 작용제의 양은 다른 작용제(들)의 양은 일정하게 유지하면서 적정된다. 이러한 방식으로 작용제(들)의 양을 조작함으로써, 임상의는, 예를 들어 특정한 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나, 또는 유해 효과를 제거하거나 또는 유해 효과를 감소시켜 상황 하에 허용되도록 하는데 가장 효과적인 작용제의 비율 결정할 수 있다.

[0457] 보충제:

[0458] 화학요법제: 일부 실시양태에서, 보충제는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 보충제는 다중 화학요법제의 "칵테일"이다. 일부 실시양태에서, 화학요법제 또는 칵테일은 1종 이상의 물리적 방법 (예를 들어, 방사선 요법)과 조합하여 투여된다. 용어 "화학요법제"는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤펁진, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 예컨대 블레오마이신 A₂, 악티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신 및 유도체, 예컨대 테메톡시-다우노마이신, 11-데옥시다우노루비신, 13-데옥시다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, N-메틸 미토마이신 C; 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트, 디데아자테트라히드로폴산 및 폴린산; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신제 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다물; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리테탈아민; 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 (Ara-C); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀, nab-파클리탁셀 및 도세탁셀; 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토크세이트; 백금 및 백금 배위 착물 예컨대 시스플라틴, 옥사플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT11; 토포이소머라제 억제제; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 탁산, 예컨대 파클리탁셀, 도세탁셀, 카바지탁

셀; 카르미노마이신, 아드리아마이신, 예컨대 4'-에피아드리아마이신, 4-아드리아마이신-14-벤조에이트, 아드리아마이신-14-옥타노에이트, 아드리아마이신-14-나프탈렌아세테이트; 콜히친 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0459] 용어 "화학요법제"는 또한 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항호르몬제, 예컨대 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜, 팔록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, 오나프리스톤 및 토레미펜; 및 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 니루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0460] 일부 실시양태에서, 보충제는 시토킨 또는 시토킨 길항제 예컨대 IL-12, INF α , 또는 항-표피 성장 인자 수용체, 이리노테칸; 테트라히드로폴레이트 항대사물 예컨대 페메트렉세드; 종양 항원에 대한 항체, 모노클로날 항체 및 독소의 복합체, T-세포 아주반트, 골수 이식, 또는 항원 제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포 요법), 항종양 백신, 복제 적격 바이러스, 신호 전달 억제제 (예를 들어, 글리벡(Gleevec)® 또는 헤르셉틴(Herceptin)®) 또는 종양 성장의 상가적 또는 상승작용적 억제를 달성하기 위한 면역조절제, 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID), 시클로옥시게나제-2 (COX-2) 억제제, 스테로이드, TNF 길항제 (예를 들어, 레미케이드(Remicade)® 및 엔브렐(Enbrel)®), 인터페론- β 1a (아보넥스(Avonex)®), 및 인터페론- β 1b (베타세론(Betaseron)®), 뿐만 아니라 TAC, 폴폭스(FOLFOX), TPC, FEC, ADE, 폴폭스-6, 에포크(EPOCH), CHOP, CMF, CVP, BEP, OFF, 플록스(FLOX), CVD, TC, 폴피리(FOLFIRI), PCV, 폴폭시리(FOLFOXIRI), ICE-V, 젤록스(XELOX), 및 관련 기술분야의 통상의 임상에 의해 용이하게 인지되는 다른 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 공지된 화학요법 치료 요법에서 실시되는 바와 같은 상기 중 1종 이상의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 신생물성 질환의 치료에 유용한 것으로 관련 기술분야에서 확인된 1종 이상의 화학적 또는 생물학적 작용제이다.

[0461] 일부 실시양태에서, hIL2 뮤테인은 BRAF/MEK 억제제, 키나제 억제제 예컨대 수니티닙, PARP 억제제 예컨대 올라파립, EGFR 억제제 예컨대 오시메르티닙 (Ahn, et al. (2016) J Thorac Oncol 11:S115), IDO 억제제 예컨대 에파카도스타트, 및 종양용해 바이러스 예컨대 탈리모겐 라허파렐백 (T-VEC)과 조합되어 투여된다.

[0462] 치료 항체와의 조합

[0463] 일부 실시양태에서, "보충제"는 치료 항체 (이중특이적 T 세포 연관체 (BITE), 이중 친화도 재표적화 (DART) 구축물 및 삼중특이적 킬러 연관체 (TriKE) 구축물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 종양 연관 항원에 결합하는 이중특이적 및 삼중특이적 항체 포함)이다.

[0464] 일부 실시양태에서, 치료 항체는 HER2 (예를 들어 트라스투주맙, 페르투주맙, 아도-트라스투주맙 엠탄신), 넥틴-4 (예를 들어 엔포르투맙), CD79 (예를 들어 폴라투주맙 베도틴), CTLA4 (예를 들어 이필루무맙), CD22 (예를 들어 목세투모맙 파수도톡스), CCR4 (예를 들어 마가물리주맙), IL23p19 (예를 들어 틸드라키주맙), PDL1 (예를 들어 두르발루맙, 아벨루맙, 아테졸리주맙), IL17a (예를 들어 익세키주맙), CD38 (예를 들어 다라투무맙), SLAMF7 (예를 들어 엘로투주맙), CD20 (예를 들어 리툭시맙, 토시투모맙, 이브리투모맙 및 오파투무맙), CD30 (예를 들어 브렌톡시맙 베도틴), CD33 (예를 들어 겐투주맙 오조가미신), CD52 (예를 들어 알렘투주맙), EpCam, CEA, fpA33, TAG-72, CAIX, PSMA, PSA, 폴레이트 결합 단백질, GD2 (예를 들어 디누톡시맙), GD3, IL6 (예를 들어 실루톡시맙) GM2, Le^y, VEGF (예를 들어 베바시주맙), VEGFR, VEGFR2 (예를 들어 라무시루맙), PDGFR α (예를 들어 올라라투맙), EGFR (예를 들어 세툭시맙, 파니투무맙 및 네시투무맙), ERBB2 (예를 들어 트라스투주맙), ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAIL R1, TRAIL R2, RANKL RAP, 테나신, 인테그린 α V β 3 및 인테그린 α 4 β 1로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 종양 항원에 결합하는 항체이다.

[0465] FDA 승인되고 신생물성 질환의 치료에 사용하기 위한 보충제로서 사용될 수 있는 항체 치료제의 예는 하기 표 14에 제공된 것을 포함한다.

표 14. 승인된 항신생물성 질환 항체 및 적응증			
명칭	상표명	표적; 포맷	적응증
[fam]- 트라스투주맵 테록스테칸	엔헤르투(Enhertu)	HER2; 인간화 IgG1 ADC	HER2+ 유방암
엔포르투맵 베도틴	파드셉(Padcev)	넥틴-4; 인간 IgG1 ADC	요로상피암
폴라투주맵 베도틴	폴리비(Polivy)	CD79b; 인간화 IgG1 ADC	미만성 대 B-세포 림프종
세미폴리맵	리브타요(Libtayo)	PD-1; 인간 mAb	피부 편평 세포 암종
목세투모맵 파수도복스	루목시티(Lumoxiti)	CD22; 듀린 IgG1 dsFv 면역독소	모발상 세포 백혈병
모가물리주맵	포텔리게오(Poteligeo)	CCR4; 인간화 IgG1	피부 T 세포 림프종
틸드라키주맵	일루미야(Ilumya)	IL23p19; 인간화 IgG1	관상 건선
이발리주맵	트로가르조(Trogarzo)	CD4; 인간화 IgG4	HIV 감염
두르발루맵	임핀지(IMFINZI)	PD-L1; 인간 IgG1	방광암
이노투주맵 오조가미신	베스폰사(BESPONSA)	CD22; 인간화 IgG4, ADC	혈액 악성종양
아벨루맵	바벤시오(Bavencio)	PD-L1; 인간 IgG1	메르켈 세포 암종
아테졸리주맵	테센트릭(Tecentriq)	PD-L1; 인간화 IgG1	방광암
올라라투맵	라르트루보(Lartruvo)	PDGFR α ; 인간 IgG1	연부 조직 육종
익세키주맵	탈츠(Taltz)	IL-17a; 인간화 IgG4	건선
다라투무맵	다르잘렉스(Darzalex)	CD38; 인간 IgG1	다발성 골수종
엘로투주맵	엠폴리시티(Empliciti)	SLAMF7; 인간화 IgG1	다발성 골수종
네시투무맵	포르트라자(Portrazza)	EGFR; 인간 IgG1	비소세포 폐암
디누톡시맵	유니톡신(Unituxin)	GD2; 키메라 IgG1	신경모세포종

[0466]

표 14. 승인된 항신생물성 질환 항체 및 적응증			
명칭	상표명	표적; 포맷	적응증
니볼루맙	옵디보(Opdivo)	PD1; 인간 IgG4	흑색종, 비소세포 폐암
블리나투모맙	블린사이토(Blinicyto)	CD19, CD3; 무린 이중특이적 탠덤 scFv	급성 림프모구성 백혈병
켄트루주맙	키트루다(Keytruda)	PD1; 인간화 IgG4	흑색종
라무시루맙	시람자(Cyramza)	VEGFR2; 인간 IgG1	위암
실투시맙	실반트(Sylvant)	IL-6; 키메라 IgG1	케슬만병
오비누주맙	가지바(Gazyva)	CD20; 인간화 IgG1; 당조작됨	만성 림프구성 백혈병
아도-트라스투주맙 엠탄신	카드실라(Kadcyla)	HER2; 인간화 IgG1, ADC	유방암
페르투주맙	페르제타(Perjeta)	HER2; 인간화 IgG1	유방암
브렌투시맙 베도틴	에드세트리스(Adcetris)	CD30; 키메라 IgG1, ADC	호지킨 림프종, 전신 역형성 대세포 림프종
이필리무맙	예르보이(Yervoy)	CTLA-4; 인간 IgG1	전이성 흑색종
오파투무맙	아제라(Arzerra)	CD20; 인간 IgG1	만성 림프구성 백혈병
세르톨리주맙 페골	심지아(Cimzia)	TNF; 인간화 Fab, PEG화	크론병
카투막소맙	레모밤(Removab)	EPCAM/CD3; 래트/마우스 이중특이적 mAb	악성 복수
파니투무맙	벡티빅스(Vectibix)	EGFR; 인간 IgG2	결장직장암
베마시주맙	아바스틴(Avastin)	VEGF; 인간화 IgG1	결장직장암
세투시맙	에르비투스(Erbitux)	EGFR; 키메라 IgG1	결장직장암
토시투모맙-H131	벡사르(Bexxar)	CD20; 무린 IgG2a	비-호지킨 림프종
이브리투모맙 티옥세탄	제발린(Zevalin)	CD20; 무린 IgG1	비-호지킨 림프종
겔투주맙 오조가미신	밀로타르그(Mylotarg)	CD33; 인간화 IgG4, ADC	급성 골수성 백혈병
트라스투주맙	헤르셉틴(Herceptin)	HER2; 인간화 IgG1	유방암
인플릭시맙	레미케이드(Remicade)	TNF; 키메라 IgG1	크론병

[0467]

표 14. 승인된 항신생물성 질환 항체 및 적응증			
명칭	상표명	표적; 포맷	적응증
리툭시맙	맵테라(MabThera), 리툭산(Rituxan)	CD20; 키메라 IgG1	비-호지킨 림프종
에드레콜로맙	파노렉스(Panorex)	EpCAM; 무린 IgG2a	결장직장암

[0468]

[0469]

일부 실시양태에서, 항체는 제1 및 제2 종양 항원을 표적화하는 이중특이적 항체, 예컨대 HER2 및 HER3 (HER2 x HER3으로 약칭됨), FAP x DR-5 이중특이적 항체, CEA x CD3 이중특이적 항체, CD20 x CD3 이중특이적 항체, EGFR-EDV-miR16 삼중특이적 항체, gp100 x CD3 이중특이적 항체, Ny-eso x CD3 이중특이적 항체, EGFR x cMet 이중특이적 항체, BCMA x CD3 이중특이적 항체, EGFR-EDV 이중특이적 항체, CLEC12A x CD3 이중특이적 항체, HER2 x HER3 이중특이적 항체, Lgr5 x EGFR 이중특이적 항체, PD1 x CTLA-4 이중특이적 항체, CD123 x CD3 이중특이적 항체, gpA33 x CD3 이중특이적 항체, B7-H3 x CD3 이중특이적 항체, LAG-3 x PD1 이중특이적 항체,

DLL4 x VEGF 이중특이적 항체, 카드헤린-P x CD3 이중특이적 항체, BCMA x CD3 이중특이적 항체, DLL4 x VEGF 이중특이적 항체, CD20 x CD3 이중특이적 항체, Ang-2 x VEGF-A 이중특이적 항체, CD20 x CD3 이중특이적 항체, CD123 x CD3 이중특이적 항체, SSTR2 x CD3 이중특이적 항체, PD1 x CTLA-4 이중특이적 항체, HER2 x HER2 이중특이적 항체, GPC3 x CD3 이중특이적 항체, PSMA x CD3 이중특이적 항체, LAG-3 x PD-L1 이중특이적 항체, CD38 x CD3 이중특이적 항체, HER2 x CD3 이중특이적 항체, GD2 x CD3 이중특이적 항체, 및 CD33 x CD3 이중특이적 항체이다. 이러한 치료 항체는 직접적으로 또는 링커, 특히 산, 염기 또는 효소적으로 불안정한 링커를 통해 1종 이상의 화학요법제 (예를 들어 항체 약물 접합체 또는 ADC)에 추가로 접합될 수 있다.

[0470] 물리적 방법과의 조합: 일부 실시양태에서, 보충제는 1개 이상의 비-약리학적 양식 (예를 들어, 국부 방사선 요법 또는 전신 방사선 요법 또는 수술)이다. 예로서, 본 개시내용은 방사선 단계가 IL2 뮤테인 및 1종 이상의 보충제를 포함하는 치료 요법을 사용한 치료에 선행하거나 후속하는 치료 요법을 고려한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 수술 (예를 들어 종양 절제)과 조합된 IL2 뮤테인의 사용을 추가로 고려한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 골수 이식, 말초 혈액 줄기 세포 이식 또는 다른 유형의 이식 요법과 조합된 IL2 뮤테인의 사용을 추가로 고려한다.

[0471] 면역 체크포인트 조정제와의 조합: 일부 실시양태에서, "보충제"는 대상체에서의 신생물성 질환 뿐만 아니라 신생물성 질환과 연관된 질환, 장애 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 면역 체크포인트 조정제이다. 용어 "면역 체크포인트 경로"는 면역 반응의 자극 (예를 들어 T-세포 활성의 상향조절) 또는 억제 (예를 들어 T-세포 활성의 하향조절)를 통해 면역 반응을 조정하는 면역 세포 (예를 들어 T-세포) 상에서 발현되는 제2 분자 (예를 들어 단백질, 예컨대 PDL1)에 대한, 항원 제시 세포 (APC) 상에서 발현되는 제1 분자 (예를 들어 단백질, 예컨대 PD1)의 결합에 의해 촉발되는 생물학적 반응을 지칭한다. 면역 반응을 조정하는 결합 쌍의 형성에 수반되는 분자는 통상적으로 "면역 체크포인트"로 지칭된다. 이러한 면역 체크포인트 경로에 의해 조정되는 생물학적 반응은 하류 면역 이펙터 경로, 예컨대 세포 활성화, 시토카인 생성, 세포 이동, 세포독성 인자 분비 및 항체 생성으로 이어지는 세포내 신호전달 경로에 의해 매개된다. 면역 체크포인트 경로는 통상적으로 면역 체크포인트 경로와 연관된 제2 세포 표면 분자에 대한 제1 세포 표면 발현된 분자의 결합 (예를 들어 PDL1에 대한 PD1의 결합, CD28에 대한 CTLA4의 결합 등)에 의해 촉발된다. 면역 체크포인트 경로의 활성화는 면역 반응의 자극 또는 억제로 이어질 수 있다.

[0472] 그의 활성화가 면역 반응의 억제 또는 하향조절을 유발하는 면역 체크포인트는 본원에서 "음성 면역 체크포인트 경로 조정제"로 지칭된다. 음성 면역 체크포인트 조정제의 활성화로부터 유발되는 면역 반응의 억제는 외래 항원, 예컨대 종양-연관 항원을 인식하는 숙주 면역계의 능력을 감소시킨다. 용어 음성 면역 체크포인트 경로는 PDL1에 대한 PD1의 결합, PDL2에 대한 PD1의 결합, 및 CDCD80/86에 대한 CTLA4의 결합에 의해 조정되는 생물학적 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 음성 면역 체크포인트 길항제의 예는 PD1 (CD279로도 지칭됨), TIM3 (T-세포 막 단백질 3; HAVcr2로도 공지됨), BTLA (B 및 T 림프구 감쇠자; CD272로도 공지됨), VISTA (B7-H5) 수용체, LAG3 (림프구 활성화 유전자 3; CD233으로도 공지됨) 및 CTLA4 (세포독성 T-림프구 연관 항원 4; CD152로도 공지됨)를 포함하나 이에 제한되지는 않는, T-세포 억제 수용체에 결합하는 길항제 (예를 들어 길항제 항체)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0473] 한 실시양태에서, 그의 활성화가 면역 반응의 자극을 발생시키는 면역 체크포인트 경로는 본원에서 "양성 면역 체크포인트 경로 조정제"로 지칭된다. 용어 양성 면역 체크포인트 경로 조정제는 ICOS(CD278)에 대한 ICOSL의 결합, Nkp30에 대한 B7-H6의 결합, CD96에 대한 CD155의 결합, OX40에 대한 OX40L의 결합, CD27에 대한 CD70의 결합, CD40L에 대한 CD40의 결합, 및 GITR에 대한 GITRL의 결합에 의해 조정되는 생물학적 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 양성 면역 체크포인트를 효능작용하는 분자 (면역 반응을 자극하는 결합 쌍의 성분에 대한 이러한 천연 또는 합성 리간드)는 면역 반응을 상향조절하는데 유용하다. 이러한 양성 면역 체크포인트 효능제의 예는 T-세포 활성화 수용체, 예컨대 ICOS (예컨대 JTX-2011, 자운스 테라퓨틱스(Jounce Therapeutics)), OX40 (예컨대 MEDI6383, 메드이문(Medimmune)), CD27 (예컨대 바를리루맙, 셀렉스 테라퓨틱스(Celldex Therapeutics)), CD40 (예컨대 다세투주맙 CP-870,893, 로슈(Roche), Chi Lob 7/4), HVEM, CD28, CD137 4-1BB, CD226 및 GITR (예컨대 MEDI1873, 메드이문; INCAGN1876, 아제누스(Agenus))에 결합하는 효능제 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0474] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역 체크포인트 경로 조정제"는 면역적격 포유동물을 포함한 생물계에서 면역 체크포인트 경로의 활성을 억제하거나 자극하는 분자를 지칭한다. 면역 체크포인트 경로 조정제는 면역 체크포인트 단백질 (예컨대 항원 제시 세포 (APC), 예컨대 암 세포 및/또는 면역 T 이펙터 세포의 표면 상에 발현된 면역 체크포인트 단백질)에 결합함으로써 그의 효과를 발휘할 수 있거나, 또는 면역 체크포인트 경로에서 상

류 및/또는 하류 반응에 그의 효과를 발휘할 수 있다. 예를 들어, 면역 체크포인트 경로 조절제는 PD-1 및 CTLA-4 신호전달에 수반되는 티로신 포스포타제인 SHP2의 활성을 조절할 수 있다. 용어 "면역 체크포인트 경로 조절제"는 억제성 면역 체크포인트의 기능을 적어도 부분적으로 하향-조절할 수 있는 면역 체크포인트 경로 조절제(들) (본원에서 "면역 체크포인트 경로 억제제" 또는 "면역 체크포인트 경로 길항제"로 지칭됨) 및 자극성 면역 체크포인트의 기능을 적어도 부분적으로 상향-조절할 수 있는 면역 체크포인트 경로 조절제(들) (본원에서 "면역 체크포인트 경로 이펙터" 또는 "면역 체크포인트 경로 효능제"로 지칭됨) 둘 다를 포괄한다.

