

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-536098

(P2017-536098A)

(43) 公表日 平成29年12月7日(2017.12.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4C076
<b>C07K 2/00 (2006.01)</b>	C07K 2/00 ZNA	4C084
<b>C07K 14/54 (2006.01)</b>	C07K 14/54	4C085
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4H045
<b>C07K 16/00 (2006.01)</b>	C07K 16/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-519632 (P2017-519632)  
 (86) (22) 出願日 平成27年10月12日 (2015.10.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年6月8日 (2017.6.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/055156  
 (87) 国際公開番号 W02016/060996  
 (87) 国際公開日 平成28年4月21日 (2016.4.21)  
 (31) 優先権主張番号 62/063,784  
 (32) 優先日 平成26年10月14日 (2014.10.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515286243  
 アルモ・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・94603、レッドウッド・シティ、チェサピーク・ドライブ・575  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100119253  
 弁理士 金山 賢教  
 (74) 代理人 100124855  
 弁理士 坪倉 道明  
 (74) 代理人 100129713  
 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-15組成物及びその使用

(57) 【要約】

インターロイキン-15 ムテイン及び他のインターロイキン-15 関連分子、ならびにインターロイキン-15 ムテイン及び他のインターロイキン-15 関連分子を同定する方法が記載される。これらの改変も本明細書に記載され、前記改変はヒトインターロイキン-15 に比べて、ムテインまたは他分子の特性(例えば、半減期)を強化できる。医薬組成物及び使用方法も本明細書に記載される。

【選択図】 図1C

1C.Mature human IL-15 Protein (SEQ ID NO:3)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCTLLQLQVLSLGSGLDASHIDTVEN  
 LILANNLSLNGNVTESGCKEELLEEKNIKFLQSFVHIVQMFINTS

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a) ヘリックス A、b) A / B ヘリックス間接合、c) ヘリックス B、d) B / C ヘリックス間接合、e) ヘリックス C、f) C / D ヘリックス間接合、及び g) ヘリックス D を含むペプチドであって、前記ペプチドが a) ~ g) のうちの 1 つ以上に対して、少なくとも 1 つのアミノ酸置換、付加、または欠失を更に含む、前記ペプチド。

## 【請求項 2】

a) ヘリックス A、b) A / B ヘリックス間接合、c) ヘリックス B、d) B / C ヘリックス間接合、e) ヘリックス C、f) C / D ヘリックス間接合、及び g) ヘリックス D を含む前記ペプチドであって、前記ペプチドが、

10

アミノ酸残基 2 (W)、4 ~ 12 (N V I S D L K K I ; 配列番号 37) もしくは 16 (I) 以外のヘリックス A のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または  
アミノ酸残基 30 (D) もしくは 31 (V) 以外の A / B ヘリックス間接合のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または

アミノ酸残基 32 (H)、35 (C)、40 (M)、42 ~ 44 (C F L)、47 (L) もしくは 50 (I) 以外のヘリックス B のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または

B / C ヘリックス間接合のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または  
アミノ酸残基 59 (I)、61 ~ 66 (D T V E N L ; 配列番号 38) もしくは 68 ~ 70 (I L A) 以外のヘリックス C のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または  
アミノ酸残基 85 (C) もしくは 88 (C) 以外の C / D ヘリックス間接合のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または

20

アミノ酸残基 99 (F)、100 (L)、103 (F) もしくは 105 ~ 112 (H I V Q M F I N : 配列番号 39) 以外のヘリックス D の少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; を含む、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を更に含む、請求項 1 に記載の前記ペプチド。

## 【請求項 3】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が保存的置換である、請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 4】

前記ペプチドが配列番号 3 の生物活性と少なくとも同等の生物活性を有し、前記生物活性が生体外アッセイまたは生体内アッセイで決定される、請求項 2 に記載のペプチド。

30

## 【請求項 5】

前記生物活性が、TNF 産生アッセイ、CTL L - 2 細胞増殖アッセイ、M07e 細胞増殖アッセイ、または T - 細胞 IFN 分泌アッセイからなる群から選択される生体外アッセイである、請求項 4 に記載のペプチド。

## 【請求項 6】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が免疫原性に悪影響を与えない、請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 7】

前記ペプチドの前記免疫原性が、T 細胞エピトープまたは B 細胞エピトープのうちの少なくとも 1 つをスクリーニングすることにより予測される、請求項 6 に記載のペプチド。

40

## 【請求項 8】

前記スクリーニングが、インシリコスクリーニングシステムまたは生体外アッセイシステムのうちの少なくとも 1 つである、請求項 7 に記載のペプチド。

## 【請求項 9】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、以下の領域 : 13 ~ 15、17 ~ 29、36 ~ 39、51 ~ 58、71 ~ 84 または 89 ~ 98 のうちの少なくとも 1 つにある、請求項 2 に記載のペプチド。

## 【請求項 10】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、以下の領域 : 17 ~ 28、36 ~ 38、51 ~

50

57、71～84または89～98のうちの少なくとも1つにある、請求項2に記載のペプチド。

【請求項11】

前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、以下の位置：1、3、13～15、17～29、33、34、36～39、41、45、46、48、49、51～58、60、67、71～84、86、87、89～98、101、102、104、113または114の少なくとも1つにある、請求項2に記載のペプチド。

【請求項12】

前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、以下の位置：1、17～28、36～38、41、45、46、48、49、51～57、60、67、71～84、86、87、89～98、101、113または114の少なくとも1つにある、請求項2に記載のペプチド。

10

【請求項13】

前記ペプチドが、受容体結合に関連するアミノ酸残基の置換を含まない、請求項2に記載のペプチド。

【請求項14】

前記ペプチドが改変ペプチドを形成するために少なくとも1つの改変を含み、前記改変が前記ペプチドのアミノ酸配列を変更せず、及び、前記改変が前記ペプチドの少なくとも1つの特性を向上させる、請求項2に記載のペプチド。

20

【請求項15】

前記改変ペプチドがPEG化されている、請求項14に記載のペプチド。

【請求項16】

前記改変ペプチドが、前記ペプチドのN末端に共有結合される少なくとも1つのPEG分子を含む、請求項15に記載のペプチド。

【請求項17】

前記改変ペプチドのPEG成分が5kDa～50kDaの分子量を有する、請求項15に記載のペプチド。

【請求項18】

前記改変ペプチドのPEG成分が20kDa～40kDaの分子量を有する、請求項15に記載のペプチド。

30

【請求項19】

前記改変ペプチドのPEG成分が20kDaより大きい分子量を有する、請求項15に記載のペプチド。

【請求項20】

前記改変ペプチドのPEG成分が少なくとも30kDの分子量を有する、請求項15に記載のペプチド。

【請求項21】

前記改変ペプチドのPEG成分が少なくとも40kDの分子量を有する、請求項15に記載のペプチド。

40

【請求項22】

前記改変ペプチドがグリコシル化されている、請求項14に記載のペプチド。

【請求項23】

前記改変ペプチドがFc融合分子を含む、請求項14に記載のペプチド。

【請求項24】

前記改変ペプチドが血清アルブミンを含む、請求項14に記載のペプチド。

【請求項25】

前記改変が部位特異的である、請求項14に記載のペプチド。

【請求項26】

前記改変がリンカーを含む、請求項14に記載のペプチド。

50

## 【請求項 27】

前記改変が前記ペプチドの少なくとも1つの物理的特性を向上させる、請求項14に記載のペプチド。

## 【請求項 28】

前記物理的特性が溶解度、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び循環時間からなる群から選択される、請求項27に記載のペプチド。

## 【請求項 29】

前記改変ペプチドが成熟ヒトIL-15の活性と少なくとも同等の活性を有する、請求項14に記載のペプチド。

## 【請求項 30】

前記ペプチドが組み換えで産生される、請求項2に記載のペプチド。

10

## 【請求項 31】

配列番号3のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記ペプチドが表面露出型アミノ酸残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、前記置換が下記の効果(a)前記ペプチドの少なくとも1つの物理的特性を向上させる；(b)前記ペプチドの免疫原性に悪影響を与えない；または(c)前記ペプチドの生物活性に悪影響を与えない；のうちの少なくとも1つを有する、前記ペプチド。

## 【請求項 32】

前記ペプチドが、受容体結合に関連するアミノ酸残基の置換を含まない、請求項31に記載のペプチド。

20

## 【請求項 33】

前記置換が前記ペプチドの分子内ジスルフィド結合を破壊しない、請求項31に記載のペプチド。

## 【請求項 34】

前記少なくとも1つのアミノ酸置換が保存的置換である、請求項31に記載のペプチド。

## 【請求項 35】

前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、アミノ酸残基35、42、85及び88のうちの1つ以上での置換ではない、請求項31に記載のペプチド。

## 【請求項 36】

配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を含むペプチドであって、前記ペプチドが下記の特徴(a)配列番号3の前記ペプチドより免疫原性が大きくない；(b)配列番号3の前記ペプチドの生物活性と少なくとも同等の生物活性を有する；(c)配列番号3の前記ペプチドの少なくとも1つの物理的特性の向上を有する；のうちの少なくとも1つを有する、前記ペプチド。

30

## 【請求項 37】

前記ペプチドが少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項36に記載のペプチド。

## 【請求項 38】

前記ペプチドが少なくとも97%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項36に記載のペプチド。

40

## 【請求項 39】

前記ペプチドが少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項36に記載のペプチド。

## 【請求項 40】

前記ペプチドが少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項36に記載のペプチド。

## 【請求項 41】

前記ペプチドが少なくとも90のアミノ酸残基を有する、請求項36に記載のペプチド。

50

- 【請求項 4 2】  
前記ペプチドが少なくとも 100 のアミノ酸残基を有する、請求項 3 6 に記載のペプチド。
- 【請求項 4 3】  
前記ペプチドが少なくとも 105 のアミノ酸残基を有する、請求項 3 6 に記載のペプチド。
- 【請求項 4 4】  
前記ペプチドが少なくとも 110 のアミノ酸残基を有する、請求項 3 6 に記載のペプチド。
- 【請求項 4 5】 10  
前記ペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 1 つのアミノ酸置換、欠失または付加を含む、請求項 3 6 に記載のペプチド。
- 【請求項 4 6】  
前記ペプチドが、受容体結合に関連するアミノ酸残基の置換を含まない、請求項 4 5 に記載のペプチド。
- 【請求項 4 7】  
前記ペプチドが表面露出型アミノ酸残基の少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、請求項 4 5 に記載のペプチド。
- 【請求項 4 8】 20  
前記少なくとも 1 つの付加、欠失または置換が前記ペプチドの分子内ジスルフィド結合を破断しない、請求項 4 5 に記載のペプチド。
- 【請求項 4 9】  
前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が保存的置換である、請求項 4 5 に記載のペプチド。
- 【請求項 5 0】  
前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、アミノ酸残基 3 5、4 2、8 5 及び 8 8 のうちの 1 つ以上での置換ではない、請求項 4 5 に記載のペプチド。
- 【請求項 5 1】 30  
前記物理的特性が、溶解度、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び循環時間からなる群から選択される、請求項 3 1 または 3 6 に記載のペプチド。
- 【請求項 5 2】  
前記ペプチドが配列番号 3 の生物活性と少なくとも同等な生物活性を有し、前記生物活性が生体外アッセイまたは生体内アッセイにより決定される、請求項 3 1 または 3 6 に記載のペプチド。
- 【請求項 5 3】  
前記生体外活性が TNF 産生アッセイ、CTL L - 2 細胞増殖アッセイ、M 0 7 e 細胞増殖アッセイ、または T - 細胞 IFN 分泌アッセイのうちの少なくとも 1 つである、請求項 5 2 に記載のペプチド。
- 【請求項 5 4】 40  
前記ペプチドの免疫原性が、T 細胞エピトープまたは B 細胞エピトープの少なくとも 1 つをスクリーニングすることにより予測される、請求項 3 1 または 3 6 に記載のペプチド。
- 【請求項 5 5】  
前記スクリーニングが、インシリコスクリーニングシステムまたは生体外アッセイシステムのうちの少なくとも 1 つである、請求項 5 4 に記載のペプチド。
- 【請求項 5 6】  
前記ペプチドが改変ペプチドを産生するために少なくとも 1 つの改変を含み、前記改変が前記改変ペプチドのアミノ酸配列を変更せず、及び前記改変ペプチドが成熟ヒト IL - 1 5 の活性と少なくとも同等な活性を有する、請求項 3 1 または 3 6 に記載の前記ペプチド。 50

- 【請求項 57】  
前記改変ペプチドが PEG 化されている、請求項 56 に記載のペプチド。
- 【請求項 58】  
前記改変ペプチドが、前記ペプチドの N 末端に共有結合される少なくとも 1 つの PEG 分子を含む、請求項 57 に記載のペプチド。
- 【請求項 59】  
前記改変ペプチドの PEG 成分が 5 kDa ~ 50 kDa の分子量を有する、請求項 57 に記載のペプチド。
- 【請求項 60】  
前記改変ペプチドの PEG 成分が 20 kDa ~ 40 kDa の分子量を有する、請求項 57 に記載のペプチド。 10
- 【請求項 61】  
前記改変ペプチドの PEG 成分が 20 kDa より大きい分子量を有する、請求項 57 に記載のペプチド。
- 【請求項 62】  
前記改変ペプチドの PEG 成分が少なくとも 30 kD の分子量を有する、請求項 57 に記載のペプチド。
- 【請求項 63】  
前記改変ペプチドの PEG 成分が少なくとも 40 kD の分子量を有する、請求項 57 に記載のペプチド。 20
- 【請求項 64】  
前記改変ペプチドがグリコシル化されている、請求項 56 に記載のペプチド。
- 【請求項 65】  
前記改変ペプチドが Fc 融合分子を含む、請求項 56 に記載のペプチド。
- 【請求項 66】  
前記改変ペプチドが血清アルブミンを含む、請求項 56 に記載のペプチド。
- 【請求項 67】  
前記改変が部位特異的である、請求項 56 に記載のペプチド。
- 【請求項 68】  
前記改変がリンカーを含む、請求項 56 に記載のペプチド。 30
- 【請求項 69】  
前記改変が前記ペプチドの少なくとも 1 つの物理的特性を向上させる、請求項 56 に記載のペプチド。
- 【請求項 70】  
前記物理的特性が溶解度、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び循環時間からなる群から選択される、請求項 69 に記載のペプチド。
- 【請求項 71】  
前記改変ペプチドが成熟ヒト IL - 15 の活性と少なくとも同等の活性を有する、請求項 56 に記載のペプチド。
- 【請求項 72】  
前記ペプチドが組み換えで産生される、請求項 2 に記載のペプチド。 40
- 【請求項 73】  
前記ペプチドが組み換えで産生される、請求項 31 または 36 に記載のペプチド。
- 【請求項 74】  
請求項 1、2、31 または 36 に記載のペプチドをコード化する核酸分子。
- 【請求項 75】  
前記核酸分子が、生体外、細胞内または生体内の前記ペプチドをコード化する核酸分子の発現を与える発現制御要素に操作可能に連結されている、請求項 74 に記載の核酸分子。
- 【請求項 76】  
50

請求項 7 5 に記載の前記核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 7 7】

前記ベクターがウイルスベクターを含む、請求項 7 6 に記載のベクター。

【請求項 7 8】

請求項 1、2、3 1 もしくは 3 6 に記載のペプチドを発現させる、形質転換細胞または宿主細胞。

【請求項 7 9】

請求項 1、2、3 1 または 3 6 に記載のペプチド、及び薬学的に許容さえる希釈剤、担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 8 0】

前記賦形剤が等張性の注射液である、請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 1】

前記医薬組成物がヒトへの投与に好適である、請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 2】

少なくとも 1 つの追加の予防剤または治療剤を更に含む、請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 3】

請求項 7 9 に記載の前記医薬組成物を含む、滅菌容器。

【請求項 8 4】

前記滅菌容器が注射器である、請求項 8 3 に記載の滅菌容器。

【請求項 8 5】

請求項 8 4 に記載の前記滅菌容器を含む、キット。

【請求項 8 6】

少なくとも 1 つの追加の予防剤または治療剤を含む第 2 の滅菌容器を更に含む、請求項 8 6 に記載のキット。

【請求項 8 7】

請求項 1、2、3 1 または 3 6 に記載の前記ペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 8 8】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 8 9】

前記抗体が、別々のポリペプチド中に存在する、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含む、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 9 0】

前記抗体が、単一のポリペプチド中に存在する、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含む、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 9 1】

前記抗体が重鎖定常領域を含み、前記重鎖定常領域が I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 のアイソタイプである、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 9 2】