[0475] 면역 체크포인트 경로에 의해 매개되는 면역 반응은 T-세포 매개 면역 반응으로 제한되지 않는다. 예를 들어, NK 세포의 KIR 수용체는 NK 세포에 의해 매개되는 종양 세포에 대한 면역 반응을 조절한다. 종양 세포는 HLA-C로 불리는 분자를 발현하며, 이는 NK 세포의 KIR 수용체를 억제하여 약화 또는 항종양 면역 반응으로 이어진다. KIR 수용체에 대한 HLA-C의 결합을 길항작용하는 작용제 예컨대 항-KIR3 mab (예를 들어 리틸루맙, BMS)의 투여는 NK 세포 억제 수용체 (KIR)에 결합하는 HLA-C의 능력을 억제하고, 이에 의해 암 세포를 검출하고 공격하는 NK 세포의 능력을 회복시킨다. 따라서, KIR 수용체에 대한 HLA-C의 결합에 의해 매개되는 면역 반응은 그의 억제가 비-T-세포 매개 면역 반응의 활성화를 일으키는 음성 면역 체크포인트 경로의 예이다.

[0476] 한 실시양태에서, 면역 체크포인트 경로 조절제는 음성 면역 체크포인트 경로 억제제/길항제이다. 또 다른 실시양태에서, IL2 뮤테인과 조합되어 사용되는 면역 체크포인트 경로 조절제는 양성 면역 체크포인트 경로 효능제이다. 또 다른 실시양태에서, IL2 뮤테인과 조합되어 사용되는 면역 체크포인트 경로 조절제는 면역 체크포인트 경로 길항제이다.

[0477] 용어 "음성 면역 체크포인트 경로 억제제"는 음성 면역 체크포인트 경로의 활성화를 방해하여 면역 반응의 상향 조절 또는 증진을 발생시키는 면역 체크포인트 경로 조절제를 지칭한다. 예시적인 음성 면역 체크포인트 경로 억제제는 프로그램화된 사멸-1 (PD1) 경로 억제제, 프로그램화된 사멸 리간드-1 (PDL1) 경로 억제제, TIM3 경로 억제제 및 항세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA4) 경로 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0478] 한 실시양태에서, 면역 체크포인트 경로 조절제는 PDL1 및/또는 PDL2에 대한 PD1의 결합을 억제하는 음성 면역 체크포인트 경로의 길항제 ("PD1 경로 억제제")이다. PD1 경로 억제제는 다양한 유리한 면역 반응, 예컨대 T-세포 소진의 역전, 시토카인 생성의 회복, 및 항원-의존성 T-세포의 확장을 자극한다. PD1 경로 억제제는 흑색종, 폐암, 신장암, 호지킨 림프종, 두경부암, 방광암 및 요로상피암을 포함한 다양한 암의 치료를 위해 USFDA로부터 승인을 받은 효과적인 다양한 암으로서 인식되었다.

[0479] 용어 PD1 경로 억제제는 PDL1 및/또는 PDL2에 대한 PD1의 결합을 방해하는 모노클로날 항체를 포함한다. 항체 PD1 경로 억제제는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. PDL1 및/또는 PDL2에 대한 PD1의 결합을 방해하는 모노클로날 항체인 상업적으로 입수가능한 PD1 경로 억제제의 예는 니볼루맙 (옵디보(Opdivo)®, BMS-936558, MDX1106, 브리스톨마이어스 스킵(BristolMyers Squibb, 뉴저지주 프린스턴)으로부터 상업적으로 입수가능함), 캄브롤리주맙 (키트루다(Keytruda)®MK-3475, 람브롤리주맙, 머크 앤드 캄파니(Merck and Company, 뉴저지주 케널워쓰)로부터 상업적으로 입수가능함), 및 아테졸리주맙 (테센트릭(Tecentriq)®, 제넨테크(Genentech)/로슈, 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)을 포함한다. 두르발루맙 (MEDI4736, 메드이문/아스트라제네카(AstraZeneca)), 피딜리주맙 (CT-011, 큐어테크(CureTech)), PDR001 (노파르티스), BMS-936559 (MDX1105, 브리스톨마이어스 스킵), 및 아벨루맙 (MSB0010718C, 머크 세로노(Merck Serono)/화이자(Pfizer)) 및 SHR-1210 (인사이트(Incyte))을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 PD1 경로 억제제 항체가 임상 개발 중에 있다. 추가의 항체 PD1 경로 억제제는 미국 특허 번호 8,217,149 (제넨테크, 인크.) (2012년 7월 10일 허여됨); 미국 특허 번호 8,168,757 (머크 샤프 앤드 돔 코포레이션(Merck Sharp and Dohme Corp.)) (2012년 5월 1일 허여됨), 미국 특허 번호 8,008,449 (메다렉스(Medarex)) (2011년 8월 30일 허여됨), 미국 특허 번호 7,943,743 (메다렉스, 인크.) (2011년 5월 17일 허여됨)에 기재되어 있다.

[0480] 용어 PD1 경로 억제제는 길항제 항체에 제한되지 않는다. PD-L2 IgG2a 융합 단백질인 AMP-224, 및 PDL2 융합 단백질인 AMP-514를 포함하는 비-항체 생물학적 PD1 경로 억제제가 또한 임상 개발 중에 있고, 암플리문(Amplimmune) 및 글락소 스미스클라인(Glaxo SmithKline)에 의해 임상 개발 중에 있다. 애타머 화합물은 또한 PD1 경로 억제제로서 유용한 것으로 문헌에 기재되어 있다 (Wang, et al. (2018) 145:125-130.).

[0481] 용어 PD1 경로 억제제는 펩티드 PD1 경로 억제제, 예컨대 Sasikumar 등의 미국 특허 번호 9,422,339 (2016년 8월 23일 허여됨) 및 Sasilkumar 등의 미국 특허 번호 8,907,053 (2014년 12월 9일 허여됨)에 기재된 것을 포함한다. CA-170 (AUPM-170, 아우리진(Aurigene)/큐리스(Curis))은 보고된 바로는 면역 체크포인트 PDL1 및 VISTA를 표적화하는 경구로 생체이용가능한 소분자이다. 문헌 [Pottayil Sasikumar, et al. Oral immune

checkpoint antagonists targeting PD-L1/VISTA or PD-L1/Tim3 for cancer therapy. [abstract]. In: Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016 Apr 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2016;76(14 Suppl): Abstract No.4861]. CA-327 (AUPM-327, 아우리진/큐리스)은 보고된 바로는 면역 체크포인트, 프로그램화된 사멸 리간드-1 (PDL1) 및 T-세포 이뮤노글로불린 및 뮤신 도메인 함유 단백질-3 (TIM3)을 억제하는 경구로 이용가능한 소분자이다.

[0482] 용어 PD1 경로 억제제는 소분자 PD1 경로 억제제를 포함한다. 본 발명의 실시예에 유용한 소분자 PD1 경로 억제제의 예는 문헌 [Sasikumar, et al., 1,2,4-oxadiazole and thiadiazole compounds as immunomodulators] (PCT/IB2016/051266, 2016년 3월 7일에 출원되고 2016년 9월 15일에 WO 2016142833A1로서 공개됨) 및 문헌 [Sasikumar, et al. 3-substituted-1,2,4-oxadiazole and thiadiazole] (PCT/IB2016/051343, 2016년 3월 9일에 출원되고 WO 2016142886A2로서 공개됨), BMS-1166 및 문헌 [Chupak LS and Zheng X. Compounds useful as immunomodulators. Bristol-Myers Squibb Co. (2015) WO 2015/034820 A1, EP3041822 B1 (2017년 8월 9일 허여됨); WO 2015034820A1; 및 문헌 [Chupak, et al. Compounds useful as immunomodulators. Bristol-Myers Squibb Co. (2015) WO 2015/160641 A2. WO 2015/160641 A2, Chupak, et al. Compounds useful as immunomodulators. Bristol-Myers Squibb Co. Sharpe, et al. Modulators of immunoinhibitory receptor PD-1, and methods of use thereof, WO 2011082400 A2 (2011년 7월 7일 공개됨); 미국 특허 번호 7,488,802 (와이어쓰(Wyeth)) (2009년 2월 10일 허여됨)]을 포함한 관련 기술분야에 기재되어 있다.

[0483] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인 및 1종 이상의 PD1 면역 체크포인트 조정제의 조합은 PD1 경로 억제제가 질환의 치료를 위한 FDA 승인을 통해 또는 흑색종, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 두경부암, 신세포암, 방광암, 난소암, 자궁 자궁내막암, 자궁 자궁경부암, 자궁 육종, 위암, 식도암, DNA 미스매치 복구 결핍 결장암, DNA 미스매치 복구 결핍 자궁내막암, 간세포성 암종, 유방암, 메르켈 세포 암종, 갑상선암, 호지킨 림프종, 여포성 림프종, 미만성 대 B-세포 림프종, 군상 식육종, 말초 T-세포 림프종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임상 시험에서 임상 효능의 입증을 통해 인간에서 임상 효과가 입증된 신생물성 상태의 치료에 유용하다. 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인 및 PD1 면역 체크포인트 조정제의 조합은 PDL1의 높은 수준의 발현을 특징으로 하는 종양의 치료에 유용하며, 여기서 종양은 종양 돌연변이 부담을 갖고, 여기서 종양에 높은 수준의 CD8+ T-세포, IFN γ 와 연관된 면역 활성화 서명 및 전이성 질환, 특히 간 전이의 결여가 존재한다.

[0484] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 CD28에 대한 CTLA4의 결합을 억제하는 음성 면역 체크포인트 경로의 길항제 ("CTLA4 경로 억제제")와 조합되어 투여된다. CTLA4 경로 억제제의 예는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,682,736 (아브게닉스(Abgenix)) (2004년 1월 27일 허여됨); 미국 특허 번호 6,984,720 (메다렉스, 인크.) (2007년 5월 29일 허여됨); 미국 특허 번호 7,605,238 (메다렉스, 인크.) (2009년 10월 20일 허여됨) 참조).

[0485] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 HVEM에 대한 BTLA의 결합을 억제하는 음성 면역 체크포인트 경로의 길항제 ("BTLA 경로 억제제")와 조합되어 투여된다. 항-BTLA 항체 및 길항성 HVEM-Ig를 사용하여 BTLA/HVEM 경로를 표적화하는 다수의 접근법이 평가되었고, 상기 접근법은 이식, 감염, 종양, 및 자가면역 질환을 포함한 다수의 질환, 장애 및 상태에서 유망한 유용성을 시사하였다 (예를 들어, 문헌 [Wu, et al., (2012) Int. J. Biol. Sci. 8:1420-30] 참조).

[0486] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 TIM3-활성화 리간드에 결합하는 TIM3의 능력을 억제하는 음성 면역 체크포인트 경로의 길항제 ("TIM3 경로 억제제")와 조합되어 투여된다. TIM3 경로 억제제의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 대표적인 비제한적 예는 PCT 국제 특허 공개 번호 WO 2016/144803 (2016년 9월 15일 공개됨); Lifke 등의 미국 특허 공개 번호 US 20160257749 A1 (에프. 호프만-라로슈(F. Hoffman-LaRoche)) (2016년 9월 8일 공개됨); Karunsky의 미국 특허 번호 9,631,026 (2017년 4월 27일 허여됨); Karunsky, Sabatos-Peyton 등의 미국 특허 번호 8,841,418 (2014년 9월 23일 허여됨); 미국 특허 번호 9,605,070; Takayanagi 등의 미국 특허 번호 8552156 (2013년 10월 8일 허여됨)에 기재되어 있다.

[0487] 일부 실시양태에서, LAG3 및 PD1의 차단이 만성 감염 환경에서 종양-특이적 CD8+ T-세포와 바이러스-특이적 CD8+ T-세포 간의 무반응을 상승작용적으로 역전시키는 것으로 시사되었기 때문에, IL2 뮤테인은 LAG3 및 PD1 둘 다의 억제제와 조합하여 투여된다. IMP321 (이뮤팩트(ImmuFact))은 흑색종, 유방암 및 신세포 암종에서 평가되고 있다. 일반적으로 문헌 [Woo et al., (2012) Cancer Res 72:917-27; Goldberg et al., (2011) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 344:269-78; Pardoll (2012) Nature Rev. Cancer 12:252-64; Grosso et al., (2007) J. Clin. Invest. 117:3383-392]을 참조한다.

- [0488] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 A2aR 억제제와 조합되어 투여된다. A2aR은 CD4+ T-세포를 TReg 세포로 발생하도록 자극함으로써 T-세포 반응을 억제한다. A2aR은 종양 면역에서 특히 중요한데, 이는 세포 전환으로부터의 종양에서의 세포 사멸 속도가 높고, 사멸 중인 세포가 A2aR에 대한 리간드인 아데노신을 방출하기 때문이다. 또한, A2aR의 결실은 감염에 대한 증진된 및 때때로 병리학적 염증 반응과 연관되었다. A2aR의 억제는 아데노신 결합을 차단하는 항체와 같은 분자의 투여에 의해 또는 아데노신 유사체에 의해 수행될 수 있다. 이러한 작용제는 장애, 예컨대 암 및 파킨슨병의 치료에 사용하기 위해 IL2 뮤테인과 조합되어 사용될 수 있다.
- [0489] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 IDO (인돌아민 2,3-디옥시게나제)의 억제제와 조합되어 투여된다. IDO는 트립토판의 산화를 통해 매개되는 면역 반응을 하향-조절하여 T-세포 활성화의 억제 및 T-세포 아포토시스의 유도를 유발하여, 종양-특이적 세포독성 T 림프구가 기능적으로 불활성화되거나 또는 더 이상 대상체의 암 세포를 공격할 수 없는 환경을 생성한다. 인독시모드 (뉴링크 제네틱스(NewLink Genetics))는 전이성 유방암에서 평가되는 IDO 억제제이다.
- [0490] 이전에 기재된 바와 같이, 본 발명은 2, 3종 또는 그 초과 면역 체크포인트 경로를 조정하는 면역 체크포인트 경로 조정제를 포함한 적어도 1종의 면역 체크포인트 경로를 조정하는 작용제(들)와 조합된 IL2 뮤테인의 투여에 의한, 포유동물 대상체에서 신생물성 질환 (예를 들어 암)의 치료 방법을 제공한다.
- [0491] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 다중 면역 체크포인트 경로를 조정할 수 있는 면역 체크포인트 조정제와 조합되어 투여된다. 다중 면역 체크포인트 경로는 다중 면역 체크포인트 경로의 조정제로서 작용할 수 있는 다관능성 분자의 투여에 의해 조정될 수 있다. 이러한 다중 면역 체크포인트 경로 조정제의 예는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 조정제 또는 다중 면역 체크포인트 경로로서 작용할 수 있는 다중-특이적 항체의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2013/0156774는 PD1 및 TIM3을 공동-발현하는 세포를 표적화하기 위한 이중특이적 및 다중특이적 작용제 (예를 들어, 항체), 및 그의 사용 방법을 기재한다. 더욱이, BTLA 및 PD1의 이중 차단은 항종양 면역을 증진시키는 것으로 밝혀졌다 (Pardoll, (April 2012) Nature Rev. Cancer 12:252-64). 본 개시내용은 PD1 및 LAG3 둘 다에 결합하는 이중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 다중 면역 체크포인트 경로를 표적화하는 면역 체크포인트 경로 조정제와 조합된 hIL2 뮤테인의 사용을 고려한다. 따라서, 항종양 면역은 다중 수준으로 증진될 수 있고, 조합 전략은 다양한 기계론적 고려사항을 고려하여 생성될 수 있다.
- [0492] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 2, 3, 4종 또는 그 초과 면역 체크포인트 경로 조정제와 조합되어 투여될 수 있다. 이러한 조합은 면역 체크포인트 경로가 다수의 별개의 치료 각도로부터 기저 질환, 장애 또는 상태를 공격할 기회를 제공하는 별개의 작용 메커니즘을 가질 수 있다는 점에서 유리할 수 있다.
- [0493] 면역 체크포인트 경로 억제제에 대한 치료 반응은 종종 전통적인 화학요법, 예컨대 티로신 키나제 억제제에 대한 반응보다 훨씬 더 늦게 그 자체를 나타낸다는 것을 주목해야 한다. 일부 경우에, 면역 체크포인트 경로 억제제를 사용한 치료 개시 후 치료 반응의 객관적 징후가 관찰되기 전에 6개월 이상이 걸릴 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인과 조합된 면역 체크포인트 경로 억제제(들)를 사용한 치료가 통상적인 화학요법을 사용한 것보다 빈번하게 더 긴 진행까지의 시간에 걸쳐 이루어져야 하는지 여부에 관한 결정이 이루어진다. 목적하는 반응은 상황 하에 유리한 것으로 간주되는 임의의 결과일 수 있다. 일부 실시양태에서, 목적하는 반응은 질환, 장애 또는 상태의 진행의 예방인 반면, 다른 실시양태에서 목적하는 반응은 질환, 장애 또는 상태의 1개 이상의 특징의 퇴행 또는 안정화 (예를 들어, 종양 크기의 감소)이다. 또 다른 실시양태에서, 목적하는 반응은 조합물의 1종 이상의 작용제와 연관된 1종 이상의 유해 효과의 감소 또는 제거이다.
- [0494] 보충제로서의 세포 요법제 및 방법:
- [0495] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 신생물성, 자가면역 또는 염증성 질환의 치료를 위한 세포 요법 형태의 보충제와 IL2 뮤테인의 투여의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 방법과 조합하여 사용할 수 있는 세포 요법의 예는 1개 이상의 활성화된 CAR-T 세포를 포함하는 조작된 T 세포 생성물, 조작된 TCR 세포, 종양 침윤 림프구 (TIL), 조작된 Treg 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 조작된 T-세포 생성물은 통상적으로 대상체에게 투여되기 전에 생체외에서 활성화되어 상향조절된 수준의 CD25를 제공하기 때문에, 이러한 활성화된 조작된 T 세포 유형을 포함하는 세포 생성물은 본원에 기재된 바와 같은 CD25 편향된 IL2 뮤테인의 투여를 통해 추가로 지지될 수 있다.
- [0496] CAR-T 세포
- [0497] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, 보충제는 "키메라 항원 수용체 T-세포"이고, "CAR-T 세포"는 키메라

항원 수용체를 발현하도록 재조합적으로 변형된 T-세포를 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항원 수용체" 및 "CAR"은 서열에서 아미노에서 카복시 말단으로 배열된 다중 기능적 도메인: (a) 항원 결합 도메인 (ABD), (b) 막횡단 도메인 (TD); 및 (c) 1개 이상의 세포질 신호전달 도메인 (CSD) (여기서 상기 도메인들은 임의로 1개 이상의 스페이서 도메인에 의해 연결될 수 있음)을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용된다. CAR은 또한 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 세포의 세포 표면 상의 CAR의 번역후 프로세싱 및 제시 동안 통상적으로 제거되는 신호 펩티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 실시예에 유용한 CAR은 관련 기술분야에 널리 공지된 원리에 따라 제조된다. 예를 들어, Eshhaar 등의 미국 특허 번호 7,741,465 B1 (2010년 6월 22일 허여됨); 문헌 [Sadellain, et al. (2013) Cancer Discovery 3(4):388-398; Jensen and Riddell (2015) Current Opinions in Immunology 33:9-15; Gross, et al. (1989) PNAS(USA) 86(24):10024-10028; Curran, et al. (2012) J Gene Med 14(6):405-15]을 참조한다. 본 발명의 직교 수용체가 혼입되도록 변형될 수 있는 상업적으로 입수가능한 CAR-T 세포 생성물의 예는 악성림프종 치료제 (길리아드 파마슈티칼스(Gilead Pharmaceuticals)로부터 상업적으로 입수가능한 예스카르타(Yescarta)®로 시판됨) 및 티사젠렐루셀 (노파르티스로부터 상업적으로 입수가능한 킴리아(Kymriah)®로 시판됨)를 포함한다.