前記抗体が検出可能に標識化される、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 9 3】

前記抗体が、F v、s c F v、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、または F a b ' である、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 9 4】

前記抗体がヒト抗体である、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 9 5】

前記抗体が約  $10^7 \text{ M}^{-1}$  ~ 約  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  の親和性で前記ペプチドと結合する、請求項 8 7 に記載の抗体。

【請求項 9 6】

前記抗体が、脂質部分、脂肪酸部分、多糖類部分、及び炭水化物部分から選択される共

10

20

30

40

50

有結合部分を含む、請求項 87 に記載の抗体。

【請求項 97】

前記抗体が親和性ドメインを含む、請求項 87 に記載の抗体。

【請求項 98】

前記抗体が固相担体に不動化される、請求項 87 に記載の抗体。

【請求項 99】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 87 に記載の抗体。

【請求項 100】

前記抗体が単鎖 Fv (scFv) 抗体である、請求項 87 に記載の抗体。

【請求項 101】

前記 scFv が多量体化されている、請求項 100 に記載の抗体。

【請求項 102】

前記抗体が共有結合した非ペプチドポリマーを含む、請求項 87 に記載の抗体。

【請求項 103】

前記ポリマーがポリ(エチレングリコール)ポリマーである、請求項 102 に記載の抗体。

【請求項 104】

請求項 87 に記載の抗体、及び薬学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 105】

前記賦形剤が等張性の注射液である、請求項 104 に記載の医薬組成物。

【請求項 106】

前記医薬組成物がヒトへの投与に好適である、請求項 104 に記載の医薬組成物。

【請求項 107】

少なくとも 1 つの追加の予防剤または治療剤を更に含む、請求項 104 に記載の薬学的組成物。

【請求項 108】

請求項 104 に記載の前記医薬組成物を含む、滅菌容器。

【請求項 109】

前記滅菌容器が注射器である、請求項 108 に記載の滅菌容器。

【請求項 110】

請求項 109 に記載の前記滅菌容器を含む、キット。

【請求項 111】

第 2 の治療剤を含む第 2 の滅菌容器を更に含む、請求項 110 に記載のキット。

【請求項 112】

治療に有効な量の請求項 2、31 もしくは 36 に記載のペプチドを対象に投与することを含む、対象の疾患、障害もしくは状態を治療し、または予防する方法。

【請求項 113】

前記疾患、障害または状態が増殖性疾患である、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 114】

前記増殖性疾患が癌である、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

前記癌が固形腫瘍または血液障害である、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

前記疾患、障害または状態が免疫性または炎症性障害である、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 117】

前記免疫性または炎症性障害が、炎症性腸疾患、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、及びアルツハイマー病からなる群から選択される、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

10

20

30

40

50



前記疾患、障害または状態がウイルス性障害である、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記ウイルス性障害が、ヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、及びサイトメガロウイルスからなる群から選択される、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記対象がヒトである、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記投与が非経口注射によるものである、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記非経口注射が皮下で行われる、請求項 1 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 3】

少なくとも 1 つの追加の予防剤または治療剤を投与することを更に含む、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

配列番号 3 の前記アミノ酸配列を含むペプチドであって、前記ペプチドが以下の位置：1、3、13～15、17～29、33、34、36～39、41、45、48、49、51～58、60、67、71～84、86、87、89～98、101、102、104、113または114の1つで、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、前記ペプチド。

【請求項 1 2 5】

前記ペプチドが、以下の位置：1、3、13～15、17～25、27～29、33、34、36～39、41、45、46、48、49、51～58、60、67、71～84、86、87、89～98、101、102、104、113または114で前記少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてチロシンの置換を含む、請求項 1 2 4 に記載のペプチド。

20

【請求項 1 2 6】

前記ペプチドが、以下の位置：1、3、13～15、17～25、27～29、33、34、36～39、45、48、49、51～56、58、60、67、72～84、86、87、89～98、101、102、104、113または114で前記少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてシステインの置換を含む、請求項 1 2 4 に記載のペプチド。

30

【請求項 1 2 7】

前記ペプチドが、以下の位置：1、13～15、17～22、27～29、34、36、48、49、51～58、60、72～82、84、87、89～98、102または104で前記少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてN-X-Sグリコシル化モチーフの置換を含み、

前記N-X-Sグリコシル化モチーフのアスパラギンが前記アミノ酸の位置を表す、請求項 1 2 4 に記載のペプチド。

【請求項 1 2 8】

前記ペプチドが、以下の位置：1、13～15、17～22、29、34、36、48、49、51～58、60、71～78、80～82、84、87、89～98または102で少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてN-X-Tグリコシル化モチーフの置換を含み、

40

前記N-X-Tグリコシル化モチーフのアスパラギンが前記アミノ酸の位置を表す、請求項 1 2 4 に記載のペプチド。

【請求項 1 2 9】

請求項 1 2 4～1 2 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと、薬学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 3 0】

請求項 1 2 9 に記載の前記医薬組成物を含む、滅菌容器。

【請求項 1 3 1】

50

請求項 130 に記載の前記滅菌容器を含む、キット。

【請求項 132】

治療に有効な量の請求項 124 ~ 128 に記載のペプチドを対象に投与することを含む、対象の疾患、障害もしくは状態を治療し、または予防する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年10月14日出願の米国特許仮出願第62/063,784号の優先権を主張し、その全体を参照により本明細書に組み込む。

10

【0002】

本発明は特に、インターロイキン-15 ムテイン及び他のインターロイキン-15 関連分子、これらの改変物、及びその関連する使用に関する。

【0003】

はじめに

インターロイキン-15 (IL-15) は、サイトカイン活性、サイトカイン分泌、NK 細胞の増殖及び生存、CD8+メモリーT細胞及びナイーブCD8+細胞の刺激に関連するサイトカインである (Fehniger, et al., J Immunol 162: 4511-20 (1999) 参照)。多面発現性サイトカインとして、それは自然及び獲得免疫で重要な役割を果たす (Lodolce, et al., Cytokine Growth Factor Rev 13(6): 429-39 (December 2002) 及び Alves, et al., Blood 102: 2541-46 (2003) を参照)。

20

【0004】

IL-15 は、マクロファージ、単球、樹枝細胞及び線維芽細胞を含む、多数の細胞型によって構成的に発現される (Grabstein, et al., Science 264(5161): 965-68 (May 1994))。IL-15 の発現は、例えばサイトカイン (例えば GM-CSF)、2本鎖 mRNA、非メチル化 CpG オリゴヌクレオチド、Toll 様受容体によるリポ多糖体、及びインターフェロン (例えば IFN-) によって、または例えばヘルペスウイルス、ヒト型結核菌及びカンジダアルビカンスによる単球の感染後、刺激されることができ (Bamford, et al., J Immunol 160(9): 4418-26 (May 1998))。

30

【0005】

IL-15 は、T細胞及びNK細胞上の特定の受容体複合体と結合する。IL-15 及び IL-15R は活性化樹枝細胞及び単球で共発現して、ならびに IL-15 は IL-15R を有する複合体で機能する (Bergamaschi, et al. J Biol Chem 283: 4189-99 (2008))。IL-15/IL-15R は、T細胞とNK細胞-IL-2R (IL-15R ; CD 122とも称される) と c (IL-2RG ; CD132 ; -c ; 通常は鎖) 分子上の2つの鎖に、ヘテロ二量体として結合する。及び c鎖は IL-2 と IL-15 の間で共有され、これらのサイトカインのシグナル伝達にとって重要である (Giri et al., EMBO J. 13: 2822-30 (1994) and Giri et al., EMBO J. 14: 3654-3663 (1995))。

40

【0006】

IL-2/IL-15 c 受容体複合体を共有することと同様に、IL-15 は、生体外で IL-2 のものと類似の多くの機能を伝達することを示した。それらは多くの生物活性を共有して、Tリンパ球の残存への類似の寄与を示す (Waldmannら, Annu Rev Immunol 17: 19-49 (1999) を参照)。例えばそれらの異なる産生部位、それぞれ IL-2 及び IL-15R と称される膜受容タンパク質と関連するそれらの強さ、ならびにこれらの余分な受容分子の調整により、IL-2 と IL-

50

15の間の生物学的差異があり得ると考えられる。IL-2及びIL-15は、CD8+メモリ細胞の数を調整する役割を果たす。

【0007】

例えば特定のウイルス性障害及び癌状態を含む多くの疾患、障害ならびに状態にIL-15が関係しているという事実にもかかわらず、IL-15関連薬剤は、現在市販品として入手可能でない。したがって安全かつ有効なIL-15薬剤は、これまで満たされていない医学ニーズに対応しようとする。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、IL-15組成物及びその使用に関する。用語「IL-15」、「IL-15ポリペプチド(複数を含む)」、「IL-15剤(複数を含む)」、「IL-15分子(複数を含む)」などは、幅広く解釈されることを目的としており、例えばヒト及び非ヒトIL-15関連の同族体、変異体(ムテインを含む)及びそのフラグメントを含むポリペプチド、ならびに例えばリーダー配列(例えば、シグナルペプチド)を有するIL-15ポリペプチドを含む。特定の実施形態は、前述の改変に関する。特定の実施形態において、改変(複数を含む)は、そのペプチドの改変されていないバージョンと比較して、ペプチドの少なくとも1つの特性または特徴(例えば半減期、有効性)を向上させる。特定の実施形態では、別の特徴(複数を含む)(例えば、半減期などの薬物動態学的パラメータ)を強化する場合、改変(複数を含む)は生物活性の減少をもたらす、少なくとも治療学的展望から一般的により有益な、改変されたIL-15分子をもたらす。

【0009】

本開示の更なる実施形態は、本明細書に記載の方法に従って改変することができるIL-15の特定のアミノ酸残基またはドメインを同定するための方法及び他の技術に関する。本明細書に記載のペプチドを使用し(例えば障害もしくはその症状の治療または予防に)、同定し及び/または生成する方法も、本開示の態様である。他の態様は、例えばペプチドを含む医薬組成物を含む。

【0010】

成熟ヒトIL-15は、114アミノ酸の単量体ポリペプチドである。2つの転写物が報告されており、1つは、48アミノ酸シグナルペプチド(長いシグナルペプチド、LSP)(図1A、配列番号1)によるものであり、もう1つは21アミノ酸シグナルペプチド(短いシグナルペプチド、SSP)(図1B、配列番号2)によるものであり、その両方は同じ成熟タンパク質を産生する(図1C、配列番号3)。本明細書に記載するように、成熟ヒトIL-15は、3つの異なるアミノ酸セグメント(A/Bループ、B/Cターン及びC/Dループ)により連結される4つのヘリックス(A~D)を含むと記載される。これらのアミノ酸セグメントは、ヘリックス間接合(複数を含む)とも称される。

【0011】

変異させる及び/もしくは改変させることができる、またはそれができない、IL-15ヘリックスならびにヘリックス間接合のアミノ酸残基ならびに領域を、以下に論じる。一例として、IL-15の三次元コア内に埋もれたまたは受容体結合に関連するアミノ酸残基及び領域は、一般的には改変の候補ではない。

【0012】

本開示は、PEGまたは他の部分(例えば血清アルブミン)と少なくとも1つのアミノ酸残基への付着を容易にする置換を含む、ペプチドを想定する。そのようなペプチドの例を、以下に詳細に記載する。

【0013】

本明細書に記載のIL-15ペプチドの免疫原性を評価するための方法を、本明細書に記載する。更に別の実施形態では、改変されたペプチドは、少なくとも1つの特性(例えば、溶解度、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び循環時間を含む物理的特性)の改善を有する。このような特性を、更に以下に記載する。本開示の特定の実施形態では、変

10

20

30

40

50

異IL-15または改変IL-15ペプチドは、対応する非改変IL-15ペプチドよりも免疫原性が低い（すなわち、少ない免疫反応を刺激する）。他の実施形態において、改変IL-15ペプチドは、対応する非改変IL-15ペプチドよりも免疫原性で中性である（すなわち、免疫原性は治療に関連する方法では変更されない）。

【0014】

本開示は、図1Cのアミノ酸配列（配列番号3）を含むペプチドを想定しており、前記ペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失または付加を含み、前記の置換（複数を含む）、欠失（複数を含む）または付加（複数を含む）は、例えば溶解度もしくは免疫原性に悪影響を与えない。本発明は、また、配列番号3のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するペプチドを意図し、ペプチドは、a)配列番号3のペプチドと比較して、改善された少なくとも1つの特性（例えば、溶解度、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び循環時間を含む物理的特性）を有し、ならびに/またはb)配列番号3のペプチドより免疫原性が大きくなく、ならびに/またはc)配列番号3のペプチドの生物活性に少なくとも等しい生物活性を有する。

10

【0015】

異なる方法論の利用（例えばIL-15の正確な濃度を定量化する異なる方法及び/またはIL-15を産生する異なる方法）は、多少活性なIL-15-タンパク質濃度の計算の差異に起因する見かけの活性または実際の活性のいずれかでも-をもたらしことができることは、当業者には明らかであろう。スキルと経験を活かして、当業者は、IL-15分子対hIL-15の相対的な生物活性を決定する際、これらの差異を考慮することができる。いくつかの実施形態において、このようなIL-15分子は、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100、少なくとも101、少なくとも102、少なくとも103、少なくとも104、少なくとも105、少なくとも106、少なくとも107、少なくとも108、少なくとも109、少なくとも110、少なくとも111、少なくとも112、または少なくとも113つのアミノ酸残基を有する。

20

【0016】

いくつかの実施形態において、上述のペプチドのアミノ酸残基の付加（複数を含む）、欠失（複数を含む）または置換（複数を含む）は、ペプチドの分子内ジスルフィド結合を破壊しない。しかし、そのような付加（複数を含む）、欠失（複数を含む）または置換（複数を含む）はおそらく1つ以上の分子間の非共有結合（例えば、水素結合）を破断させるかもしれないが、このような破断は、タンパク質機能で治療的に関連する影響を有することは望ましくないという点に留意すべきである。本開示の教示に従って、特定の実施形態において、アミノ酸置換は保存的置換でもよく、他の特定の実施形態において、アミノ酸置換は非保存的置換であり得る。

30

【0017】

特定の実施形態において、本開示は、配列番号3の生物活性に少なくとも等しい生物活性を有するペプチドを想定する。生物活性は、ケモカイン放出アッセイ、TNF阻害アッセイ、CTL-2細胞増殖アッセイ、M07e細胞増殖アッセイまたはT-細胞IFN分泌アッセイを含む、当該技術分野において既知の任意の方法により決定することができる。T-細胞のスクリーニングは、CD4+細胞、CD8+細胞またはNK細胞を使用して実行可能である。当業者はこのようなアッセイを熟知しており、そのいくつかの代表的なプロトコルは本明細書に記載されている。同様にペプチドの免疫原性は、T細胞エピトープまたはB細胞エピトープのうち少なくとも1つをスクリーニングすることによる予測を含む、当業者に既知の任意の方法により予測または決定することができる。一態様では、免疫原性は、インシリコシステム及び/または生体外アッセイシステムにより予測される。

40

50

## 【0018】

本開示は更に配列番号3のアミノ酸配列を含むペプチドを想定しており、ペプチドは表面露出アミノ酸残基のうちの少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、ならびに置換は生物活性、免疫原性及び/または別の性質または特徴に悪影響を与えない。特定の実施形態において、これらのペプチドは更に、受容体結合に関連する任意のアミノ酸残基の置換を含まない。しかし、許容され得るIL-15受容体結合領域内もしくはそれに近接する1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失及び/または付加は、本開示により意図されることを理解すべきである。

## 【0019】

本明細書の他に詳述され、かつ図3で示されるように、成熟hIL-15は、a)ヘリックスA(アミノ酸残基1~17)、b)A/Bヘリックス間接合(A/Bループ)(アミノ酸残基18~31)、c)ヘリックスB(アミノ酸残基32~53)、d)B/Cヘリックス間接合(B/Cターン)(アミノ酸残基54~57)、e)ヘリックスC(アミノ酸残基58~77)、f)C/Dヘリックス間接合(C/Dループ)(アミノ酸残基78~96)、及びg)ヘリックスD(アミノ酸残基97~114)を含む。いくつかの実施形態において、本開示はa)ヘリックスA、b)A/Bヘリックス間接合、c)ヘリックスB、d)B/Cヘリックス間接合、e)ヘリックスC、f)C/Dヘリックス間接合、及びg)ヘリックスDを含むペプチドを想定しており、このようなペプチドは更に、i)アミノ酸残基2(W)、4~12(NVISDLKKI;配列番号37)もしくは16(I)以外のヘリックスAのうちの少なくとも1つのアミノ酸残基の置換;またはii)アミノ酸残基30(D)もしくは31(V)以外のA/Bヘリックス間接合のうちの少なくとも1つのアミノ酸残基の置換;またはiii)アミノ酸残基32(H)、35(C)、40(M)、42~44(CFL)、47(L)もしくは50(I)以外のヘリックスBのうちの少なくとも1つのアミノ酸残基の置換;またはiv)B/Cヘリックス間接合のうちの少なくとも1つのアミノ酸残基の置換;またはv)アミノ酸残基59(I)、61~66(DTVENL;配列番号38)もしくは68~70(ILA)以外のヘリックスCのうちの少なくとも1つのアミノ酸残基の置換;またはvi)アミノ酸残基85(C)もしくは88(C)以外のC/Dヘリックス間接合のうちの少なくとも1つのアミノ酸残基の置換;またはvii)アミノ酸残基99(F)、100(L)、103(F)もしくは105~112(HIVQMFIN;配列番号39)以外のヘリックスDの少なくとも1つのアミノ酸残基の置換;のうちの少なくとも1つを含む。