[0498] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 항원 결합 도메인 (ABD)은 표적 세포의 표면 상에 발현된 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 지칭한다. ABD는 표적 세포의 표면 상에 발현된 1개 이상의 세포 표면 분자 (예를 들어 종양 항원)에 특이적으로 결합하는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, ABD는 GD2, BCMA, CD19, CD33, CD38, CD70, GD2, IL3R α 2, CD19, 메소텔린, Her2, EpCam, Muc1, ROR1, CD133, CEA, EGRFRVIII, PSCA, GPC3, Pan-ErbB 및 FAP로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 세포와 연관된 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, ABD는 종양 세포 (즉, 적어도 하나의 종양 항원)와 연관된 적어도 하나의 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 항체 (상기 정의된 바와 같이, 1개 이상의 VHH, scFv 등과 같은 분자를 포함함)이며, 여기서 종양 세포와 연관된 세포 표면 분자는 GD2, BCMA, CD19, CD33, CD38, CD70, GD2, IL3R α 2, CD19, 메소텔린, Her2, EpCam, Muc1, ROR1, CD133, CEA, EGRFRVIII, PSCA, GPC3, Pan-ErbB 및 FAP로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 개시내용의 방법의 실시에서 보충제로서 유용한 CAR-T 세포의 예는 항-GD2 항체, 항-BCMA 항체, 항-CD19 항체, 항-CD33 항체, 항-CD38 항체, 항-CD70 항체, 항-GD2 항체 및 IL3R α 2 항체, 항-CD19 항체, 항-메소텔린 항체, 항-Her2 항체, 항-EpCam 항체, 항-Muc1 항체, 항-ROR1 항체, 항-CD133 항체, 항-CEA 항체, 항-PSMA 항체, 항-EGRFRVIII 항체, 항-PSCA 항체, 항-GPC3 항체, 항-Pan-ErbB 항체, 항-FAP 항체 중 적어도 하나를 추가로 포함하는 ABD를 포함하는 CAR을 발현하는 CAR-T 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0499] 본 개시내용의 방법의 실시예에 유용한 CAR-T 세포의 CAR은 ABD (또는 링커, 사용되는 경우, 하기 링커의 논의 참조)를 CAR의 세포내 세포질 도메인에 연결하는 막횡단 도메인을 추가로 포함한다. 막횡단 도메인은 진핵 세포 막에서 열역학적으로 안정한 임의의 폴리펩티드 서열로 구성된다. 막횡단 스페닝 도메인은 천연 발생 막 스페닝 단백질의 막횡단 도메인으로부터 유래될 수 있거나 또는 합성될 수 있다. 합성 막횡단 도메인을 설계하는데 있어서, 알파-나선 구조를 선호하는 아미노산이 바람직하다. CAR의 구조에 유용한 막횡단 도메인은 알파-나선 2차 구조를 갖는 형성을 선호하는 대략 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 22, 23 또는 24 개의 아미노산으로 구성된다. 알파-나선 입체형태를 선호하는 아미노산은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Pace, et al. (1998) Biophysical Journal 75: 422-427]을 참조한다. 알파 나선 입체형태에서 특히 유리한 아미노산은 메티오닌, 알라닌, 류신, 글루타메이트 및 리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 막횡단 도메인은 유형 I 막 관통 단백질, 예컨대 CD3 ζ , CD4, CD8, CD28 등으로부터의 막횡단 도메인으로부터 유래될 수 있다.

[0500] CAR 폴리펩티드의 세포질 도메인은 1개 이상의 세포내 신호 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포내 신호 도메인은 T-세포 수용체 (TCR) 및 항원 수용체 결합 후 신호 전달을 개시하는 보조-수용체의 세포질 서열 및 그의 기능적 유도체 및 하위-단편을 포함한다. 세포질 신호전달 도메인, 예컨대 T 세포 수용체 제타-쇄로부터 유래된 것은 키메라 수용체와 표적 항원의 결합 후 T 림프구 증식 및 이펙터 기능을 위한 자극 신호를 생성하기 위해 CAR의 일부로서 사용된다. 세포질 신호전달 도메인의 예는 CD27의 세포질 도메인, CD28의 세포질 도메인 S, CD137의 세포질 도메인 (4-1BB 및 TNFRSF9로도 지칭됨), CD278의 세포질 도메인 (ICOS로도 지칭됨), PI3 키나제의 p110 α , β 또는 δ 촉매 서브유닛, 인간 CD3 ζ -쇄, CD134의 세포질 도메인 (OX40 및 TNFRSF4로도 지칭됨), Fc ϵ R1 γ 및 β 쇄, MB1 (Ig α)쇄, B29 (Ig β)쇄 등), CD3 폴리펩티드 (δ , Δ 및 ϵ), syk 패밀리의 티로신 키나제 (Syk, ZAP 70 등), src 패밀리의 티로신 키나제 (Lck, Fyn, Lyn 등) 및 T-세포 형질도입에 수반되

는 다른 분자, 예컨대 CD2, CD5 및 CD28을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0501]

일부 실시양태에서, CAR은 또한 공동-자극 도메인을 제공할 수 있다. 용어 "공동-자극 도메인"은 1차 특이적 자극이 전파되는 2차 비-특이적 활성화 메커니즘을 제공하는 CAR의 자극 도메인, 전형적으로 엔도도메인을 지칭한다. 공동-자극 도메인은 기억 세포의 증식, 생존 또는 발생을 증진시키는 CAR의 부분을 지칭한다. 공동-자극의 예는 T 세포 수용체를 통한 항원 특이적 신호전달 후의 항원 비특이적 T 세포 공동-자극 및 B 세포 수용체를 통한 신호전달 후의 항원 비특이적 B 세포 공동-자극을 포함한다. 공동-자극, 예를 들어 T 세포 공동-자극, 및 수반되는 인자는 문헌 [Chen & Flies (2013) Nat Rev Immunol 13(4):227-42]에 기재되어 있다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, CSD는 TNFR 슈퍼패밀리의 구성원, CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 또는 그의 조합 중 1종 이상을 포함한다.

[0502]

본 개시내용의 방법의 실시예에 유용한 CAR은 CAR의 도메인, 특히 ABD와 CAR의 막횡단 스페닝 도메인 사이의 연결을 연결하는 1개 이상의 폴리펩티드 스페이서를 임의로 포함할 수 있다. CAR 구조의 필수 요소는 아니지만, 스페이서 도메인의 포함은 일반적으로 ARD에 의한 항원 인식을 용이하게 하는데 바람직한 것으로 간주된다. 본원에 기재된 CAR-T 세포 기술과 함께 사용된 용어 "링커", "링커 도메인" 및 "링커 영역"은 약 1 내지 100개 아미노산 길이의 폴리펩티드를 지칭한다. 링커는 전형적으로 폴리펩티드의 가요성 (예를 들어 글리신 및 세린)을 허용하는 아미노산 잔기로 구성되어, CAR의 인접한 도메인이 서로에 대해 더 큰 이동의 자유가 제공되도록 한다. 스페이서가 그의 기능을 달성하기 위해 필요한 아미노산의 특별히 규정된 길이 또는 서열은 존재하지 않지만, 스페이서의 전형적인 특성은 표적화 항원 인식을 용이하게 하기 위해 ABD의 이동의 자유를 가능하게 하는 가요성이다. 유사하게, CAR 기능을 유지하면서 스페이서 길이의 실질적인 유연성이 존재하는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Jensen and Riddell (2014) Immunol. Review 257(1) 127-144]. 본 발명의 실시예에 유용한 CAR의 구축에서 스페이서로서 유용한 서열은 IgG1의 힌지 영역, 이뮤노글로불린1CH2-CH3 영역, IgG4 힌지-CH2-CH3, IgG4 힌지-CH3, 및 IgG4 힌지를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 힌지 및 막횡단 도메인은 동일한 분자, 예컨대 CD8-알파의 힌지 및 막횡단 도메인으로부터 유래될 수 있다. 문헌 [Imai, et al. (2004) Leukemia 18(4):676-684].

[0503]

CAR은 종종 제1, 제2, 제3 또는 제4 세대로 지칭된다. 용어 제1 세대 CAR은 세포질 도메인이 항원 결합으로부터의 신호를 단일 신호전달 도메인, 예를 들어 IgE Fc ϵ R1 γ 또는 CD3 ζ 쇄에 대한 고친화도 수용체로부터 유래된 신호전달 도메인만을 통해 전달하는 CAR을 지칭한다. 도메인은 항원-의존성 T-세포 활성화를 위한 1 또는 3개의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(들) [ITAM(들)]를 함유한다. ITAM-기반 활성화 신호는 T-세포에 표적 종양 세포를 용해시키고 항원 결합에 반응하여 시토카인을 분비하는 능력을 부여한다. 제2 세대 CAR은 CD3 ζ 신호에 추가로 공동-자극 신호를 포함한다. 공동-자극 신호의 동시 전달은 CAR-형질도입된 T-세포에 의해 유도된 시토카인 분비 및 항종양 활성을 증진시킨다. 공동-자극 도메인은 통상적으로 CD3 ζ 도메인에 대해 막 근위이다. 제3 세대 CAR은 예를 들어 CD28, CD3 ζ , OX40 또는 4-1BB 신호전달 영역을 포함하는 3부분 신호전달 도메인을 포함한다. 제4 세대, 또는 "강화 car"에서, CAR T-세포는 면역 활성화, 예컨대 IL-12, IL-18, IL-7, 및/또는 IL-10; 4-1BB 리간드, CD-40 리간드의 발현을 증진시키기 위해 분자 및/또는 수용체를 발현 또는 차단하도록 추가로 변형된다. 본 발명의 CAR 내로 혼입될 수 있는 세포내 신호전달 도메인의 예는 (아미노에서 카르복시로): CD3 ζ ; CD28 - 41BB - CD3 ζ ; CD28 - OX40 - CD3 ζ ; CD28 - 41BB - CD3 ζ ; 41BB - CD-28 - CD3 ζ 및 41BB - CD3 ζ 를 포함한다.

[0504]

용어 CAR은 스플릿 CAR, 온-스위치 CAR, 이중특이적 또는 탠덤 CAR, 억제 CAR (iCAR) 및 유도된 만능 줄기 (iPS) CAR-T 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 CAR 변이체를 포함한다. 용어 "스플릿 CAR"은 CAR의 세포 외 부분, ABD 및 세포질 신호전달 도메인이 2개의 별개의 분자 상에 존재하는 CAR을 지칭한다. CAR 변이체는 또한, 예를 들어 스플릿 CAR을 포함하는 조건부로 활성화가능한 CAR인 온-스위치 CAR을 포함하며, 여기서 스플릿 CAR의 2개 부분의 조건부 이중-이량체화는 약리학적으로 제어된다. CAR 분자 및 그의 유도체 (즉, CAR 변이체)는, 예를 들어 PCT 출원 번호 US2014/016527, US1996/017060, US2013/063083; 문헌 [Fedorov et al. Sci Transl Med (2013) ;5(215):215ra172; Glienke et al. Front Pharmacol (2015) 6:21; Kakarla & Gottschalk 52 Cancer J (2014) 20(2):151-5; Riddell et al. Cancer J (2014) 20(2):141-4; Pegram et al. Cancer J (2014) 20(2):127-33; Cheadle et al. Immunol Rev (2014) 257(1):91-106; Barrett et al. Annu Rev Med (2014) 65:333-47; Sadelain et al. Cancer Discov (2013) 3(4):388-98; Cartellieri et al., J Biomed Biotechnol (2010) 956304]에 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 용어 "이중특이적 또는 탠덤 CAR"은 1차 CAR의 활성을 증폭 또는 억제할 수 있는 2차 CAR 결합 도메인을 포함하는

CAR을 지칭한다. 용어 "억제성 키메라 항원 수용체" 또는 "iCAR"은 2차 CAR 결합 도메인의 억제성 신호전달 도메인이 장착된 제2 억제성 수용체의 결속을 통해 활성 CAR의 활성화를 정지시키는 이중 항원 표적화를 사용하여 1차 CAR 활성화를 억제하는 CAR을 지칭하도록 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 억제 CAR (iCAR)은 억제 수용체 신호전달 모듈 활성화를 통해 CAR-T 세포 활성을 조절하도록 설계된다. 이러한 접근법은 2개의 CAR의 활성을 조합하며, 그 중 하나는 활성화 수용체에 의해 활성화된 CAR-T 세포의 반응을 제한하는 우성 음성 신호를 생성한다. iCAR은 정상 조직에 의해서만 발현되는 특이적 항원에 결합할 때 반작용 활성화제 CAR의 반응을 스위치 오프할 수 있다. 이러한 방식으로, iCAR-T 세포는 암 세포를 건강한 것과 구별할 수 있고, 형질도입된 T 세포의 기능성을 항원-선택적 방식으로 가역적으로 차단할 수 있다. iCAR 내의 CTLA-4 또는 PD-1 세포내 도메인은 T 림프구 상에서 억제 신호를 촉발하여, 보다 적은 시토카인 생성, 보다 덜 효율적인 표적 세포 용해, 및 변경된 림프구 운동성을 유발한다. 용어 "탠덤 CAR" 또는 "TanCAR"은 2개의 상이한 종양 연관 항원의 독립적인 결속에 반응하여 자극 또는 공동자극 신호를 전달하도록 설계된 2개의 키메라 수용체의 결속을 통해 T 세포의 이중특이적 활성화를 매개하는 CAR을 지칭한다.

[0505] 전형적으로, 키메라 항원 수용체 T-세포 (CAR-T 세포)는 상기 교시에 따라 실질적으로 CAR을 코딩하는 발현 벡터로의 형질도입에 의해 재조합적으로 변형된 T-세포이다.

[0506] 일부 실시양태에서, 조작된 T 세포는 치료되는 개체에 대해 동종이다. 문헌 [Graham et al. (2018) Cell 7(10) E155]. 일부 실시양태에서, 동종 조작된 T 세포는 완전히 HLA 매칭된다. 그러나, 모든 환자가 완전히 매칭되는 공여자를 갖는 것은 아니며, HLA 유형과 독립적인 모든 환자에 적합한 세포 생성물이 대안을 제공한다.

[0507] 세포 생성물이 대상체 자신의 T-세포로 이루어질 수 있기 때문에, 대상체에게 투여될 세포의 집단은 반드시 가변적이다. 결과적으로 최적 농도를 확인하는 것, 추가적으로, CAR-T 세포 작용제가 가변적이기 때문에, 이러한 작용제에 대한 반응은 달라질 수 있고, 따라서 CAR-T 세포 치료의 투여 전에 약리학적 면역억제 또는 B 세포 고갈의 과정으로 관리되는 요법 관련 독성의 지속적인 모니터링 및 관리를 수반한다. 대체로, 적어도 1×10^6 개 세포/kg, 적어도 1×10^7 개 세포/kg, 적어도 1×10^8 개 세포/kg, 적어도 1×10^9 개 세포/kg, 적어도 1×10^{10} 개 세포/kg, 또는 그 초과가 투여될 것이고, 통상적으로 수집 동안 얻어지는 T 세포의 수에 의해 제한된다. 조작된 세포는 임의의 편리한 투여 경로에 의해, 정상적으로는 혈관내로 임의의 생리학상 허용되는 배지 중에서 대상체에게 주입될 수 있지만, 세포가 성장에 적절한 부위를 발견할 수 있는 다른 경로에 의해 도입될 수도 있다.

[0508] 본 발명의 실시예에 사용되는 T 세포가 동종 T 세포인 경우에, 이러한 세포는 이식편 대 숙주 질환을 감소시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조작된 세포는 유전자 편집 기술에 의해 달성된 TCR $\alpha\beta$ 수용체 녹아웃될 수 있다. TCR $\alpha\beta$ 는 이중이량체이고, 알파 및 베타쇄 둘 다는 그것이 발현되기 위해 존재할 필요가 있다. 단일 유전자는 알파쇄 (TRAC)를 코딩하는 반면, 베타쇄를 코딩하는 2개의 유전자가 존재하며, 따라서 TRAC 유전자좌 KO는 이러한 목적을 위해 결실되었다. 이러한 결실을 달성하기 위해 다수의 상이한 접근법, 예를 들어 CRISPR/Cas9; 메가뉴클레아제; 조작된 I-CreI 귀소 엔도뉴클레아제 등이 사용되어 왔다. 예를 들어, TRAC 코딩 서열이 CAR 코딩 서열에 의해 대체된 문헌 [Eyquem et al. (2017) Nature 543:113-117] 및 CAR을 TRAC 유전자좌 내로 직접 혼입시키지 않으면서 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR)/Cas9에 의해 CAR 발현을 TRAC 파괴와 연결한 [Georgiadis et al. (2018) Mol. Ther. 26:1215-1227]을 참조한다. GVHD를 방지하기 위한 대안적 전략은, 예를 들어 말단절단된 형태의 CD3 ζ 를 TCR 억제 분자로서 사용하여 T 세포를 TCR $\alpha\beta$ 신호전달의 억제제를 발현하도록 변형시킨다.

[0509] 보충제로서의 케모카인 및 시토카인 작용제:

[0510] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 IL-7, IL-12, IL-15 및 IL-18 (이들 각각의 유사체 및 변이체 포함)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 시토카인과 조합되어 투여된다.

[0511] 활성화-유도된 세포 사멸 억제제

[0512] 일부 실시양태에서, IL2 뮤테인은 활성화-유도된 세포 사멸 (AICD)을 억제하는 1종 이상의 보충제와 조합되어 투여된다. AICD는 Fas 수용체 (예를 들어, Fas, CD95)와 Fas 리간드 (예를 들어, FasL, CD95 리간드)의 상호작용으로 인한 프로그램화된 세포 사멸의 형태이며, 말초 면역 관용을 유지하는데 도움이 된다. AICD 이펙터 세포는 FasL을 발현하고, 아포토시스는 Fas 수용체를 발현하는 세포에서 유도된다. 활성화-유도된 세포 사멸은 그의 T-세포 수용체의 반복된 자극으로부터 생성된 활성화된 T 림프구의 음성 조절제이다. 본원에 기재된 IL2 뮤테인과 조합되어 사용될 수 있는 AICD를 억제하는 작용제의 예는 시클로스포린 A (Shih, et al., (1989)

Nature 339:625-626), IL-16 및 유사체 (rhIL-16 포함, 문헌 [Idziorek, et al., (1998) Clinical and Experimental Immunology 112:84-91]), TGFb1 (Genesteir, et al., (1999) J Exp Med 189(2): 231-239), 및 비타민 E (Li-Weber, et al., (2002) J Clin Investigation 110(5):681-690)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0513] 물리적 방법 일부 실시양태에서, 보충제는 방사선요법, 동결요법, 고열 요법, 수술, 레이저 절제 및 양성자 요법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 항신생물성 물리적 방법이다.