## 【0020】

前項に記載されているペプチドを参照すると、特定の実施形態において本開示はペプチドを想定しており、少なくとも1つのアミノ酸置換は以下の領域:13~15、17~29、36~39、51~58、71~84または89~98のうちの少なくとも1つにある。他の実施形態において、記少なくとも1つのアミノ酸置換は以下の領域:17~28、36~38、51~57、71~84または89~98のうちの少なくとも1つにある。更に別の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、以下の位置:1、3、13~15、17~29、33、34、36~39、41、45、46、48、49、51~58、60、67、71~84、86、87、89~98、101、102、104、113または114の少なくとも1つにある。特定の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、以下の位置:1、17~28、36~38、41、45、46、48、49、51~57、60、67、71~84、86、87、89~98、101、113または114の少なくとも1つにある。

## 【0021】

体系的アプローチを用いて、上述の同定された残基は、アンカーをPEG及び/または他の改変に提供できるアミノ酸を導入するために置換された。本開示の特定の実施形態では、システイン、チロシン及びN-グリコシル化部位(N-X-S及びN-X-Tモチーフ)は、このような置換の候補として以前に同定した残基のそれぞれと置換した。以下に詳細に記載しかつ図6にまとめるように前記結果は、有利なIL-15ムテインの生成に

10

20

30

40

50

関して、当業者に特定のガイダンスを提供する。

【0022】

本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載のペプチドの改変（複数を含む）を意図しており、改変（複数を含む）はペプチドのアミノ酸配列を変更せず（すなわちアミノ酸の置換、付加または欠失はIL-15の一次アミノ酸配列内に導入されない）、改変（複数を含む）は、非改変バージョンのペプチドと比較して、ペプチドの少なくとも1つの特性もしくは他の特徴（例えば、薬物動態パラメータまたは有効性）を改善または強化する。

【0023】

本開示は、有益となり得る任意の改変の導入を想定することができる。したがって特定の実施形態において、改変は、ペプチドの少なくとも1つの物理的特性（例えば溶解度、10  
バイオアベイラビリティ、血清半減期及び循環時間）を改善する。他の改変は、受容体切断を遮断し、IL-15受容体（複数を含む）に対する親和性を増大させる手段を導入すること（すなわち、IL-15分子が長期間、受容体（複数を含む）とドッキングするようにオフ速度を改変すること）を含む。更に別の実施形態では、IL-15ペプチドの改変は、治療的に関連する免疫原性のレベルに有害な影響を引き起こさず、他の更なる実施形態では、改変したIL-15は非改変IL-15よりも免疫原性が低くなる。

【0024】

いくつかの実施形態では、改変はPEG化であり、改変ペプチドはPEG-IL-15である。PEG化ペプチドは、IL-15の少なくとも1つのアミノ酸残基に共有結合した、少なくとも1つのPEG分子を含んでもよい（例えばN末端またはC末端PEG化）20  
。PEG分子は、リンカーを介してIL-15に共役させることができ、リンカーは以下に詳細に記載する。いくつかの実施形態において、IL-15の2つ以上の異なる部位は、1つ以上の変異を導入し、その後それらの各々を改変することにより、改変されるかもしれない（例えばPEG化）。更なる実施形態でN末端は、1つ以上の変異体の導入及びその改変（例えばPEG化）と組み合わせて、IL-15タンパク質内の他の箇所でも改変されることができる（例えばPEG化）。更に別の実施形態で、C末端は、1つ以上の変異体の導入及びその改変（例えばPEG化）と組み合わせて、IL-15タンパク質内の他の箇所でも改変されることができる（例えばPEG化）。IL-15のチロシン26は、N末端のPEG化と組み合わせて改変されることができる（例えばPEG化）。追加の実施形態において、IL-15ペプチドは、N末端及びC末端で改変を含むことができる（例30  
例えばPEG化）。代表的なPEG化条件を本明細書に記載する。更なる実施形態でN末端は、1つ以上の変異体の導入及びその改変（例えばPEG化）と組み合わせて、IL-15タンパク質内の他の箇所でも改変されることができる（例えばPEG化）。PEG成分はペプチドにより許容される任意のPEGであり得る。IL-15の比較的小さなサイズが故に、PEGの分子量は、他の多くのタンパク質治療用として用いるものより大きい。一例として、改変ペプチドのPEG成分は、いくつかの実施形態において5kDa~20kDaの分子量を有し；他の実施形態において20kDa超の分子量を有し；特定の実施形態において25kDa超の分子量を有し；また他の実施形態において30kDa超の分子量を有し；更に他の実施形態において35kDa超の分子量を有し；または他の実施形態において40kDa超の分子量を有する。特定の実施形態において、PEGは20~40kDa40  
aの間の分子量を有する。他の分子量値を有するPEGは、本明細書に記載される。

【0025】

本開示は、非改変ペプチドの特性の改善（例えば、マスキング）を含む、望ましい特性を付与するペプチドに対する任意の改変を想定する。いくつかの実施形態で、改変ペプチドは、Fc融合分子；HSA融合分子またはアルブミン共役体の形態であり得る、血清アルブミン（例えば、HSAもしくはBSA）；またはアルブミン結合ドメインを含む。改変ペプチドは、グリコシル化またはHES化されてもよい。前述の詳細な記述は、本開示内の他の箇所でも説明される。

【0026】

特定の実施形態では、改変は部位特異的である。更なる実施形態では、改変はリンカー

10

20

30

40

50

を含む。いくつかの改変されたIL-15分子は、1種類より多い改変を含むことができる。本明細書に記載の改変の種類とIL-15ペプチドへのそのような改変を導入する方法は限定されず、当業者は他のそのような改変及び方法を想定することができる。

【0027】

本明細書に記載のペプチドは、組み換えにより産生してもよい。本開示はペプチドをコード化する核酸分子を意図し、核酸分子は、生体外で、細胞内でまたは生体内でペプチドをコード化する核酸分子の発現を与える、発現制御要素に操作可能に連結できる。ベクター（例えばウイルスベクター）は、そのような核酸分子を含んでもよい。更なる実施形態で、本明細書に記載のペプチドを発現する形質転換された細胞または宿主細胞を説明する。

10

【0028】

本開示は、本明細書の教示と併せて遺伝子治療の使用も意図する。遺伝子治療の使用及び方法のために、対象の細胞は、生体内で本明細書に記載のIL-15関連ポリペプチドをコード化する核酸で形質転換することができる。あるいは細胞は、導入遺伝子またはポリヌクレオチドで生体外で形質転換し、その後治療を行うために対象の組織内に移植することができる。更に初代細胞分離株または株化細胞株は、IL-15関連ポリペプチドをコード化する導入遺伝子またはポリヌクレオチドで形質転換することができ、その後場合により対象の組織内に移植できる。

【0029】

本開示のペプチドは、本明細書に記載するように、少なくとも1つの変異体の導入によって産生する、少なくとも1つの新規なエピトープを含むことができる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの新規なエピトープは、抗体（例えば、アゴニスト抗体）に（特異的にまたは非特異的に）結合する。更なる実施例において、抗体（例えば、アゴニスト抗体）の効果は、IL-15受容体によるIL-15活性化を模倣する。

20

【0030】

抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得て、例えばヒトまたはヒト化であってもよい。実施形態は、別個のポリペプチドにまたは単一ポリペプチドに存在する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む抗体、または例えばIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4同位体である重鎖定常領域を含む抗体を含む。抗体は、例えばFv、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>もしくはFab'抗体でもよく、または単鎖Fv(scFv)抗体でもよい（多量体化され得る）。

30

【0031】

更なる実施形態において、本開示の抗体は、約 $10^7 M^{-1}$  ~ 約 $10^{12} M^{-1}$ の親和性でペプチドに結合する。抗体は、脂質部分、脂肪酸部分、多糖類部分及び炭水化物部分から選択される共有結合部分を含んでもよい。実施形態は更に、抗体が親和性ドメインを含み、固相担体上に不動化してもよく、共有結合したまたは検出可能に標識化した非ペプチドポリマー（例えば、ポリ（エチレン）グリコールポリマー）を含むことを想定している。

【0032】

本開示は、本明細書に記載のペプチドまたは抗体、及び薬学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤を含む医薬組成物を包含する。いくつかの実施形態では、賦形剤は等張性の注射液である。医薬組成物は対象（例えば、ヒト）への投与に適切であり得て、1つ以上の追加の予防剤または治療剤を含んでもよい。特定の実施形態において、医薬組成物は滅菌容器（例えば、単回または複数回使用のバイアルまたは注射器）内に収容される。キットは滅菌容器（複数を含む）を含んでもよく、キットは更に、少なくとも1つの追加の予防剤もしくは治療剤、もしくは薬物治療で使用することができる任意の他の薬剤を含む、1つ以上の追加の滅菌容器を含むことができる。このような態様の例は、本明細書に記載される。

40

【0033】

本開示の追加の実施形態は、本明細書に記載のペプチドの治療に有効な量を投与するこ

50

とを含む、対象（例えばヒト）の疾患、障害または状態を治療し、予防する方法を含む。更なる実施形態は、本明細書に記載の抗体の治療に有効な量を投与することを含む、対象（例えばヒト）の疾患、障害または状態を治療し、予防する方法を含む。本開示の様々な実施形態において、疾患、障害または状態は、癌または癌関連の疾患（例えば、固形腫瘍または血液障害）を含む増殖性疾患；免疫性または炎症性疾患（例えば、炎症性腸疾患、乾癬、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、多発性硬化症、及びアルツハイマー病）；ウイルス性障害（例えばヒト免疫不全ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、及びサイトメガロウイルス）である。

【0034】

疾患、障害もしくは状態を治療し、または予防する方法において、本明細書に記載のペプチド（または抗体）の治療に有効な量を投与することは、非経口（例えば、皮下に）注入を含むペプチド（または抗体）のための任意の適切な経路によるものであってもよい。1つ以上の追加の予防剤または治療剤は、ペプチド（または抗体）と共に（例えば、前に、同時にまたはそれに続けて）投与されてもよい、及び/または、それはペプチド（または抗体）から分離して、または組み合わせて投与してもよい。

10

【0035】

本開示の追加の実施形態は、配列番号3の前記アミノ酸配列を含み、ペプチドは以下の位置：1、3、13～15、17～29、33、34、36～39、41、45、48、49、51～58、60、67、71～84、86、87、89～98、101、102、104、113または114の1つで、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは以下の位置：1、3、13～15、17～25、27～29、33、34、36～39、41、45、48、49、51～58、60、67、71～84、86、87、89～98、101、102、104、113または114で少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてチロシンの置換を含む。他の実施形態において、ペプチドは以下の位置：1、3、13～15、17～25、27～29、33、34、36～39、45、48、49、51～56、58、60、67、72～84、86、87、89～98、101、102、104、113または114で少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてシステインの置換を含む。更なる実施形態では、ペプチドは以下の位置：1、13～15、17～22、27～29、34、36、48、49、51～58、60、72～82、84、87、89～98、102または104で少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてN-X-Sグリコシル化モチーフの置換を含み、N-X-Sグリコシル化モチーフのアスパラギンはアミノ酸の位置を表す。更に別の実施形態では、ペプチドは以下の位置：1、13～15、17～22、29、34、36、48、49、51～58、60、71～78、80～82、84、87、89～98または102で少なくとも1つのアミノ酸残基に代えてN-X-Tグリコシル化モチーフの置換を含み、N-X-Tグリコシル化モチーフのアスパラギンは前記アミノ酸の位置を表す。

20

30

【0036】

本開示は、本明細書に開示されるすべての実施形態の構成要素などとして共に使用される、前項に記載されているペプチドを想定する。一例として特定の実施形態において、本開示は、前項に記載されているペプチドを含む、医薬組成物、滅菌容器及びキットを含む。他の実施形態において、前項に記載されているペプチドの治療に有効な量は、本明細書に記載されるように、疾患、障害もしくは状態を治療する、または予防するために対象に与えることができる。

40

【0037】

本開示の他の態様は、本明細書に記載される教示を検討すれば当業者には明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1A】IL-15の長いシグナルペプチド（LSP）タンパク質（162アミノ酸残基；配列番号1）を示す。シグナルペプチド（下線）は残基1～48を含む。

50



【図1B】IL-15の短いシグナルペプチド(SSP)タンパク質(135アミノ酸残基;配列番号2)を示す。シグナルペプチド(下線)は残基1~21を含む。

【図1C】成熟ヒトIL-15(114アミノ酸残基)(配列番号3)を示す。

【図2A】長いシグナルペプチド(LSP)cDNAオープンリーディングフレーム(ORF)を示す(162アミノ酸残基をコード化する489塩基対(配列番号4))。シグナルペプチド(下線)は、最初の48アミノ酸をコード化する塩基対1~144を含む。

【図2B】短いシグナルペプチド(SSP)cDNAオープンリーディングフレーム(ORF)を示す(135アミノ酸残基をコード化する408塩基対(配列番号5))。シグナルペプチド(下線)は、最初の21アミノ酸をコード化する塩基対1~63を含む。

【図2C】成熟ヒトIL-15タンパク質をコード化する核酸配列を示す(114アミノ酸残基をコード化する345塩基対(配列番号6))。

【図3】ヘリックスA~D及びヘリックス間接合に対応する領域を示す、成熟hIL-15アミノ酸配列(配列番号3)を示す。

【図4A】IL-15受容体のシグナル伝達複合体(PDB 4GS7);IL2/15R、IL15R、共通鎖及びIL-15のタンパク質結晶構造のリボン表示(平面図)である(ヘリックス及びヘリックス内構造は標示される)。

【図4B】IL-15受容体のシグナル伝達複合体(PDB 4GS7);IL2/15R、IL15R、共通鎖及びIL-15のタンパク質結晶構造のリボン表示(側面図)である(ヘリックス及びヘリックス内構造は標示される)。

【図5】どの残基がPEG化の可能性のある部位を表すかを示す、成熟ヒトIL-15アミノ酸配列を表す(配列番号:3)。「+」は残基が可能性のある部位であることを示し、「-」は残基が可能性のない部位であることを示し、「+/-」は残基が可能性のある部位であり得ることを示す。

【図6】図6A~6Bは、どのアミノ酸残基が、チロシンもしくはシステインとの置換により、またはN-グリコシル化モチーフ(N-X-SもしくはN-X-T)の生成によりPEG化の可能性のある部位を表すかを示す、成熟ヒトIL-15アミノ酸配列を示す(配列番号3)。薄灰色のセルは、PEG化の可能性のある部位として図5に示される残基を表しており、「+」は、その位置に挿入される変異体が活性アッセイで活性であったことを示し、その一方で空の薄灰色のセルは、その位置に挿入される変異体が活性を示さなかった、または検出可能なレベルで発現することができなかったことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本開示を更に説明する前に、本開示が本明細書に記載された特定の実施形態に限定されるものではなく、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、限定することを意図するものではないことを理解すべきである。

【0040】

値の範囲が提供される場合、上限と下限の間で明記した任意の値、または介在値で、文脈が明確に指示しない限り、下限値の単位の10分の1までその各々の値に含まれることは、本発明に包含されると理解されるであろう。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、表示範囲内の任意の具体的に除外された値に従って本発明内にも包含される。表示範囲がそれらの上限値及び下限値のうちの1つまたは両方を含む場合、それらの包含される上限値及び下限値のいずれかまたは両方を除外する範囲も本発明に包含される。別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。

【0041】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、他に明記されない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は複数の指示物を含むことに留意しなければならない。特許請求の範囲が任意の要素を除外するように作成されてもよいことに更に留意する。したがって本記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連した「単に」、「のみ」な