[0514] 투여량: 이러한 대상 IL2 뮤테인 또는 핵산 화합물의 투여량, 독성 및 치료 효능은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터는 인간에서 사용하기 위한 투여량의 범위를 공식화하는데 이용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 최소 허용되는 독성을 갖는 ED50을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 사용되는 투여 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용되는 임의의 화합물의 경우, 치료 유효 용량은 초기에 세포 배양 검정으로부터 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 결정되는 바와 같이 IC50을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장에서의 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0515] 본원에서 정의되는 바와 같이, 대상 IL2 뮤테인의 치료 유효량 (즉, 유효 투여량)은 선택된 폴리펩티드에 따라 좌우된다. 예를 들어, 대략 0.001 내지 0.1 mg/kg 환자 체중의 범위에서 단일 용량이 투여될 수 있고; 일부 실시양태에서, 약 0.005, 0.01, 0.05 mg/kg이 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 600,000 IU/kg이 투여된다 (IU는 림프구 증식 생물검정에 의해 결정될 수 있고, 인터류킨-2 (인간)에 대한 세계 보건 기구(World Health Organization) 제1 국제 표준에 의해 확립된 국제 단위 (IU)로 표현됨).

[0516] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 IL2 뮤테인의 제약상 허용되는 형태는 Klatzman 등의 미국 특허 번호 9,669,071 및 10,293,028B2 (전체 교시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 "저용량" 치료 프로토콜에 따라 대상체에게 투여된다. 추가의 저용량 프로토콜은 문헌 [Smith, K.A. (1993) Blood 81(6):1414-1423, He, et al. (2016) Nature Medicine 22(9): 991-993]에 기재되어 있다.

[0517] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 본 개시내용의 hIL2 뮤테인을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 신생물성 질환, 장애 또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공하고, 여기서 그의 혈청 농도는 상기 IL2 뮤테인과 관련하여 CD3-활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 촉진하기에 충분한 IL2 뮤테인의 유효 농도 이상 (예를 들어, EC_{10}^{PRO} 이상, 대안적으로 EC_{20}^{PRO} 이상, 대안적으로 EC_{30}^{PRO} 이상, 대안적으로 EC_{40}^{PRO} 이상, EC_{50}^{PRO} 이상, 대안적으로 EC_{60}^{PRO} 이상)의 혈청 농도에서, 그러나 상기 IL2 뮤테인과 관련하여 T-세포의 활성화를 유도하기에 충분한 상기 IL2 뮤테인의 혈청 농도에서의 유효 농도 이하 (예를 들어, EC_{100}^{PRO} 이하, 대안적으로 EC_{90}^{PRO} 이하, 대안적으로 EC_{80}^{PRO} 이하, 대안적으로 EC_{70}^{PRO} 이하, EC_{60}^{PRO} 이하, 대안적으로 EC_{50}^{PRO} 이하)의 혈청 농도에서, 대부분 (즉, 기간의 약 50% 초과, 대안적으로 약 60% 초과, 대안적으로 약 70% 초과, 대안적으로 약 80% 초과, 대안적으로 약 90% 초과)의 기간 (예를 들어, 적어도 24시간, 대안적으로 적어도 48시간, 대안적으로 적어도 72시간, 대안적으로 적어도 96시간, 대안적으로 적어도 120시간, 대안적으로 적어도 144시간, 대안적으로 적어도 7일, 대안적으로 적어도 10일, 대안적으로 적어도 12일, 대안적으로 적어도 14일, 대안적으로 적어도 28일, 대안적으로 적어도 45일, 대안적으로 적어도 60일, 또는 그 초과) 동안 유지된다.

[0518] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 hIL2 뮤테인을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 신생물성 질환, 장애 또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공하고, 여기서 치료 유효량의 hIL2 뮤테인은 상기 IL2 뮤테인과 관련하여 인간 IL2 뮤테인의 혈청 농도를 CD3-활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 촉진하기에 충분한 IL2 뮤테인의 유효 농도 이상 ($>EC_{10}^{PRO}$)에서, 및 T-세포의 활성화를 유도하기에 충분한 상기 IL2 뮤테인의 혈청 농도 이하 (즉, EC_{90}^{PRO} 미만)에서, 적어도 24시간, 대안적으로 적어도 96시간, 대안적으로 적어도 120시간, 대안적으로 적어도 144시간, 대안적으로 적어도 7일, 대안적으로 적어도 10일, 대안적으로 적어도 12일, 대안적으로 적어도 14일, 대안적으로 적어도 28일, 대안적으로 적어도 45일, 대안적으로

적어도 60일, 또는 그 초과 기간 중 약 50% 초과, 대안적으로 약 60% 초과, 대안적으로 약 70% 초과, 대안적으로 약 80% 초과, 대안적으로 약 90% 초과 동안 유지하기에 충분하다.

[0519] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 hIL2 뮤테인을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 신생물성 질환, 장애 또는 상태를 치료 및/또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공하고, 여기서 치료 유효량의 hIL2 뮤테인은 상기 IL2 뮤테인과 관련하여 인간 IL2 뮤테인의 혈청 농도를 CD3-활성화된 1차 인간 T-세포의 증식을 촉진하기에 충분한 IL2 뮤테인의 유효 농도 이상 ($>EC_{10}^{PRO}$)에서, 및 T-세포의 활성화를 유도하기에 충분한 상기 IL2 뮤테인의 혈청 농도 이하 (즉, EC_{90}^{PRO} 미만)에서, 적어도 24시간, 대안적으로 적어도 96시간, 대안적으로 적어도 120시간, 대안적으로 적어도 144시간, 대안적으로 적어도 7일, 대안적으로 적어도 10일, 대안적으로 적어도 12일, 대안적으로 적어도 14일, 대안적으로 적어도 28일, 대안적으로 적어도 45일, 대안적으로 적어도 60일, 또는 그 초과 기간 중 약 50% 초과, 대안적으로 약 60% 초과, 대안적으로 약 70% 초과, 대안적으로 약 80% 초과, 대안적으로 약 90% 초과 동안 유지하기에 충분하고, 여기서 IL2 및 hIL2 폴리펩티드는 하기 돌연변이 세트: L18R, Q22E, 및 Q126H; L18R, Q22E, 및 Q126K; L18R, Q22E 및 Q126M; L18R, Q22E Q126T; L18R; Q22E; V91K; V91R; Q126H; L18R, 및 Q126H; Q22E, 및 Q126H; L18G, Q22E 및 Q126H; L18A, Q22E 및 Q126H; L18M, Q22E 및 Q126H; L18F, Q22E 및 Q126H; L18W, Q22E 및 Q126H; L18K, Q22E 및 Q126H; L18Q, Q22E 및 Q126H; L18E, Q22E 및 Q126H; L18S, Q22E 및 Q126H; L18V, Q22E 및 Q126H; L18I, Q22E 및 Q126H; L18Y, Q22E 및 Q126H; L18H, Q22E 및 Q126H; L18N, Q22E 및 Q126H; L18D, Q22E 및 Q126H; L18T, Q22E 및 Q126H; L18R, Q22G 및 Q126H; L18R, Q22A 및 Q126H; L18R, Q22L 및 Q126H; L18R, Q22M 및 Q126H; L18R, Q22F 및 Q126H; L18R, Q22W 및 Q126H; L18R, Q22K 및 Q126H; L18R, Q22S 및 Q126H; L18R, Q22V 및 Q126H; L18R, Q22I 및 Q126H; L18R Q22Y 및 Q126H; L18R Q22H 및 Q126H; L18R Q22R 및 Q126H; L18R Q22N 및 Q126H; L18R Q22D 및 Q126H; 및 L18R Q22T 및 Q126H로 이루어지는 군으로부터 선택되는 돌연변이 세트를 포함한다.

[0520] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 본 개시내용의 IL2 뮤테인을 투여함으로써 동물의 면역계를 자극하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 숙주 면역 반응이 결핍된 질환 상태를 치료하는데 유용하다. 대상체를 치료하는데 있어서, 화합물 (즉, 활성 성분)의 치료 유효 용량이 투여된다. 치료 유효 용량은 대상체의 증상 개선 또는 생존 연장을 생성하는 활성 성분의 양을 지칭한다. 효과적인 용량은 투여되는 IL2 뮤테인의 특징, 치료할 대상체의 신체적 특징, 질환 또는 상태의 성질 등에 따라 달라질 것이다. 단일 투여는 약 50,000 IU/kg 내지 약 1,000,000 IU/kg 또는 그 초과 범위, 더욱 전형적으로 약 600,000 IU/kg일 수 있다. 이는 며칠 동안 (예를 들어, 연속 약 3-5일) 하루에 수차례 (예를 들어, 하루에 2-3회) 반복될 수 있고, 이어서 휴식 기간 (예를 들어, 약 7-14일) 이후에 1회 이상 반복될 수 있다. 따라서, 유효 용량은 단일 투여만을 또는 소정 기간에 걸친 다중 투여 (예를 들어, 각각 약 10-20일의 기간에 걸쳐 제공되는 약 600,000 IU/kg의 약 20-30회 개별 투여)를 포함할 수 있다.

[0521] 조성물은 1일 1회 이상 내지 1주 1회 이상; 예컨대 격일마다 1회 투여될 수 있다. 숙련된 기술자는 특정한 인자가 질환 또는 장애의 중증도, 이전의 치료, 대상체의 전반적인 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 대상체를 효과적으로 치료하는데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 미칠 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 대상 IL2 뮤테인의 치료 유효량에 의한 대상체의 치료는 단일 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물을 5일 동안 8시간마다 투여한 후, 2 내지 14일, 예를 들어 9일의 휴식 기간에 이어서, 추가의 5일 동안 8시간마다 투여한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물을 적어도 6일, 임의적으로 적어도 10일, 임의적으로 적어도 14일, 임의적으로 적어도 30일, 임의적으로 적어도 60일 동안 격일로 투여한다. 숙련된 기술자는 치료가 만성 상태의 치료, 및 만성 질환, 예컨대 자가면역 질환 (예를 들어 건선, IBD 등)의 증상의 재발 방지를 위해 연장될 수 있음을 인지할 것이다.

[0522] 제약 조성물은 투여를 위한 지침서와 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

[0523] 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있지만, 감염되지 않은 세포의 잠재적인 손상을 최소화하여 부작용을 감소시키기 위해, 이러한 화합물을 발병 조직의 부위로 표적화하는 전달 시스템을 설계하는데 주의를 기울여야 한다. IL2 뮤테인의 독성 및 치료 효능은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 세포 배양 검정 및 동물 연구를 이용하여 LD_{50} (집단의 50%에서 치명적인 용량) 및 ED_{50} (집단의 50%에서 치료 유효한 용량)을 결정할 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비는 치료 지수이며, 이는 LC_{50}/EC_{50} 비로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 IL2 뮤테인이 바람직하다. 이들 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터는 인간에서 사용하기에 적합한 투여량의 범위를 공식화하는데 이용될 수 있다.

이러한 돌연변이체의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 다양한 인자, 예를 들어 사용되는 투여 형태, 이용되는 투여 경로, 대상체의 상태 등에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다.

[0524] 치료 유효 용량은 EC₅₀을 결정함으로써 세포 배양 검정으로부터 초기에 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 결정되는 바와 같이 EC₅₀을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장에서의 수준은 예를 들어 HPLC에 의해 측정될 수 있다. 정확한 제제, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태에 비추어 개별 의사에 의해 선택될 수 있다.

[0525] IL2 돌연변이체로 치료할 환자의 주치의는 독성, 장기 부전 등으로 인해 투여를 어떻게 그리고 언제 종결, 중단 또는 조정하는지를 알고 있다. 반대로, 주치의는 또한 임상 반응이 적절하지 않은 경우 (독성 제외)에 더 높은 수준으로 치료를 조정하는 것을 알고 있다. 관심 장애의 관리에서 투여되는 용량의 크기는 치료할 상태의 중증도, 투여 경로 등에 따라 달라질 것이다. 상태의 중증도는 예를 들어 표준 예후 평가 방법에 의해 부분적으로 평가될 수 있다. 추가로, 용량 및 아마도 투여 빈도 또한 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 달라질 것이다.

[0526] **키트:** 본 개시내용은 또한 제약 조성물 IL2 뮤테인 및 그의 제약 조성물을 포함하는 키트를 고려한다. 키트는 일반적으로 하기 기재된 바와 같이 다양한 성분을 하우징하는 물리적 구조의 형태이고, 예를 들어 상기 기재된 방법을 실시하는데 사용될 수 있다. 키트는 사용할 준비가 되어 대상체에게 투여하기에 적합한 제약 조성물의 형태로, 또는 투여 전에 제제화, 예를 들어 해동, 재구성 또는 희석을 필요로 하는 형태로 IL2 뮤테인을 포함할 수 있다. IL2 뮤테인이 사용자에게 의해 재구성되어야 하는 형태인 경우, 키트는 또한 완충제, 제약상 허용되는 부형제 등을 포함하는 재구성 매질을 제공하는 멸균성 용기를 포함할 수 있다.

[0527] 본 개시내용의 키트는 그에 하우징된 성분을 적절하게 유지시키는데 필요한 조건을 위해 설계될 수 있다 (예를 들어, 원심분리 또는 냉동).

[0528] 키트는 그 안의 구성품에 대한 식별 정보 및 그들의 사용에 대한 지침서를 포함한 라벨 또는 패키징 삽입물을 함유할 수 있다. 키트의 각각의 구성품은 개별 용기 내에 동봉될 수 있고, 모든 다양한 용기가 단일 패키지 내에 있을 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 로트 번호 및 만료일과 같은 제조 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 패키징 삽입물은 예를 들어 구성품을 하우징하는 물리적 구조에 통합되거나, 물리적 구조 내에 별도로 함유되거나, 또는 키트의 구성품 (예를 들어, 앰플, 시린지 또는 바이알)에 부착될 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 물리적 형태 또는 컴퓨터 판독가능한 매체로 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 실제 지침서가 키트에 존재하지 않지만, 정부 규제 (예를 들어, HIPAA)를 준수하여 키트는 예를 들어 인터넷 사이트를 통해, 예컨대 암호를 제공함으로써 보안 액세스 (또는 IL2 뮤테인 또는 포함하는 키트의 용기 상의 스캔가능한 코드, 예컨대 바코드 또는 QR 코드)에 의해, 원격 소스로부터 지침서를 입수하는 수단을 제공한다.

[0529] 본 명세서 전반에 걸쳐 주어진 모든 최대 수치 제한은 모든 보다 낮은 수치 제한을, 마치 그러한 보다 낮은 수치 제한이 본원에 명시적으로 기재된 것처럼 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서 전반에 걸쳐 주어진 모든 최소 수치 제한은 모든 보다 높은 수치 제한을, 마치 그러한 보다 높은 수치 제한이 본원에 명시적으로 기재된 것처럼 포함할 것이다. 본 명세서 전반에 걸쳐 주어진 모든 수치 범위는 이러한 보다 넓은 수치 범위 내에 속하는 모든 보다 좁은 수치 범위를, 이러한 보다 좁은 수치 범위가 모두 본원에 명시적으로 기재된 것처럼 포함할 것이다.

[0530] 본원에 인용된 임의의 참고문헌이 선행 기술을 구성하는 것으로 인정되지 않는다. 참고문헌의 논의는 이의 저자가 주장하는 바를 진술하고, 본 발명자들은 인용된 문헌의 정확성 및 관련성에 이의를 제기할 권리를 갖는다. 과학 저널 논문, 특허 문헌 및 교과서를 포함한 다수의 정보 출처가 본원에 언급되어 있지만; 이 참고문헌은 이들 문헌 중 임의의 것이 관련 기술분야의 통상의 일반 지식의 일부를 형성한다는 것을 인정하는 것은 아님을 명백하게 이해할 것이다.

[0531] 본원에 주어진 일반적인 방법의 논의는 단지 예시적 목적을 위한 것이다. 다른 대안적 방법 및 대안은 본 개시내용의 검토 시 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 본 출원의 취지 및 범위 내에 포함되어야 한다.

[0532] 실시예

[0533] 하기 실시예는 본원에 제공된 본 발명의 특정한 실시양태를 기재하기 위해 제공되며, 제한하는 것으로 파악되어서는 안 된다.

[0534] **실시예 1: 인간 IL2 발현 벡터 pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2의 생성**

[0535] 실질적으로 제조자의 프로토콜에 따라, 인간 IL2 DNA 오픈 리딩 프레임 ("ORF") (진뱅크 NM_000586.3)을 합성하고 (라이프 테크놀로지스 진아트 서비스(라이프 테크놀로지스 GeneArt Service), 캘리포니아주 칼스배스), PCR을 통해 플래티넘 수퍼파이(Platinum SuperFi) II DNA 폴리머라제 키트 (카탈로그 #12361050으로서 상업적으로 입수가능함, 써모피셔(ThermoFisher))를 이용하고, 프라이머 5' TATAGTCAGCGCCACcCATGTACAGGATGCAACTCCTGTC 3' (서열식별번호: 14) (NheI 제한 부위를 포함함), 및 5' TATAGGGCCCTATCAAGTCAGTGTGAGATG 3' (서열식별번호: 15) (ApaI 제한 부위를 포함함)을 사용하여 증폭시켰다. 제조자의 프로토콜에 따라, PCR 단편을 1% 아가로스 겔 (항목 #54803, 론자(Lonza), 메인주 로클랜드) 상에서 시각화하고, 겔로부터 절제하고, 퀴아퀵(QIAquick) PCR 정제 키트 (카탈로그 #28106으로서 상업적으로 입수가능함, 퀴아젠(Qiagen), 독일)를 사용하여 정제하였다.

[0536] 정제된 PCR 단편 및 포유동물 발현 벡터 pcDNA 3.1/히그로(+) (카탈로그 #V87020으로서 상업적으로 입수가능함, 써모피셔, 캘리포니아주 칼스배드)를 NheI 및 ApaI (카탈로그 #R0111S 및 #R0114L로서 상업적으로 입수가능함, 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 메사추세츠주 입스위치) 제한 효소에 의해 소화시켰다. 실질적으로 제조자의 프로토콜에 따라, 발현 벡터를 추가로 퀵 탈인산화(Quick Dephosphorylation) 키트 (카탈로그 #M0508L로서 상업적으로 입수가능함, 뉴 잉글랜드 바이오랩스)로 처리하였다. 실질적으로 제조자의 프로토콜에 따라, 래피드 DNA 라이게이션(Rapid DNA Ligation) 키트 (카탈로그 #11635379001로서 상업적으로 입수가능함, 시그마 알드리치(시그마 Aldrich), 미주리주 세인트 루이스)를 사용하여 PCR 단편을 pcDNA 3.1/히그로(+)에 라이게이션시키고, 원 쇼트 탑텐(One Shot TOP10) 화학적으로 적절한 이. 콜라이 (카탈로그 #C404006으로 상업적으로 입수가능함, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 캘리포니아주 칼스배스)로 형질전환시키고, 100ug/ml 카르베니실린 (카탈로그 #L1010으로서 상업적으로 입수가능함, 테크노바(Teknova), 캘리포니아주 홀리스터)을 함유하는 LB 한천 플레이트 상에 플레이트팅하고, 밤새 37°C에서 성장시켰다.

[0537] 다음 날, 개별 박테리아 콜로니를 선택하고, 100ug/ml 암피실린 (카탈로그 #A9626으로서 상업적으로 입수가능함, 테크노바)을 갖는 LB 브로쓰 (#10855-001, 라이프 테크놀로지스)에서 3ml 박테리아 배양을 시작하기 위해 사용하였다. 배양물을 밤새 37°C에서 성장시켰다. 다음 날, 이. 콜라이를 펠렛화하고 (6,000rpm, 10분, 탁상용 원심분리기 #5424, 카탈로그 에펜도르프로서 상업적으로 입수가능함, 뉴욕주 하포크), 퀴아프랩 스피ن 미니프랩(QIAprep Spin Miniprep) 키트 (#27106, 퀴아젠)를 사용하여 DNA 발현 벡터를 단리하였다. 플라스미드 DNA를 서열 검증하였다 (엠씨랩(MCLab), 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코).

[0538] **실시예 2. 인간 IL2 REH 발현 벡터 pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2-REH의 생성**

[0539] 인간 IL2 ORF에 3개의 돌연변이가 도입된 발현 벡터 (L38R, Q42E 및 Q146H; 모든 넘버링은 전장 인간 IL2 ORF NM_000586.3 넘버링을 기반으로 하며, 즉, 성숙한 hIL2 분자의 20개 아미노산 서열이 아니라 신호 펩티드를 포함하는 hIL2가 발현됨)를 하기 예외를 제외하고는 실질적으로 실시예 1의 교시내용에 따라 조립하였다: PCR을 위해 사용된 초기 주형 DNA는 L38R (성숙한 단백질의 L18R), Q42E (성숙한 단백질의 Q22E) 및 Q146H (성숙한 단백질의 Q126H) 돌연변이를 갖도록 합성되었다.

[0540] **실시예 3. 인간 IL2 REM 발현 벡터 pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 REM의 생성**

[0541] 인간 IL2 ORF에 3개의 돌연변이를 도입한 발현 벡터 (L38R, Q42E 및 Q146M; 모든 넘버링은 전장 인간 IL2 ORF NM_000586.3 넘버링을 기반으로 함)를 하기 예외를 제외하고는 pcDNA3.1/히그로(+)에서 인간 IL2 발현 벡터에 대해 기재된 바와 같이 정확하게 조립하였다: PCR을 위해 사용된 초기 주형 DNA는 L38R, Q42E 및 Q146M 돌연변이를 갖도록 합성되었다.

[0542] **실시예 4. pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 및 pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 REH 발현 벡터에 돌연변이 또는 역돌연변이의 도입**

[0543] 실질적으로 제조자의 프로토콜에 따라, 모든 돌연변이 또는 역돌연변이 (야생형 인간 IL2 ORF와 일치시키기 위해 pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2-REH에서 돌연변이를 다시 되돌림)를 퀵 체인지(Quik Change) II 부위 지정된 돌연변이유발 키트 (#200524, 애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 캘리포니아주 산타 클라라)를 사용하여 pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 또는 pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2-REH 발현 벡터에 도입시켰다. 표 15 및 표 16은 생성된 돌연변이, 돌연변이가 도입된 주형, 및 돌연변이를 도입시키기 위해 사용된 프라이머 세트를 나열한

다. 이. 콜라이로 퀵 체인지 PCR 반응의 형질전환, 뿐만 아니라 플라스미드 DNA의 단리 및 서열 분석은 pcDNA3.1/히그로-huIL2 발현 벡터의 생성에서와 동일한 프로토콜을 이용하여 수행되었다.

표 15. 퀵 체인지 돌연변이유발					
전체 ORF #	38	42	146	<u>*주형</u>	
성숙한 펩티드 #	18	22	126	IL2: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 IL2 REH: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 REH IL2 REK: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 REK IL2 AEH: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 AEH IL2 EEH: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 EEH IL2 VEH: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 VEH IL2 HEH: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 HEH IL2 IEH: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 IEH IL2 RTH: pcDNA3.1/히그로(+)-huIL2 RTH	
hIL2 야생형 인간 IL2 잔기	L	Q	Q	프라이머 세트 (5'→3')	주형*
REE	R	E	E	GATGGATTACCTTTTGTGAGAGCATCATCTCAACA (서열 식별번호: 16) TGTTGAGATGATGCTCTCACAAAAGGTAATCCATC (서열식별 번호: 17)	IL2 REK
REM	R	E	M	GGATTACCTTTTGTATGAGCATCATCTCAAC (서열식별번호: 18) GTTGAGATGATGCTCATACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 19)	IL2 REK
REV	R	E	V	GGATTACCTTTTGTGTGAGCATCATCTCAACAC (서열식별 번호: 20) GTGTTGAGATGATGCTCACACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 21)	IL2 REK
REL	R	E	L	GGATTACCTTTTGTCTGAGCATCATCTCAACAC (서열식별 번호: 22) GTGTTGAGATGATGCTCAGACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 23)	IL2 REK
REF	R	E	F	GGATTACCTTTTGTTCAGCATCATCTCAACAC (서열식별 번호: 24) GTGTTGAGATGATGCTGAAACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 25)	IL2 REK

[0544]

REN	R	E	N	GGATTACCTTTTGTAAACAGCATCATCTCAACAC (서열식별 번호:26) GTGTTGAGATGATGCTGTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 27)	IL2 REK
RER	R	E	R	GGATTACCTTTTGTAGGAGCATCATCTCAACAC (서열식별 번호:28) GTGTTGAGATGATGCTCCTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 29)	IL2 REK
REY	R	E	Y	GGATTACCTTTTGTACAGCATCATCTCAACAC (서열식별 번호:30) GTGTTGAGATGATGCTGTAACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 31)	IL2 REK
AEK	A	E	K	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	IL2 AEH
EEK	E	E	K	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	IL2 EEH
VEK	V	E	K	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	IL2 VEH
HEK	H	E	K	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	IL2 HEH
IEK	I	E	K	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	IL2 IEH
RTK	R	T	K	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	IL2 RTH

[0545]

표 16. hIL2 오르토로그 구축물		
명칭	프라이머 세트 (5'→3') +	주형
REE	GATGGATTACCTTTTGTGAGAGCATCATCTCAACA (서열 식별번호: 16) TGTTGAGATGATGCTCTCACAAAAGGTAATCCATC (서열 식별번호: 17)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REM	GGATTACCTTTTGTATGAGCATCATCTCAAC (서열식별번호: 18) GTTGAGATGATGCTCATACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 19)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REV	GGATTACCTTTTGTGTGAGCATCATCTCAACAC (서열식별번호: 20) GTGTTGAGATGATGCTCACACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 21)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REL	GGATTACCTTTTGTCTGAGCATCATCTCAACAC (서열식별번호: 22) GTGTTGAGATGATGCTCAGACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 23)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REF	GGATTACCTTTTGTTCAGCATCATCTCAACAC (서열식별번호: 24) GTGTTGAGATGATGCTGAAACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 25)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REN	GGATTACCTTTTGTAAACAGCATCATCTCAACAC (서열식별번호: 26) GTGTTGAGATGATGCTGTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 27)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
RER	GGATTACCTTTTGTAGGAGCATCATCTCAACAC (서열식별번호: 28) GTGTTGAGATGATGCTCCTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 29)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REY	GGATTACCTTTTGTACAGCATCATCTCAACAC (서열식별번호: 30) GTGTTGAGATGATGCTGTAACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 31)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + N88R	GACTTAATCAGCCGATCAACGTAATA (서열식별번호: 34) TATTACGTTGATACGGCTGATTAAGTC (서열식별번호: 35)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + N88D	GGACTTAATCAGCGATATCAACGTAAT (서열식별번호: 36) ATTACGTTGATATCGCTGATTAAGTCC (서열식별번호: 37)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + N88G	GGGACTTAATCAGCGGATCAACGTAAT (서열식별번호: 38) ATTACGTTGATACCGCTGATTAAGTCCC (서열식별번호: 39)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + N88I	GGACTTAATCAGCATTATCAACGTAAT (서열식별번호: 40) ATTACGTTGATAATGCTGATTAAGTCC (서열식별번호: 41)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20I	GCATTTAAGGCTGATTTTAGAGATGATTTTG (서열식별번호: 42) CAAAATCATCTCTAAATCAGCCTTAAATGC (서열식별번호: 43)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20H	GAGCATTTAAGGCTGCATTTAGAGATG (서열식별번호: 44) CATCTCTAAATGCAGCCTTAAATGCTC (서열식별번호: 45)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20T	GCATTTAAGGCTGACTTTAGAGATGATTTTG (서열식별번호: 46) CAAAATCATCTCTAAAGTCAGCCTTAAATGC (서열식별번호: 47)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20G	GCATTTAAGGCTGGGTTAGAGATGA (서열식별번호: 48) TCATCTCTAAACCCAGCCTTAAATGC (서열식별번호: 49)	pExSyn2.0 - hIL2 REK

[0546]

표 16. hIL2 오르토로그 구축물		
명칭	프라이머 세트 (5'→3') +	주형
REK + D20A	GCATTTAAGGCTGGCTTTAGAGATGATTTTG (서열식별번호: 50) CAAAATCATCTCTAAAGCCAGCCTTAAATGC (서열식별번호: 51)	pExSyn2.0 - hIL2 REK
AEH + V91K	CAGCAATATCAACAAGATAGTTCTGGAAC (서열식별번호: 52) GTTCCAGAACTATCTTGTTGATATTGCTG (서열식별번호: 53)	pExSyn2.0 - hIL2 AEH
EEH + V91K	CAGCAATATCAACAAGATAGTTCTGGAAC (서열식별번호: 52) GTTCCAGAACTATCTTGTTGATATTGCTG (서열식별번호: 53)	pExSyn2.0 - hIL2 EEH
VEH + V91K	CAGCAATATCAACAAGATAGTTCTGGAAC (서열식별번호: 52) GTTCCAGAACTATCTTGTTGATATTGCTG (서열식별번호: 53)	pExSyn2.0 - hIL2 VEH
HEH + V91K	CAGCAATATCAACAAGATAGTTCTGGAAC (서열식별번호: 52) GTTCCAGAACTATCTTGTTGATATTGCTG (서열식별번호: 53)	pExSyn2.0 - hIL2 HEH
IEH + V91K	CAGCAATATCAACAAGATAGTTCTGGAAC (서열식별번호: 52) GTTCCAGAACTATCTTGTTGATATTGCTG (서열식별번호: 53)	pExSyn2.0 - hIL2 IEH
RTH + V91K	CAGCAATATCAACAAGATAGTTCTGGAAC (서열식별번호: 52) GTTCCAGAACTATCTTGTTGATATTGCTG (서열식별번호: 53)	pExSyn2.0 - hIL2 RTH
REE + V91K	CAGCAATATCAACAAGATAGTTCTGGAAC (서열식별번호: 52) GTTCCAGAACTATCTTGTTGATATTGCTG (서열식별번호: 53)	pExSyn2.0 - hIL2 REE
AEK	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	pExSyn2.0 - hIL2 AEH
EEK	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	pExSyn2.0 - hIL2 EEH
VEK	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	pExSyn2.0 - hIL2 VEH
HEK	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	pExSyn2.0 - hIL2 HEH
IEK	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	pExSyn2.0 - hIL2 IEH
RTK	GGATTACCTTTTGTAAAGAGCATCATCTC (서열식별번호: 32) GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC (서열식별번호: 33)	pExSyn2.0 - hIL2 RTH
N88R	GACCTAATCAGCCGTATCAACGTAATA (서열식별번호: 34) TATTACGTTGATACGGCTGATTAAGTC (서열식별번호: 35)	pExSyn2.0 - hIL2

실시예 5. HEK293 세포에서 일시적인 형질감염

모든 발현 벡터를 HEK293 세포 (#CRL-1573, ATCC, 버지니아주 마나사스)에 일시적으로 형질감염시켰다. 10% 태아 소 혈청 (#SH30071.03, 피셔 사이언티픽, 일리노이주 시카고)으로 보충된 2ml의 DMEM (#10569044, 라이프 테크놀로지스)에서 6 웰 조직 배양물 플레이트의 각각의 웰에 ~1E6 HEK293 세포를 플레이팅하고, 밤새 37°C 및 5% CO₂에서 성장시켰다. 다음 날, 제조자의 프로토콜에 따라 리포팩타민 3000 시약 (#L3000150, 라이프 테크놀로지스)을 사용하고, 형질감염당 2.5ug DNA, 5ul P3000 시약, 및 7.5ul 리포팩타민 3000을 사용하여 세포를 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 37°C, 5% CO₂에서 48 - 72시간 동안 성장시킨 다음, 조건화된 배지를 수확하였다.

실시예 6. 단백질 발현의 분석

제조자의 프로토콜에 따라, 인간 IL2 브이-플렉스(V-PLEX) ELISA 키트 (#K151QQD-4, 메조스케일 다이아그노스틱스(Mesoscale Diagnostics), 메릴랜드주 볼티모어)를 사용하여 ELISA에 의해 단백질 발현을 측정하였다 (형질감염된 배지를 처음에는 1:4로 희석한 다음, 1:2로 계열 희석하였음). 이 ELISA 키트에 대한 제조자의 사전 프로그래밍된 설정을 이용하여 플레이트를 메조 퀵플렉스(Meso Quickplex) SQ120 (메조스케일 다이아그노스틱스) 상에서 판독하였다. 키트에서 인간 IL2 표준을 이용하여, 조건화된 배지 샘플에서 대략적인 발현 수준을 계산하였다.

실시예 7. CD25- 및 CD25+ 세포에 대한 IL2 활성 (STAT5)의 결정

2-3일 인큐베이션 후, 가용성 IL2 단백질을 함유하는 293T 세포로부터의 상청액의 샘플을 상기 실시예 5에 따라 제조하고, YT 세포 (CD25NEG), 및 대략 20분 동안 CD25 (YTCD25POS)를 구성적으로 발현하도록 조작된 YT 세포에 첨가하였다. 포스포-STAT5 (pSTAT5) 유도 수준을 유도 세포측정법에 의해 측정하였다. pSTAT5 수준의 유도 배수의 결과는 침부된 도면의 도 2에 도시된다. CD25 상태에 대한 IL2 단백질의 선택성은 CD25+ YT 세포

(pSTAT5^{YTC25}) 상에서의 포스포-STAT5 상승 수준을 CD25 음성 YT 세포 (pSTAT5^{YT})에서의 포스포-STAT5 수준을 나누어서 계산되었다. 이들 실험 결과는 첨부된 도면의 도 2에 제공된다.

[0554] 제시된 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 개시내용의 IL2 뮤테인은 CD25 양성 세포 상에서 pSTAT5의 선택적인 유도를 제공하고, 유의한 IL2 활성을 유지한다.

[0555] 실시예 8. 인간 T 세포 클론 3F8에서 오르토로그의 활성의 평가

[0556] 대표적인 hIL-2 뮤테인의 패널을 CD4 양성 인간 T 세포 클론 3F8 세포에서 활성에 대해 평가하였다. 2회 연속 라운드의 혼합 백혈구 반응에 이어서, (Yssel and Spits (2002) Current Protocols in Immunology 7.19.1 - 7.19.12)에 기재된 제한 희석에 의한 단일 세포 클로닝에 의해, 건강한 공여자의 PBMC를 EBV 형질전환된 B 세포 주 JY에 의해 활성화시킴으로써 CD4 양성 T 세포 클론 3F8을 생성하였다. CD4 양성 T 세포 클론 3F8은 CD25 및 CD122를 발현하고, IL-2에 대한 반응으로 IFN γ 를 증식시키고 생성하였다.

[0557] 3F8 세포를 하기와 같이 hIL-2 뮤테인으로 형질감염된 293T 세포로부터의 상청액과 접촉시켰다: 이셀(Yssel) 배지 (이스코브(Iscove) 변형된 돌베코 배지 (썬피셔), 0.25% w/v % 인간 알부민 (시그마), 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (썬피셔), 1 % ITS-X 인슐린, 트랜스페린, 셀레늄 (깁코(Gibco)), 30 mg/L 트랜스페린 (로슈(Roche)), 2 mg/L 팔미트산 (시그마), 1 % LA-0A-알부민 리놀레산, 올레산 (시그마), 1 % 인간 혈청 (제미니(Gemini))으로 이루어진 성장 배지에서 10만개 세포/웰에서 50 Gy 방사선 조사된 JY 세포 및 100만개 세포/mL에서 40 Gy 방사선 조사된 동종이계 PBMC를 갖는 20만개 세포/mL에서 세포를 성장시켰다 (Yssel et al (1984) J Immunol Methods 72: 219 - 227). 100 pM에서 인간 IL-2에 의한 6일의 배양 및 확장 후에, 세포를 세척하고, 75 μ l 성장 배지 중에서 흑색의 투명 바닥 96 웰 플레이트 (코스타(Costar))에 5만개 세포/웰로 시딩하였다. 형질감염된 293T 세포 상청액의 5배 계열 희석을 성장 배지에서 수행하고, 75 μ l의 각각의 희석액을 1:2 내지 1:78125 범위의 최종 적정으로 3F8 세포의 플레이트에 이중으로 첨가하였다. 플레이트를 가습 인큐베이터 (썬피셔)로 옮기고, 37 $^{\circ}$ C, 5 % 이산화탄소에서 3일 동안 인큐베이션하였다.

[0558] 인큐베이터로부터 플레이트를 제거하고, 40 μ l의 배양 상청액을 96 웰 편평 바닥 플레이트 (코스타)에서 수확하였다. 이중 웰로부터의 상청액을 플링하였다. 제조자의 지침에 따라 셀타이터글로 (프로메가(Promega))의 웰당 100 μ l를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 케도 진탕기 (브이더블유알 사이언티픽(VWR Scientific))에서 2분 동안 300 rpm에서 혼합한 다음, 실온에서 10분 동안 유지시켰다. 3F8 세포 용해물에 대한 발광을 엔비전(Envision) 2103 다중표지 플레이트 판독기 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer)) 상에서 초당 카운트로 판독하였다.

[0559] 제조자의 지침에 따라 MSD IFN γ 브이-플렉스 키트 (MSD K151QOD)를 사용하여 배양 상청액에서 IFN γ 의 생성을 측정하였다. 간략히, mAb 사전 코팅된 MSD IFN γ 검정 플레이트를 150 μ L Tris 세척 완충제로 3회 세척하고, IFN γ 표준을 희석제 2로 희석하였다. 배양 상청액을 희석제 2로 1:1 희석하고, 50 μ L의 샘플 및 표준을 IFN γ 검정 플레이트에 첨가하고, 케도 진탕기 (브이더블유알 사이언티픽) 상에서 300 rpm에서 실온에서 120분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 Tris 세척 완충제로 3회 세척하고, 희석제 3 중의 25 μ L 1x 검출 항체를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 케도 진탕기 (브이더블유알 사이언티픽) 상에서 300 rpm에서 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 Tris 세척 완충제로 3회 세척하고, 150 μ L 2x 판독 완충제 T를 각각의 웰에 첨가하고, 발광 신호를 메조스케일 퀵플렉스(Mesoscale Quickplex) SQ120 장비 상에서 판독하였다. 상청액에서 IFN γ 의 농도는 MSD 소프트웨어에 의해 표준 곡선을 기반으로 하여 계산하였다.

[0560] 3F8 세포 증식 및 IFN γ 생성에 대한 각각의 hIL-2 뮤테인의 효과를 비교하기 위해, 상청액으로 처리된 세포에 대한 셀타이터글로 값 및 IFN γ 농도를 성장 배지 단독, 야생형 IL-2 형질감염, 또는 인간 REK IL-2 형질감염으로부터의 상청액으로 처리된 대조군 세포에 대해 수득된 것들과 비교하였다. 이들 실험으로부터의 데이터는 표 5 및 도 4에 제시된다. 이들 데이터는 증식 및 IFN γ 생성을 유도하기 위한 hIL-2 뮤테인의 활성 사이의 상관관계를 입증한다.