10

20

30

40

50

どの排他的な専門用語の使用において、または「否定的な」限定の使用において、先行詞として機能することを目的としている。

【0042】

本明細書で示す出版物は、本出願の出願日前のその開示のためだけに提供される。更に提供される出版物の日付は実際の出版日とは異なる場合があり、それぞれ確認する必要がある。

【0043】

概略

本開示は、変異IL-15分子（例えば、ムテイン）及び他のIL-15関連分子、ならびにその同定及びその使用の方法を意図する。本明細書に記載されるように、IL-15は、例えば半減期の延長を含む天然型ヒトIL-15の特性を増強するように改変することができる。改変は、PEG化、ならびにアルブミン（例えばHSA）及びFcとの融合を含む。特定のIL-15分子は、ヒトIL-15と同等の免疫原性、ならびに/またはヒトIL-15と少なくとも同等の生物活性、ならびに/または少なくとも1つの特性（例えば溶解度、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び循環時間などの物理的特性）の改善を有する。当業者は、そのような分子が、例えば非常に長い半減期である故に、有効な治療剤であり得ると理解している。本明細書に記載のIL-15分子及びその組成物（例えば、医薬組成物）は、例えば炎症性及び免疫関連疾患ならびに癌及び癌関連障害を含む、様々な疾患、障害及び状態ならびに/またはその症状を、治療するならびに/または予防するために使用してもよい。

10

20

【0044】

本開示のポリペプチド及び核酸分子に関連する「ヒト」へのいかなる言及も、ポリペプチドまたは核酸が得られる方法または供給源に関して限定することを意図したのではなく、むしろそれは天然起源のヒトポリペプチドまたは核酸分子の配列に対応する際の、配列に関してのみであるという点に留意すべきである。ヒトのポリペプチド及びそれらをコード化する核酸分子に加えて、本開示は、他の種からのIL-15関連ポリペプチド及び対応する核酸分子を想定する。

【0045】

定義

特に指示のない限り、以下の用語は、以下に示す意味を有することを目的としている。他の用語は、明細書の全体にわたって他の場所で定義される。

30

【0046】

用語「患者」または「対象」は、ヒトまたはヒト以外の動物（例えば、哺乳動物）を指して同じ意味で用いられる。

【0047】

用語「投与」、「投与する」などは、それらが例えば対象、細胞、組織、器官または生体液に適用される際、例えばIL-15もしくはPEG-IL-15、核酸（例えば、天然型ヒトIL-15をコード化する核酸）、前述を含む医薬組成物または診断薬と、対象、細胞、組織、器官または生体液との接触を意味する。細胞の文脈において、投与は、試薬の細胞への接触（例えば生体外、または生体内で）ならびに流体が細胞と接触しているところでは試薬の流体への接触を含む。

40

【0048】

用語「治療する」、「治療すること」、「治療」などは、疾患、障害もしくは状態またはその症状が診断され観察された後、一時的にもしくは恒久的に対象が患う疾患、障害もしくは状態またはその症状に関連する少なくとも1つの症候を除去し、低減し、抑制または改善するために開始する行動（IL-15またはIL-15を含む医薬組成物の投与など）の過程を意味する。したがって治療は、活動性疾患を予防すること（例えば疾患、障害もしくは状態、またはそれに関連する臨床症候の発症もしくは更なる発症を阻止する）を含む。前記用語は、IL-15またはPEG-IL-15が、例えば流体相またはコロイド相のIL-15受容体に接触するような状況など他の文脈でも使用することができ

50

る。

【0049】

本明細書で使用する場合「治療を必要とする」という用語は、対象が必要とする、もしくは治療から利益を得る医師または他の介護者によって行われる判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の領域にある様々な要因に基づき行われる。

【0050】

用語「予防する」、「予防すること」、「予防」などは、一般的に特定の疾患、障害または状態を有する傾向がある対象に関連して、一時的または恒久的のいずれかで、疾患、障害、状態などを発症する対象のリスクを予防し、抑制もしくは低減し（例えば臨床症状の不存在により判断されるように）、またはその開始を遅延するための方法（例えば疾患、障害、状態またはその症状の開始に先立って）で開始する行動（IL-15またはIL-15を含む医薬組成物を投与することなど）の過程を意味する。特定の場合には、本用語は、疾患、障害または状態の進行を遅くする、または有害なもしくは望ましくない状態へのその進行を阻害することも指す。

10

【0051】

本明細書で使用する場合、用語「予防を必要とする」とは、対象が必要とする、もしくは予防的ケアから利益を得る医師または他の介護者によって行われる判断を指す。この判断は、医師のまたは介護者の専門知識の領域にある様々な要因に基づき行われる。

【0052】

語句「治療に有効な量」とは、単独でまたは医薬組成物の一部として、及び単回用量または一連の用量の一部として被験者に投与した場合、疾患、障害もしくは状態の任意の症状、態様または特徴に、任意の検出可能な積極的効果を有することができる量で、対象に薬剤を投与することを意味する。治療に有効な量は、関連する生理学的効果を測定することにより確認することができ、それは、投与レジメン及び対象の状態の診断分析などと連結して調整することができる。一例として、投与後に産生される炎症性サイトカインの量の測定は、治療に有効な量が使用されたかを示すことができる。

20

【0053】

「変化をもたらすのに十分な量」という語句は、特定の療法の施与前とその後測定された指標のレベル（例えば基準レベル）の間に検出可能な差があることを意味する。指標としては、任意の客観的パラメータ（例えばIL-15の血清濃度）または主観的パラメータ（例えば対象の満足度）が挙げられる。

30

【0054】

用語「小分子」は、約10kDa未満、約2kDa未満または約1kDa未満の分子量を有する化合物を指す。小分子としては、無機分子、有機分子、無機成分を含有する有機分子、放射性原子を含む分子、及び合成分子が挙げられるが、これらに限定されない。治療的に小分子は、細胞に対してより透過性があり、劣化の影響を受けにくく、大きな分子より免疫反応を誘発する可能性が低いことがあり得る。

【0055】

用語「リガンド」は例えば、受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストとして作用することができる、ペプチド、ポリペプチド、膜会合もしくは膜結合分子、またはその複合体を意味する。「リガンド」は、天然及び合成リガンド、例えばサイトカイン、サイトカイン変異体、類似体、ムテイン、及び抗体に由来する結合組成物、ならびに例えばサイトカインのペプチド模倣物及び抗体のペプチド模倣物を包含する。この用語は、その生物学的特性、例えばシグナル伝達または接着に特異的に影響を与えることなく、受容体に結合することができる、アゴニストでもアンタゴニストでもない物質も包含する。更にこの用語は、例えば化学的または組み換え法により、膜結合リガンドの可溶性バージョンに変更された膜結合リガンドを含む。リガンドまたは受容体は完全に細胞内であってもよく、すなわちそれは、サイトゾル、核、またはいくつかの他の細胞内区画に存在してもよい。リガンド及び受容体の複合体は、「リガンド-受容体複合体」と呼ばれる。

40

【0056】

50

用語「抑制分子」及び「アンタゴニスト」または「活性分子」及び「アゴニスト」は、例えばリガンド、受容体、補因子、遺伝子、細胞、組織または器官の例えば活性化のために、それぞれ阻害または活性化する分子を意味する。抑制分子は、例えば遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体もしくは細胞を、減少させ、ブロックし、防止し、活性化を遅延させ、不活性化させ、感度を下げ、または下方に調節する分子である。活性分子は、例えば遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体もしくは細胞を、増加させ、活性化させ、助長し、活性化を強化し、感度を上げ、または上方に調節する分子である。抑制分子は、構成的活性を低下させ、ブロックし、または不活性化する分子としても定義することができる。「アゴニスト」は、標的の活性化の上昇を発生させ、または促進するために、標的と相互作用する分子である。「アンタゴニスト」は、アゴニストの作用（複数を含む）に対向する分子である。アンタゴニストは、アゴニストの作用を防止し、減少させ、阻害しまたは中和して、アンタゴニストは、例えば識別されたアゴニストがない場合でも、標的受容体の構成的活性を妨害、阻止または低下させることもできる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 5 7 】**