[0561] 약식 서열 목록

Seq ID NO	명칭 또는 설명	AA 서열
1	야생형 인간 IL2	APTSSSTKKTKQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	성숙한 hCD25	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTQMSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVY YQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETS QFPGEELKQASPEGRPESETSCLVTTTDFIQTEMAATMETSIFT TEYQVAVAGCVFLLISVLLSGLTWQRRQRKSRRTI
3	성숙한 hCD122	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRR RWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCRE GVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQ ASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTP DTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSQPLAFRTKPAALGKDTIPW LGHLLVGLSGAFGIILVYLLINCRNTGPWLKKVLCNTPDPSKF FSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKV TQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLSCTFTNQGYFFFHLPDALEIEAC QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFP SRDDLLLFSPLLGGSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRD WDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVS FPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV
4	hCD122의 ECD	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRR RWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCRE GVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQ ASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTP DTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSQPLAFRTKPAALGKDT
5	성숙한 hCD132 단백질	LNTTILTPNGNEDTTADFFLTTPMTDSLVSSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFS EITSGCQLQKKEIHLQTFVVLQDPREPRRQATQMLKLQNLVI PWAPENLTLHKLSESQLELNWNRFNLHCLEHLVQYRTDWDH SWTEQSVDYRHKFSPLVDGQKRYTFRVRSRFPNLCGSAQHWS EWSHPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCVYFWL ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSE RLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCYTLKPET
6	알부민 결합 펩티드	ICLPRWGCLW
7	Des Ala1 REH (STK-008)	PTSSSTKKTKQLQLEHLRLDLEMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFC ~~H~~ SIISTLT
8	Des Ala1 REK (STK-011)	PTSSSTKKTKQLQLEHLRLDLEMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS

[0562]

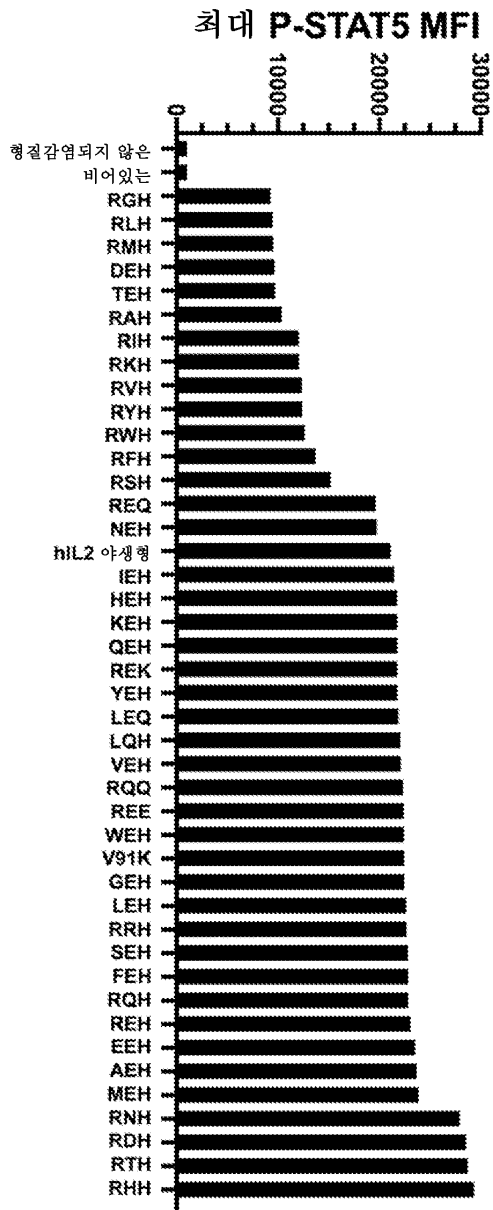
		NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFC ~~K~~ SIISTLT (SEQ ID NO:8)
9	STK-014	PTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQHLEQLRMDLEELSRMEN YRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLT QSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDDESATVVD FLRRWIAFCHSIISTSPQ

[0563]

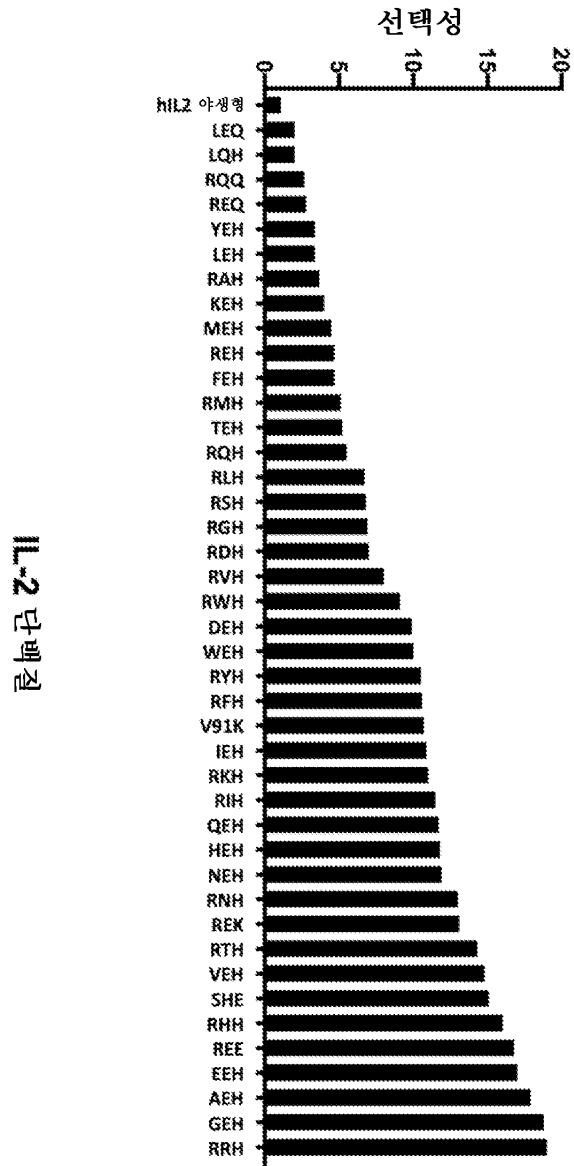
도면

도면1

IL-2 단백질



도면2

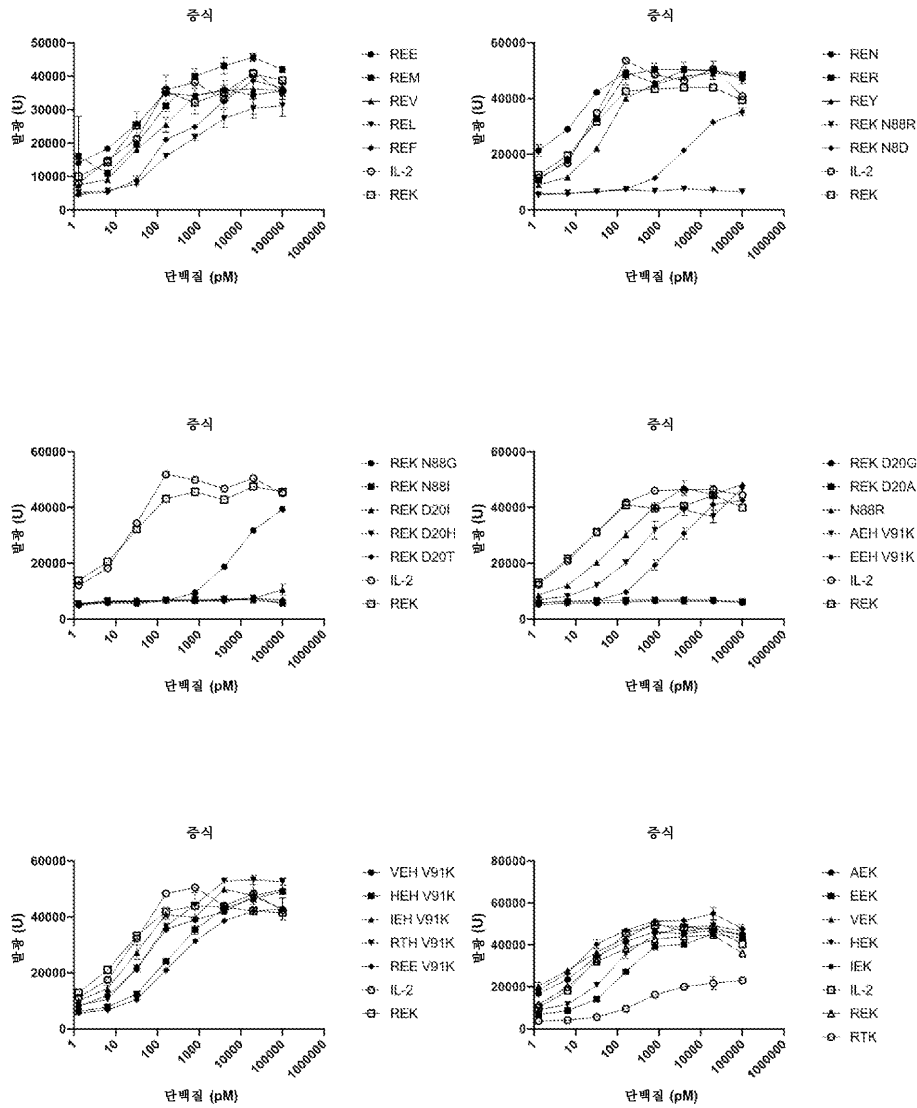


도면3

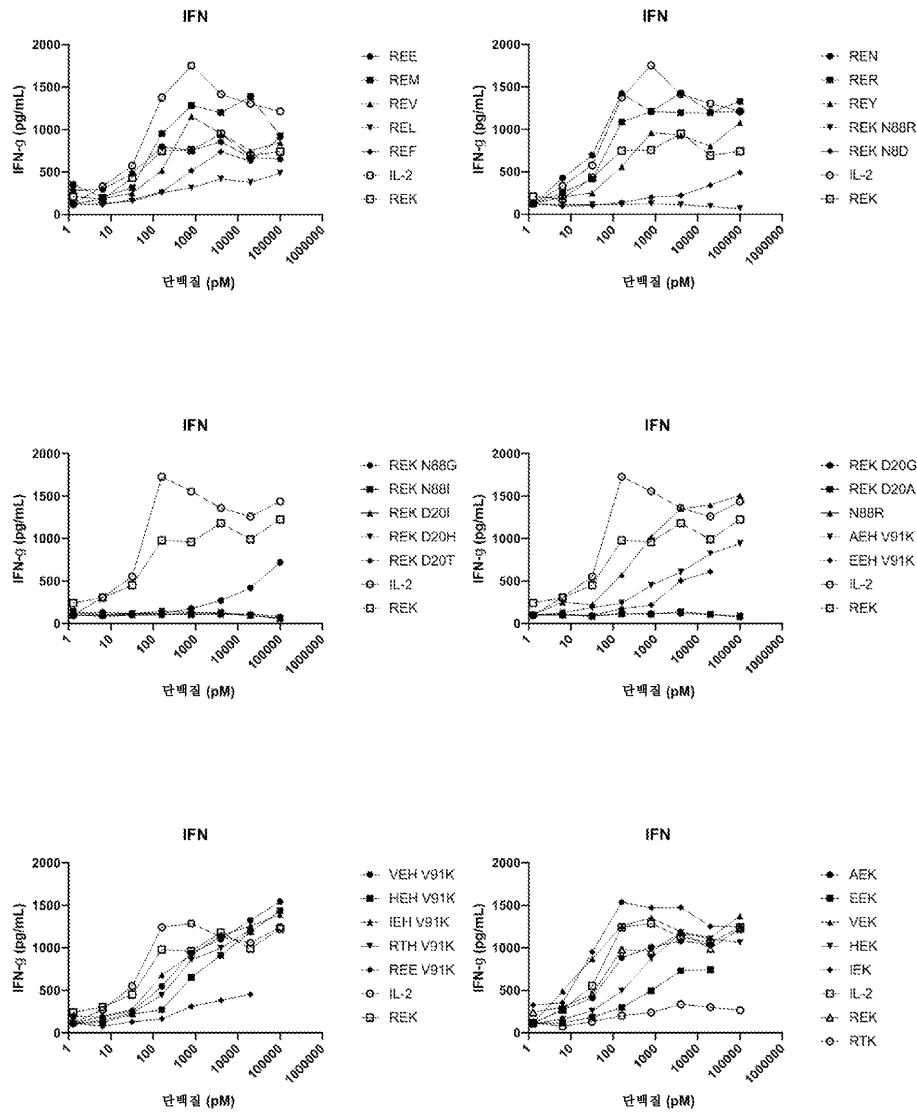
회색 배율	인간 IL2 wt	인간 IL2 REH	YEH	HEH	NEH	DEH	TEH	RGH	RAH	RLH	RMH	RFH	RWH	RKH	RSH	RVH	RIH	RYH	RHH	RRH	RNH	RDH	RTH
2	0.7	0.8	0.8	1.0	0.9	0.9	0.5	0.6	0.6	0.8	0.6	0.7	0.8	1.0	1.0	0.9	1.1	0.9	2.0	2.3	2.1	1.7	2.3
4	0.7	0.9	0.9	1.2	1.1	2.0	0.6	0.8	0.7	1.1	0.8	0.8	0.8	1.1	0.9	0.9	1.5	2.2	2.0	2.8	2.0	1.8	1.9
8	0.9	1.0	1.0	1.8	1.8	4.2	0.9	1.1	0.8	1.5	1.1	1.3	1.2	1.8	1.1	1.4	2.4	3.4	2.7	3.8	2.6	2.1	2.6
16	0.9	1.3	1.2	3.1	2.6	7.5	1.3	2.1	1.2	2.5	1.4	2.5	2.0	3.0	1.8	1.9	3.8	5.5	3.9	6.5	3.6	2.2	3.6
32	0.9	1.6	1.5	5.6	5.1	8.2	1.9	3.4	1.4	3.3	2.3	4.3	3.0	5.5	2.8	3.3	6.0	8.7	6.3	10.3	5.2	2.9	5.4
64	1.0	2.4	2.0	8.3	7.9	10.6	3.3	5.5	2.3	4.9	3.9	7.4	5.0	8.1	5.0	5.3	8.4	11.8	10.6	14.6	7.7	4.4	9.1
128	1.2	3.9	3.4	11.8	11.9	9.9	5.2	6.9	3.7	6.7	5.1	10.6	9.1	11.0	6.8	8.0	11.5	10.5	16.0	19.0	13.0	7.0	14.3

회색 배율	인간 IL2 wt	인간 IL2 REH	huIL2 L18R (R--)	huIL2 Q22E (-E-)	huIL2 Q126H (--H)	huIL2 (RE-)	huIL2 (R-H)	huIL2 (-EH)	huIL2 V91K	huIL2 REE	huIL2 REK	GEH	AEH	MEH	FEH	WEH	KEH	QEH	EEH	SEH	VEH	IEH
2	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	1.0	1.4	1.1	1.5	1.3	0.9	0.9	1.1	1.1	1.1	1.4	1.2	1.2	1.2
4	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.1	1.2	2.9	1.6	3.5	2.6	1.2	1.2	1.4	1.0	1.3	2.3	1.5	1.6	1.4
8	1.0	1.1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	1.2	1.3	5.9	2.6	7.2	6.7	1.2	1.3	1.5	1.1	1.8	4.8	2.5	2.4	1.6
16	0.9	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.4	1.3	2.3	10.1	4.8	13.2	9.7	1.4	1.4	2.2	1.4	3.1	8.4	4.0	3.6	2.6
32	0.9	1.8	1.1	1.0	1.1	1.1	1.8	1.6	4.2	13.5	7.7	16.2	14.1	1.8	1.7	3.9	1.6	5.8	14.7	7.8	6.3	4.6
64	1.1	2.9	1.4	1.3	1.2	1.4	2.7	2.3	6.7	15.3	11.8	17.5	16.6	2.7	2.9	6.4	2.3	6.3	16.9	11.4	10.9	7.2
128	1.1	4.7	2.7	2.0	2.0	2.8	5.5	3.4	10.7	16.8	13.1	18.8	17.9	4.5	4.7	10.0	4.0	11.7	17.0	15.1	14.8	10.9

도면4

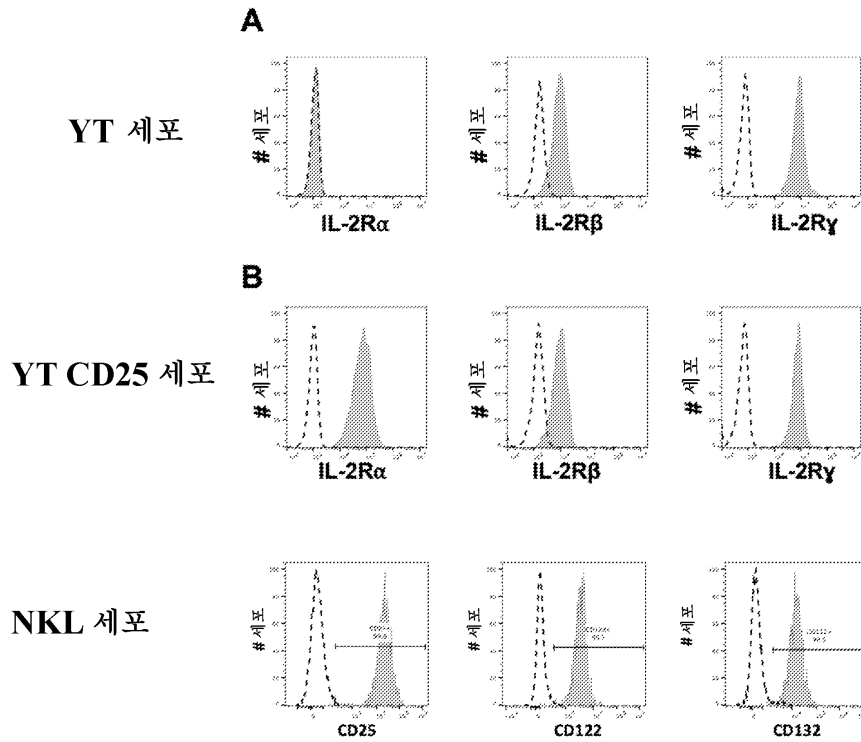


도면5



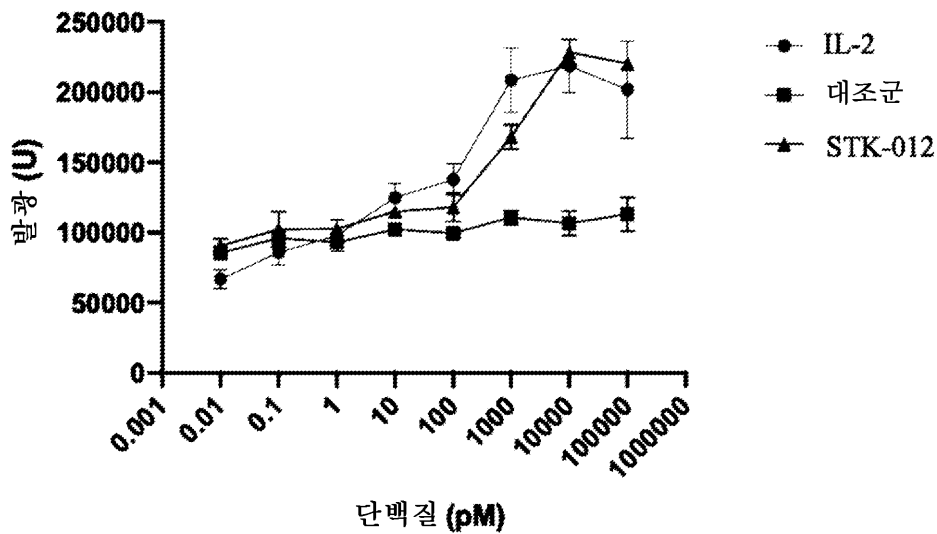
도면6

YT, YT CD25 및 NKL 세포에 의한 IL-2R 발현을 측정하기 위한
유동 세포분석법



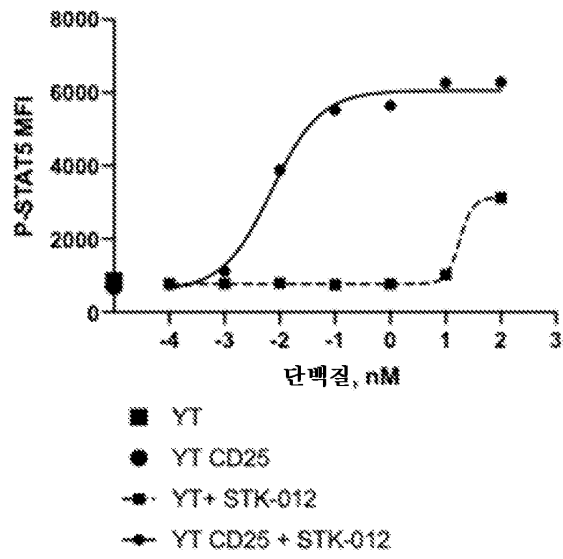
도면7

STK-012에 대한 반응으로 NKL 세포의 증식

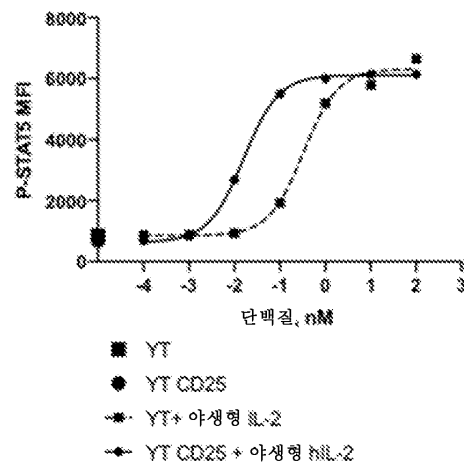


도면8

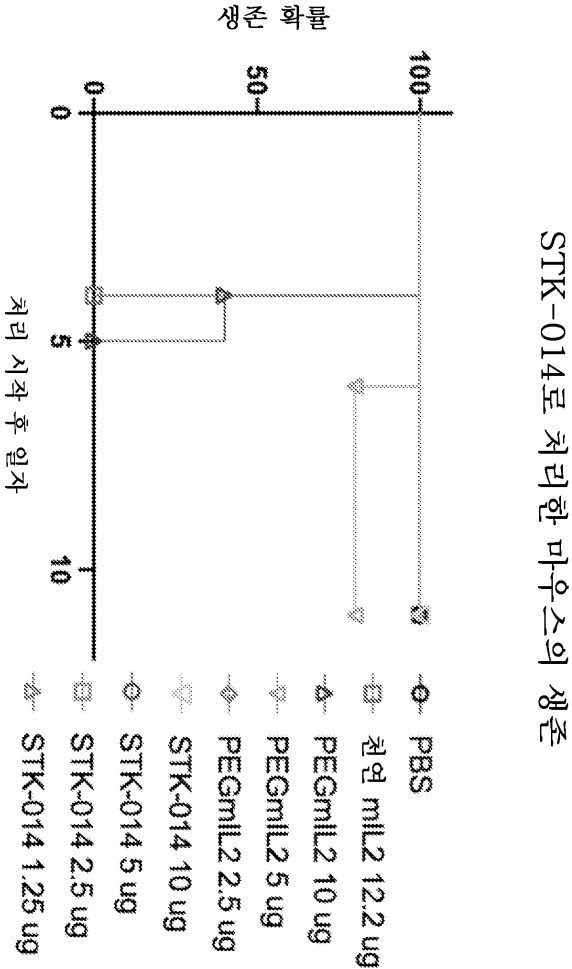
A



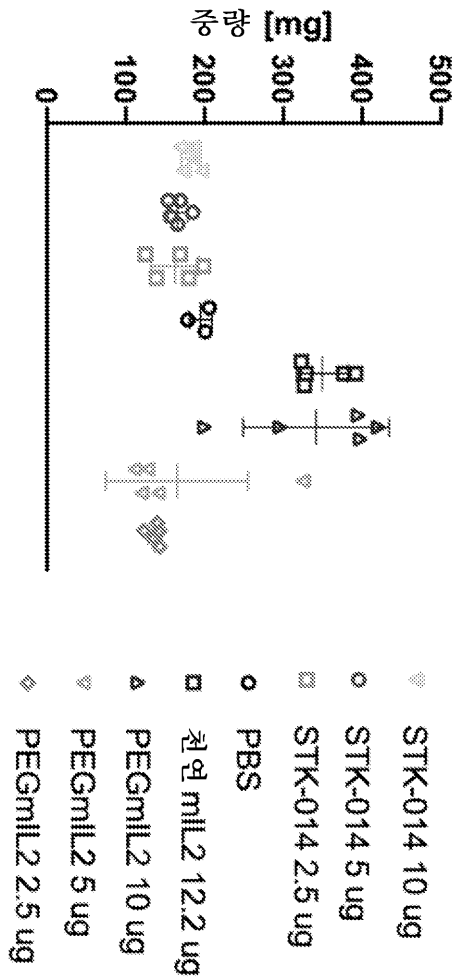
B



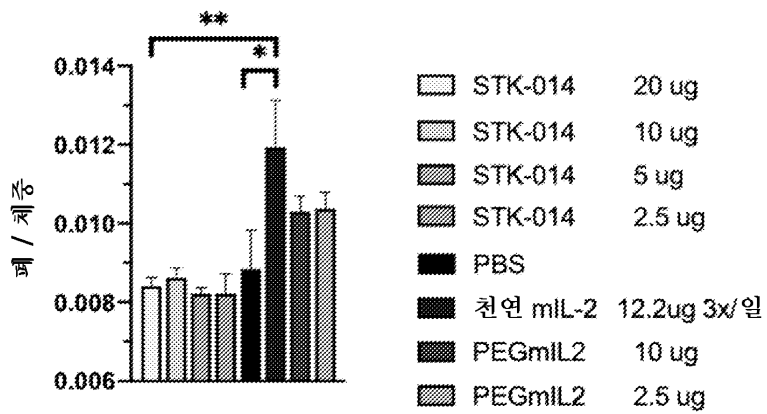
도면9



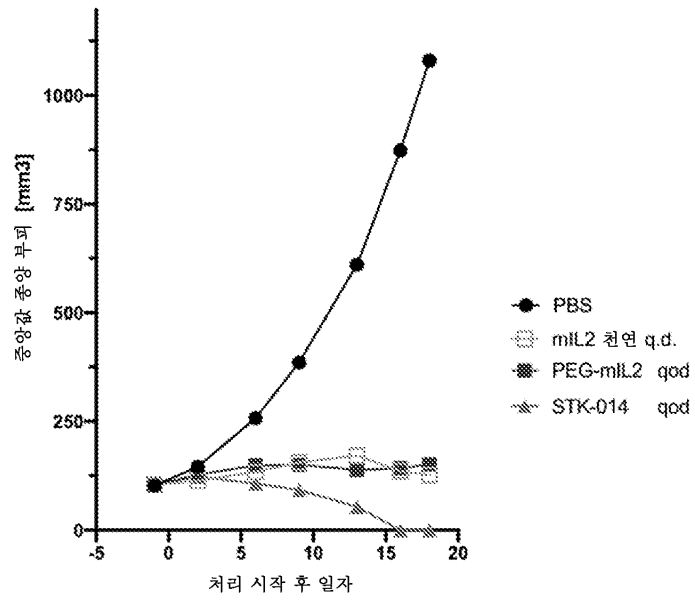
도면10



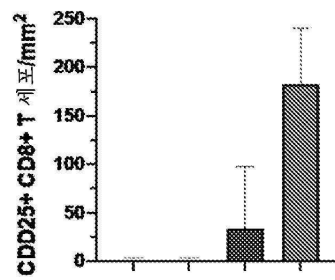
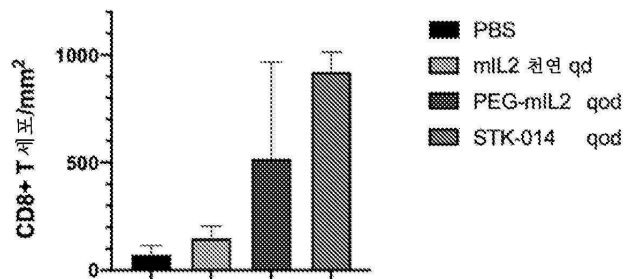
도면11



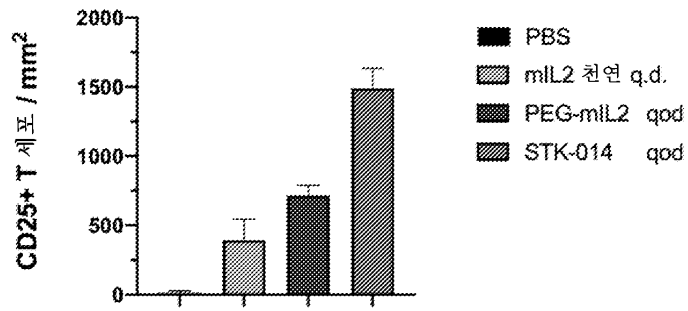
도면12



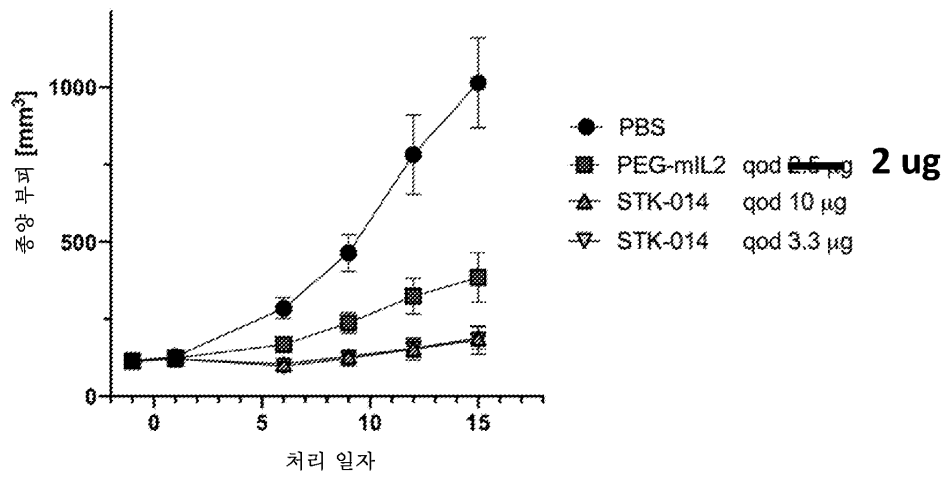
도면13



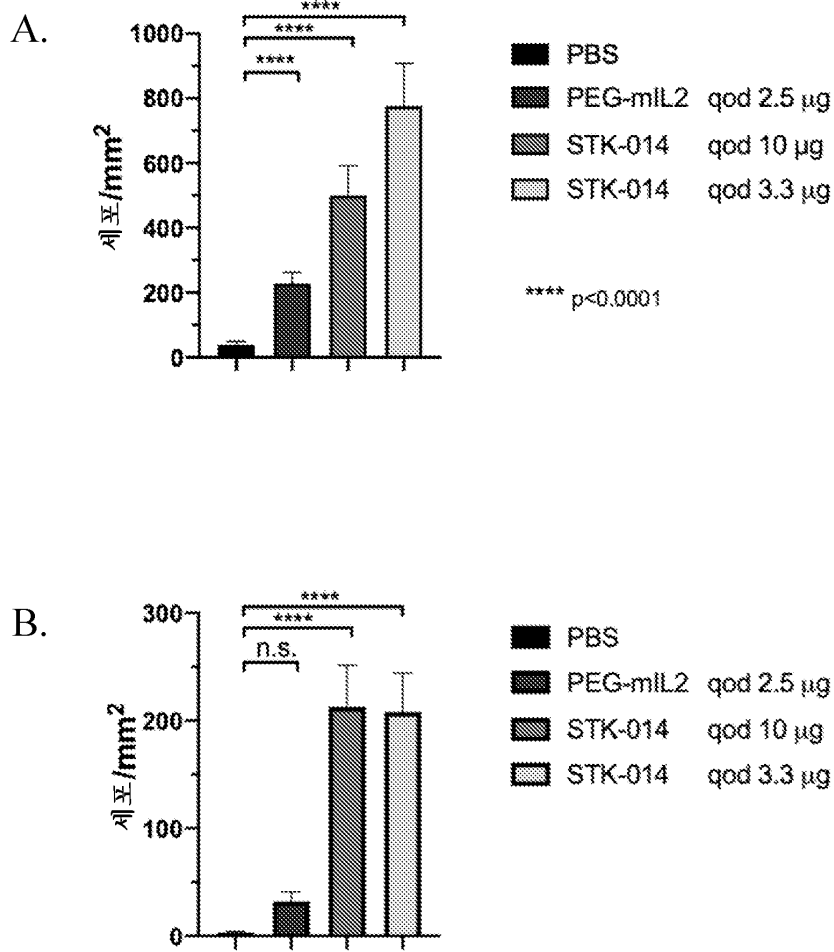
도면14



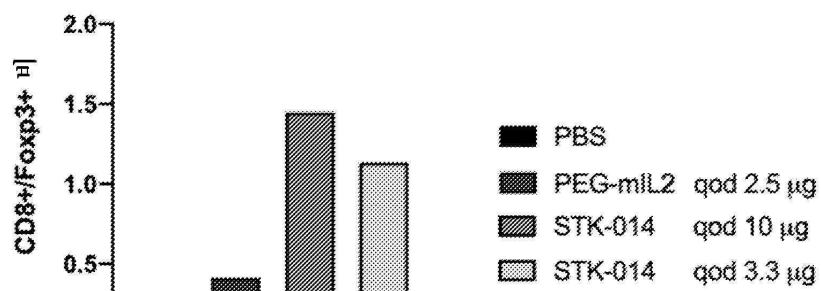
도면15



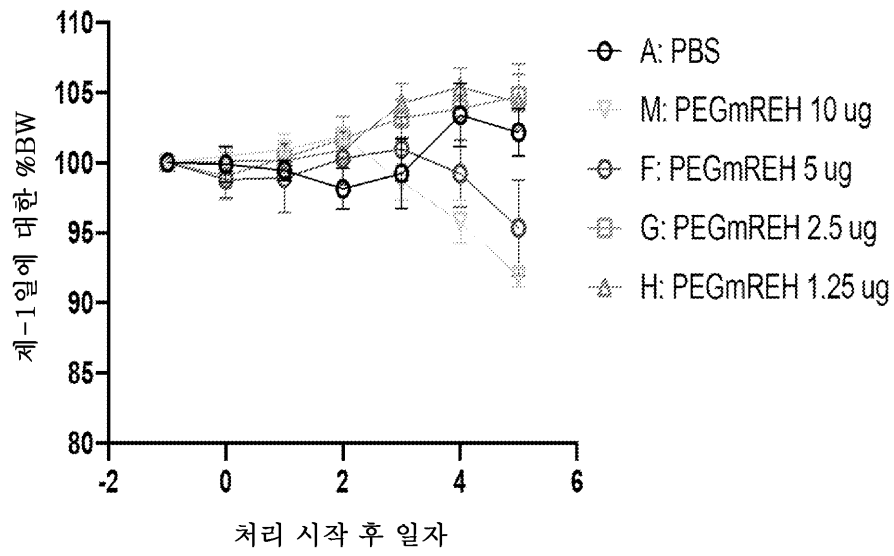
도면16



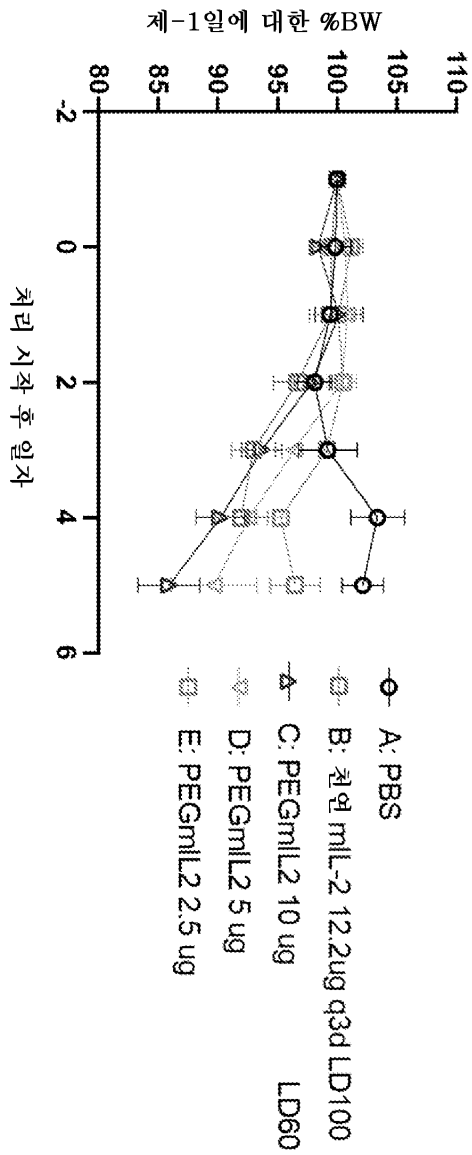
도면17



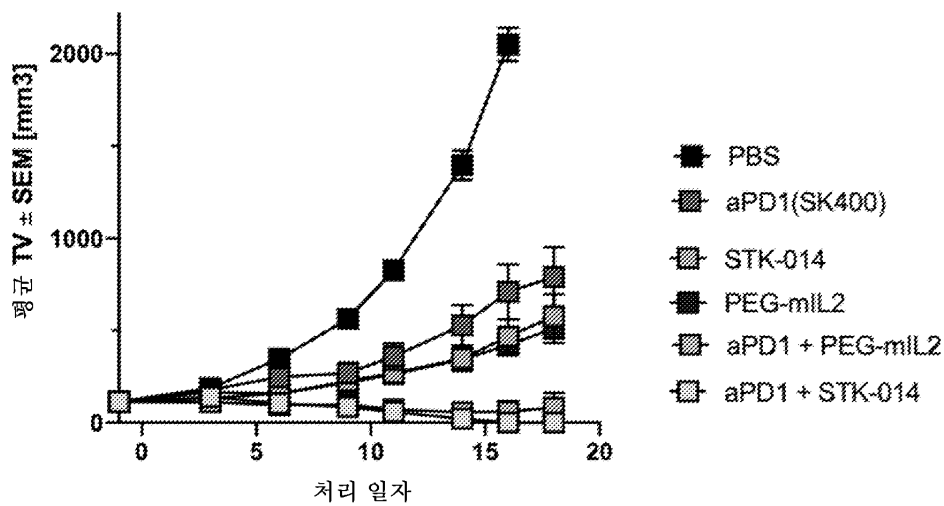
도면18



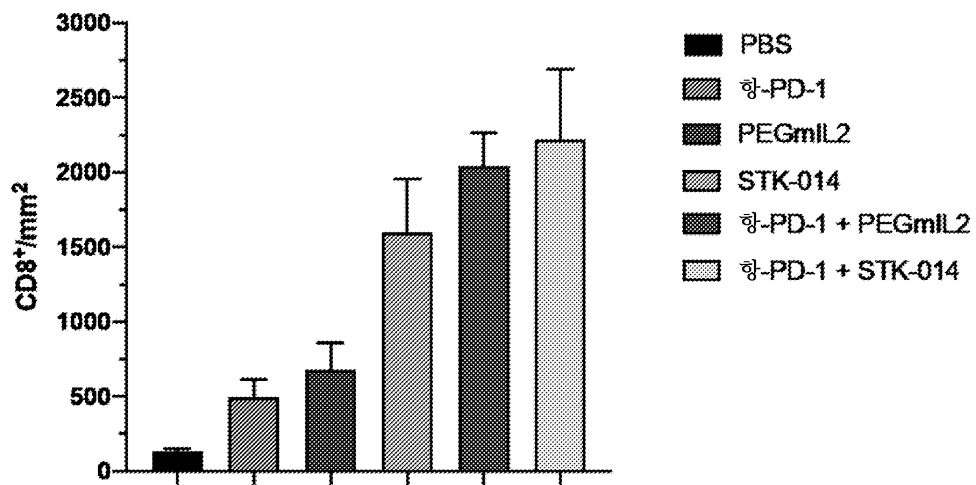
도면19



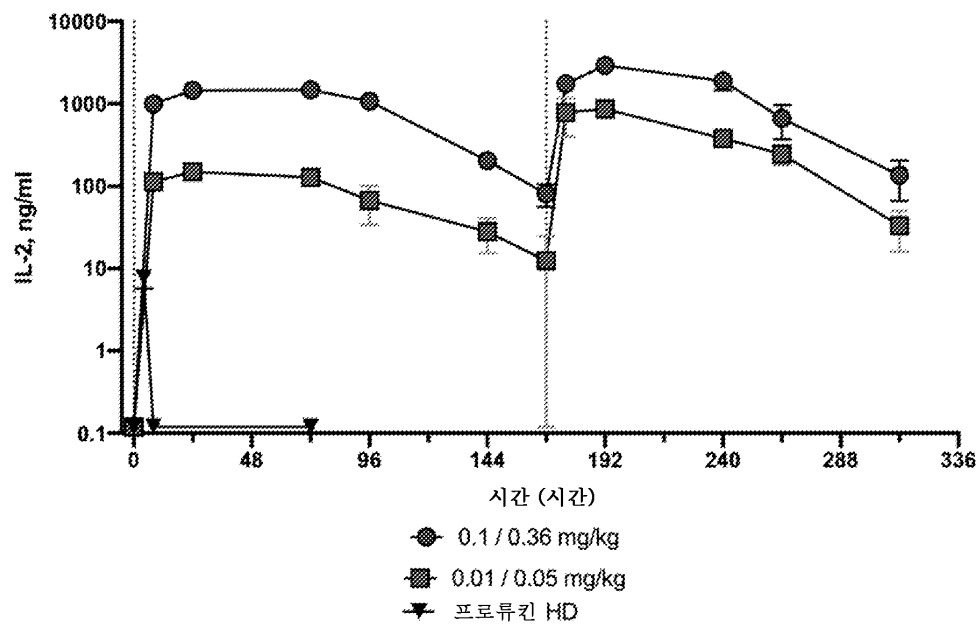
도면20



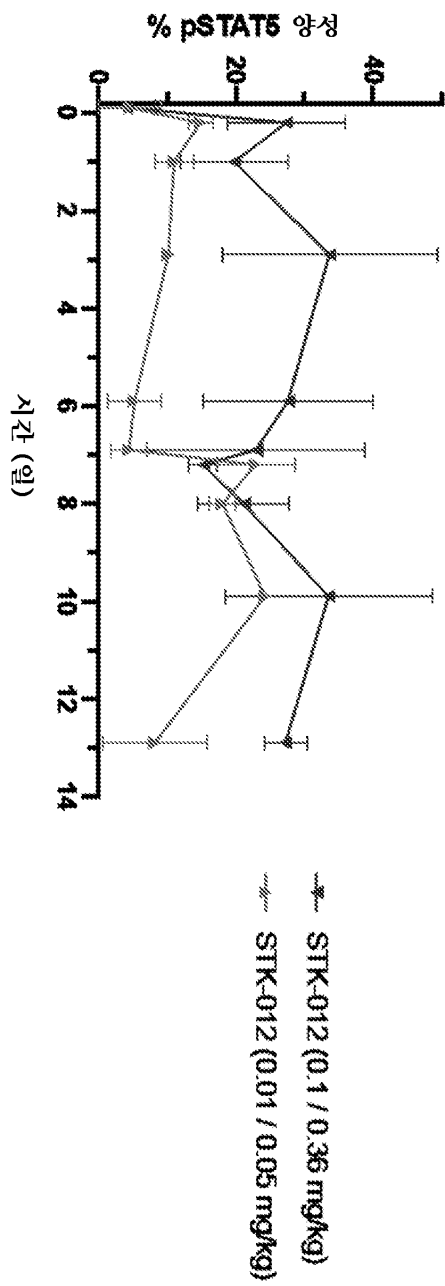
도면21



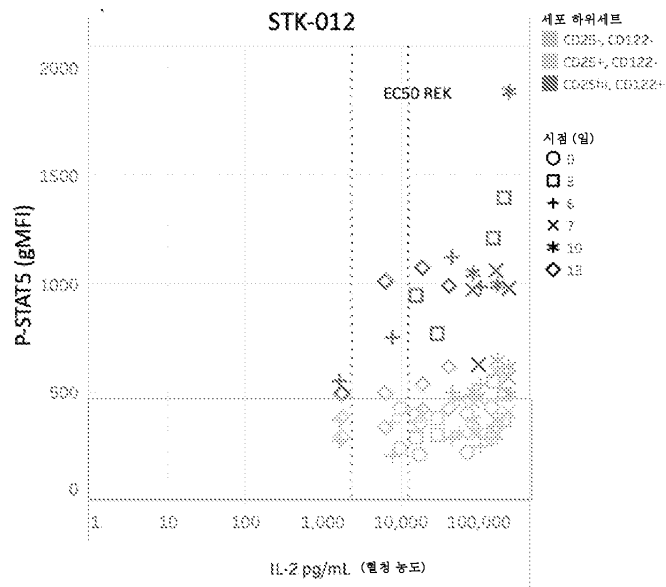
도면22



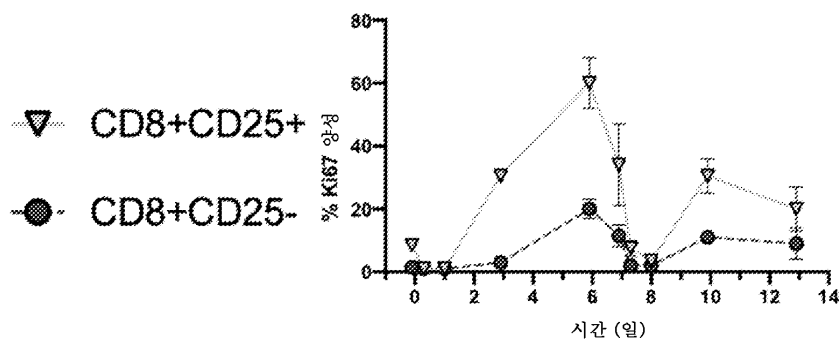
도면23



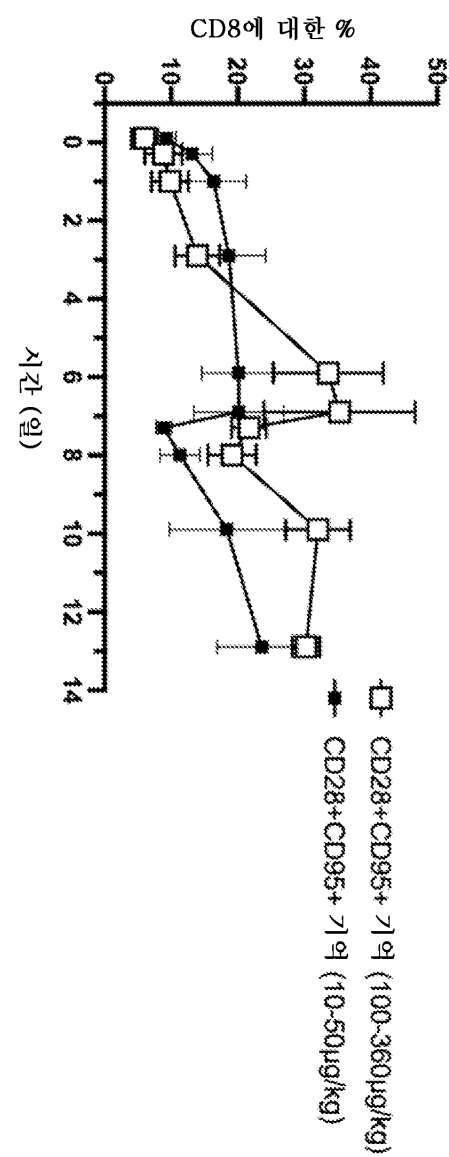
도면24



도면25



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SYNTEKINE, INC.

<120> BIASED IL2 MUTEINS AND COMPOSITIONS

<130> 1218665

<140> PCT/US2021/013456

<141> 2021-01-14

<150> 63/136,599

<151> 2021-01-12

<150> 62/961,141

<151> 2020-01-14

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 2

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

1					5					10					15				
Ala	Met	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gly	Thr	Met	Leu	Asn	Cys	Glu	Cys	Lys	Arg				
20				25				30											
Gly	Phe	Arg	Arg	Ile	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Tyr	Met	Leu	Cys	Thr	Gly				
35				40				45											
Asn	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Trp	Asp	Asn	Gln	Cys	Gln	Cys	Thr	Ser	Ser				
50				55				60											
Ala	Thr	Arg	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Val	Thr	Pro	Gln	Pro	Glu	Glu	Gln				
65				70				75				80							
Lys	Glu	Arg	Lys	Thr	Thr	Glu	Met	Gln	Ser	Pro	Met	Gln	Pro	Val	Asp				
85				90				95											
Gln	Ala	Ser	Leu	Pro	Gly	His	Cys	Arg	Glu	Pro	Pro	Pro	Trp	Glu	Asn				
100				105				110											
Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Ile	Tyr	His	Phe	Val	Val	Gly	Gln	Met	Val	Tyr				
115				120				125											
Tyr	Gln	Cys	Val	Gln	Gly	Tyr	Arg	Ala	Leu	His	Arg	Gly	Pro	Ala	Glu				
130				135				140											
Ser	Val	Cys	Lys	Met	Thr	His	Gly	Lys	Thr	Arg	Trp	Thr	Gln	Pro	Gln				
145				150				155				160							
Leu	Ile	Cys	Thr	Gly	Glu	Met	Glu	Thr	Ser	Gln	Phe	Pro	Gly	Glu	Glu				
165				170				175											
Lys	Pro	Gln	Ala	Ser	Pro	Glu	Gly	Arg	Pro	Glu	Ser	Glu	Thr	Ser	Cys				
180				185				190											
Leu	Val	Thr	Thr	Thr	Asp	Phe	Gln	Ile	Gln	Thr	Glu	Met	Ala	Ala	Thr				
195				200				205											
Met	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe	Thr	Thr	Glu	Tyr	Gln	Val	Ala	Val	Ala	Gly				
210				215				220											
Cys	Val	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Trp				
225				230				235				240							
Gln	Arg	Arg	Gln	Arg	Lys	Ser	Arg	Arg	Thr	Ile									
245				250															

<210> 3

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala
1 5 10 15

Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp Thr Ser
20 25 30

Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln Thr Cys
35 40 45

Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu
50 55 60

Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val Thr Leu
65 70 75 80

Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala Ile Gln
85 90 95

Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu
100 105 110

Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile
115 120 125

Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg
130 135 140

Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu
145 150 155 160

Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr
165 170 175

Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly Glu Phe Thr
180 185 190

Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr Lys Pro Ala
195 200 205

Ala Leu Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
210 215 220

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
225 230 235 240

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
245 250 255

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
260 265 270

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
275 280 285

Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
290 295 300

Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
305 310 315 320

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
325 330 335

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
340 345 350

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
355 360 365

Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
370 375 380

Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
385 390 395 400

Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
405 410 415

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
420 425 430

Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
435 440 445

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu

450 455 460
 Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
 465 470 475 480
 Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
 485 490 495
 Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
 500 505 510
 Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
 515 520 525
 <210> 4

 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala
 1 5 10 15
 Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp Thr Ser
 20 25 30
 Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln Thr Cys
 35 40 45
 Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu

 50 55 60
 Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala Ile Gln
 85 90 95
 Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu
 100 105 110
 Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile

 115 120 125
 Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg

130 135 140
 Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu
 145 150 155 160
 Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr
 165 170 175
 Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly Glu Phe Thr

180 185 190
 Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr Lys Pro Ala
 195 200 205
 Ala Leu Gly Lys Asp Thr

210

<210> 5

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu Asp Thr Thr Ala
 1 5 10 15
 Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp Ser Leu Ser Val Ser Thr

20 25 30
 Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Val Glu Tyr Met
 35 40 45
 Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro Thr Asn Leu Thr
 50 55 60
 Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn Asp Lys Val Gln Lys Cys
 65 70 75 80
 Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser Gly Cys Gln Leu Gln

85 90 95
 Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln Met Leu Lys Leu Gln Asn
 115 120 125

Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu His Lys Leu Ser
 130 135 140
 Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu Asn His Cys

 145 150 155 160
 Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His Ser Trp Thr
 165 170 175
 Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp
 180 185 190
 Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe Asn Pro Leu
 195 200 205
 Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro Ile His Trp

 210 215 220
 Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
 225 230 235 240
 Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
 245 250 255
 Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
 260 265 270
 Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp

 275 280 285
 Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser
 290 295 300
 Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
 305 310 315 320
 Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
 325 330 335
 Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 340 345

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 6

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 7

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

Arg Leu Asp Leu Glu Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ser Thr Leu Thr

130

<210> 8

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 8

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

1 5 10 15

Arg Leu Asp Leu Glu Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ser Thr Leu Thr

130

<210> 9

<211> 148

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln

1 5 10 15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Arg Met

20

25

30

Asp Leu Glu Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys

35

40

45

Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala Thr

50

55

60

Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg

65

70

75

80

His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala

85

90

95

Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly

100

105

110

Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val

115

120

125

Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys His Ser Ile Ile Ser

130

135

140

Thr Ser Pro Gln

145

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<

220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> A or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> P or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> T, C, A, G, Q, E, N, D, R, K, P, or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> S or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> S or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> S or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> T or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> K or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> K or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> L, R, G, M, F, E, H, W, K, Q, S, V, I, Y, H, D, or T

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Q, F, E, G, A, L, M, F, W, K, S, V, I, Y, H, R, N, D, T, or F

<220><221> MOD_RES

<222> (35)..(35)

<223> K or E

<220><221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

<223> R, W, or G

<220><221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> M, L, or V

<220><221> MOD_RES

<222> (55)..(55)

<223> H or Y

<220><221> MOD_RES

<222> (69)..(69)

<223> V or A

<220><221> MOD_RES

<222> (74)..(74)

<223> Q, P, N, H, or S

<220><221> MOD_RES

<222> (80)..(80)

<223> L, F, or V

<220><221> MOD_RES

<222> (81)..(81)

<223> R, I, D, or T

<220><221> MOD_RES

<222> (85)..(85)

<223> L or V

<220><221> MOD_RES

<222> (86)..(86)

<223> I or V

<220><221> MOD_RES

<222> (89)..(89)

<223> I or V

<220><221> MOD_RES

<222> (91)..(91)

<223> V, R, or K

<220><221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> I or F

<220><221> MOD_RES

<222> (97)..(97)

<223> K or Q

<220><221> MOD_RES
 <222> (104)..(104)
 <223> M or A
 <220><221> MOD_RES
 <222> (109)..(109)
 <223> D, C, or a non-natural amino acid with an activated side chain
 <220><221> MOD_RES
 <222> (113)..(113)
 <223> T or N
 <220><221> MOD_RES
 <222> (125)..(125)
 <223> C, A, or S
 <220><221> MOD_RES
 <222> (126)..(126)
 <223> Q, H, M, K, C, D, E, G, I, R, S, or T
 <220><221> MOD_RES
 <222> (130)..(130)
 <223> S, T, G, or R
 <400> 10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1	5	10	15
Leu	Xaa	Leu	Asp
Leu	Xaa	Met	Ile
Leu	Asn	Gly	Ile
Asn	Asn	Tyr	Lys
20	25	30	
Asn	Pro	Xaa	Leu
Thr	Xaa	Xaa	Leu
Thr	Phe	Lys	Phe
Tyr	Met	Pro	Lys
35	40	45	
Lys	Ala	Thr	Glu
Leu	Lys	Xaa	Leu
Gln	Cys	Leu	Glu
Glu	Glu	Leu	Lys
50	55	60	
Pro	Leu	Glu	Glu
Xaa	Leu	Asn	Leu
Ala	Xaa	Ser	Lys
Asn	Phe	His	Xaa

65	70	75	80
Xaa	Pro	Arg	Asp
Xaa	Xaa	Ser	Asn
Xaa	Asn	Xaa	Xaa
Val	Leu	Glu	Leu
85	90	95	
Xaa	Gly	Ser	Glu
Thr	Thr	Phe	Xaa
Cys	Glu	Tyr	Ala
Xaa	Glu	Thr	Ala
100	105	110	

Xaa Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Xaa Ser Ile

115

120

125

Ile Xaa Thr Leu Thr

130

<210

> 11

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 11

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln

1

5

10

15

Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Arg Met Asp Leu Glu Glu Leu Leu

20

25

30

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

35

40

45

Phe Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln

50

55

60

Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr

65

70

75

80

Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn

85

90

95

Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu

100

105

110

Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg

115

120

125

Trp Ile Ala Phe Cys His Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln

130

135

140

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

His tag

<220><221> SITE

<222> (1)..(6)

<223> This sequence may encompass 3-6 residues

<400> 12

His His His His His His

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 13

His His His His His His

1 5

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 14

tatagtcagc gccacccatg tacaggatgc aactcctgtc

40

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 15

tatagggccc tatcaagtca gtgttgagat g 31

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 16

gatggattac cttttgtgag agcatcatct caaca 35

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 17

tgttgagatg atgctctcac aaaaggtaat ccatc 35

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 18

ggattacctt ttgtatgagc atcatctcaa c 31

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 19

gttgagatga tgctcataca aaaggtaatc c 31

<210> 20

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 20
 ggattacctt ttgtgtgagc atcatctcaa cac 33
 <210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 21
 gtgttgagat gatgctcaca caaaaggtaa tcc 33
 <210> 22
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 22
 ggattacctt ttgtctgagc atcatctcaa cac 33
 <210> 23
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 23
 gtgttgagat gatgctcaga caaaaggtaa tcc 33
 <210> 24
 <211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 24

ggattacctt ttgtttcagc atcatctcaa cac 33

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 25

gtgttgagat gatgctgaaa caaaaggtaa tcc 33

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 26

ggattacctt ttgtaacagc atcatctcaa cac 33

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 27

gtgttgagat gatgctgtta caaaaggtaa tcc 33

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 28

ggattacctt ttgtaggagc atcatctcaa cac 33

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 29

gtgttgagat gatgctccta caaaaggtaa tcc 33

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 30

ggattacctt ttgttacagc atcatctcaa cac 33

<210> 31

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 31

gtgttgagat gatgctgttaa caaaaggtaa tcc 33

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 32

ggattacctt ttgtaagagc atcatctc

28

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 33

gagatgatgc tcttacaaaa ggtaatcc

28

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 34

gacttaatca gccgtatcaa cgtaata

27

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 35

tattacgttg atacggctga ttaagtc

27

<210> 36

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 36

ggacttaatc agcgatatca acgtaat

27

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 37

attacgttga tatcgctgat taagtcc

27

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 38

gggacttaat cagcggatc aacgtaat

28

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 39

attacgttga taccgctgat taagtccc

28

<210> 40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 40
ggacttaatc agcattatca acgtaat 27
<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 41
attacgttga taatgctgat taagtcc 27
<210> 42
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 42
gcatttaagg ctgatttttag agatgatttt g 31
<210> 43
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 43
caaaatcatc tctaaaatca gccttaaagt c 31
<210> 44
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 44

gagcatttaa ggctgcattt agagatg 27

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 45

catctctaaa tgcagcctta aatgctc 27

<210> 46

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 46

gcatttaagg ctgactttag agatgatttt g 31

<210> 47

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 47

caaaatcatc tctaaagtca gccttaaattg c 31

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 48

gcatttaagg ctgggtttag agatga 26

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 49

tcattctctaa acccagcctt aaatgc 26

<210> 50

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 50

gcattttaagg ctggctttag agatgatttt g 31

<210> 51

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 51

caaaatcatc tctaaagcca gccttaaatg c 31

<210> 52

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 52

cagcaatatc aacaagatag ttctggaac 29

<210> 53

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 53

gttcagaac tatctgttg atattgctg

29