用語「調節する」、「調節」などは、IL - 15分子（または、それらをコード化する核酸分子）の機能または活性を、直接的にもしくは間接的に上昇させるもしくは低下させるため；またはIL - 15分子と同等の効果を産生するために分子の能力を強化するための、分子（例えば活性分子または抑制分子）の能力を意味する。用語「モジュレーター」は、上述の活動に影響を与えることができる分子を広く指すことを意味する。一例として、例えば遺伝子、受容体、リガンドまたは細胞のモジュレーターは、遺伝子、受容体、リガンドまたは細胞の活性を変化させる分子であり、ここで活性は、その調節特性を活性化させ、抑制しまたは変化させることが可能である。モジュレーターは単独で作用し得る、またはそれは補因子、例えばタンパク質、金属イオンもしくは小分子を使用することができる。用語「モジュレーター」は、IL - 15と同じ作用機序を介して作動する化学物質（すなわち、それと類似の手法でIL - 15と同一のシグナル伝達経路を調節する物質）を含み、IL - 15と同等の（またはより大きい）生物学的反応を誘発することができる。

**【 0 0 5 8 】**

モジュレーターの例としては、小分子化合物及び他の生物有機分子が含まれる。小分子化合物の多数のライブラリー（例えば、コンビナトリアルライブラリー）が市販されており、調節因子を同定するための出発点として機能することができる。当業者は、1つ以上のアッセイ（例えば、生化学的または細胞系アッセイ）を開発することができ、そのような化合物ライブラリーは望ましい特性を有する1つ以上の化合物を同定するためにスクリーニングすることができる。その後医薬品の当業者は、例えばその類似体及び誘導体を合成し、ならびに評価することにより、そのような1つ以上の化合物を最適化することができる。合成及び/または分子モデリングの研究は、活性体の同定にも利用することができる。

**【 0 0 5 9 】**

分子の「活性」は、リガンドまたは受容体への分子の結合；触媒活性；遺伝子発現または細胞のシグナル伝達、分化もしくは成熟を刺激する能力；抗原活性；他分子の活性の調節などを説明するまたは意味する。この用語は、細胞間相互作用（例えば、接着）を調節する、もしくは維持することにおける活性、または細胞（例えば、細胞膜）構造の維持における活性も意味する。「活性」は、比活性、例えば[触媒活性]/[mgタンパク質]、または[免疫学的活性]/[mgタンパク質]、生体区画の濃度なども意味することができる。用語「増殖活性」は、例えば正常な細胞分裂、ならびに癌、腫瘍、異形成、細胞の形質転換、転移及び血管形成を促進し、そのために必要なまたは特異的に関連する活性を包含する。

**【 0 0 6 0 】**

本明細書で使用する場合「匹敵する」、「同等の活性」、「匹敵する活性」、「同等の効果」、「匹敵する効果」などは、定量的及び/または定性的に表示できる相対的な用語

である。用語の意味は、それらが使用される文脈にしばしば依存する。一例として、両方が受容体を活性化する2つの化学物質は、定性的観点から同等の効果を持つと見なすことができるが、1つの化学物質が当該技術分野で認められたアッセイ（例えば、用量反応アッセイ）、または当該技術分野で認められた動物モデルで決定される他の化学物質の活性の20%のみを達成することができる場合、2つの化学物質は、定量的観点から同等の効果に欠いていると見なすことができる。1つの結果を別の結果と比較すると（例えば、1つの結果と参照標準）、「匹敵する」はしばしば（常にではないが）、1つの結果が35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満または1%未満だけ参照標準から逸脱していることを意味する。特定の実施形態において、参照標準の15%未満、10%未満または5%未満だけ逸脱している場合、1つの結果は参照標準に匹敵する。一例として活性または効果は、有効性、安定度、溶解度または免疫原性を指す場合もあるが、これらに限定されない。先に示したように、異なる方法論を使用することは、hIL-15参照標準より-タンパク質濃度の計算における差異に起因する見かけの活性、または現実の活性のいずれかで-多少活性であるIL-15をもたらし得ることを当業者は認識する。当業者は、IL-15分子対hIL-15の相対的な生物活性を決定する際、これらの違いを考慮することができる。

10

20

30

40

50

**【0061】**

細胞、組織、器官または生物の「反応」という用語は、生化学的または生理学的挙動、例えば濃度、密度、接着もしくは生物学的区画内での移動、遺伝子発現の速度もしくは分化の状態の変化を包含しており、前記変化は、活性化、刺激もしくは処置、または遺伝的プログラミングなどの内部機構と相関している。特定の文脈における、用語「活性化」「刺激」などは、内部機構により、同様に外部または環境要因により調節される細胞活性化を意味し、一方で用語「阻害」「下方調整」などは逆の効果の意味する。

**【0062】**

本明細書で同じ意味で用いられる「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」とは任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指しており、それは遺伝的にコード化した及び遺伝的にコード化していないアミノ酸、化学的にもしくは生化学的に改変されたまたは誘導化されたアミノ酸、ならびに改変ポリペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る。この用語は、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、N末端にメチオニン残基を有するまたは有しない異種及び相同のリーダー配列を有する融合タンパク質、免疫学的にタグ付けされたタンパク質などを含む、融合タンパク質を含むがこれらに限定されない。

**【0063】**

本明細書で使用する場合、用語「変異体」及び「相同体」はそれぞれ、参照アミノ酸もしくは核酸配列に類似したアミノ酸またはDNA配列を表すために、同じ意味で用いられる。この用語は、天然起源の変異体及び天然起源ではない変異体を包含する。天然起源の変異体は、相同体（1つの種から別の種へアミノ酸またはヌクレオチド配列がそれぞれ異なるポリペプチド及び核酸）、ならびに対立遺伝子変異体（種内の1つの個体から別の個体へアミノ酸またはヌクレオチド配列がそれぞれ異なるポリペプチド及び核酸）を含む。したがって変異体及び相同体は、天然起源のDNA配列、ならびにそれによりコード化されるタンパク質及びそのアイソ型、ならびにタンパク質または遺伝子のスプライス変異体を包含する。この用語は更に、天然起源のDNA配列からの1つ以上の塩基が変化するが、それでも遺伝コードの縮重が故に天然起源のタンパク質に対応するアミノ酸配列に翻訳する核酸配列を包含する。天然起源ではない変異体及び相同体は、アミノ酸またはヌクレオチド配列の変化をそれぞれ含むポリペプチド及び核酸を含み、前記配列の変化は人工的に導入され（例えば、ムテイン）、例えば変化はヒトの介入（「ヒトの手」）により実験室内で発生する。したがって天然起源ではない変異体及び相同体は、1つ以上の保存的置換、及び/またはタグ、及び/または共役体により、天然起源の配列とは異なるものを意味する。

**【0064】**

本明細書で使用する場合「ムテイン」とは、突然変異した組み換えタンパク質に広く関連する。これらのタンパク質は通常、単一または複数のアミノ酸置換を運び、部位特異的もしくはランダム突然変異誘発を受けたクローン化された遺伝子、または完全に合成された遺伝子にしばしば由来する。指示のない限り、「IL-15の変異体」などの用語の使用は、IL-15ムテインを意味する。

【0065】

用語「DNA」、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」などは本明細書では同じ意味で用いられて、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはその類似体のいずれかの任意の長さのヌクレオチドポリマーの形態を意味する。ポリヌクレオチドの非限定の例としては、直鎖状及び環状核酸、メッセンジャーRNA (mRNA)、相補的DNA (cDNA)、組み換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、プライマーなどが挙げられる。

10

【0066】

本開示を通して、1文字または3文字記号によるアミノ酸を参照することは理解されるであろう。読者の便宜のために、1文字及び3文字のアミノ酸記号を以下に提供する。

G	グリシン	Gly	P	プロリン	Pro
A	アラニン	Ala	V	バリン	Val
L	ロイシン	Leu	I	イソロイシン	Ile
M	メチオニン	Met	C	システイン	Cys
F	フェニルアラニン	Phe	Y	チロシン	Tyr
W	トリプトファン	Trp	H	ヒスチジン	His
K	リシン	Lys	R	アルギニン	Arg
Q	グルタミン	Gln	N	アスパラギン	Asn
E	グルタミン酸	Glut	D	アスパラギン酸	Asp
S	セリン	Ser	T	トレオニン	Thr

20

【0067】

天然型ヒトIL-15またはIL-15ムテインへの言及で本明細書で使用する場合、用語「改変された」、「改変」などは、ヒトIL-15またはIL-15ムテインの望ましい特性を向上させる1つ以上の変化を指す。このような望ましい特性は、例えば循環半減期を延長すること、安定性を上昇させること、クリアランスを低下させること、免疫原性またはアレルギー性を変化させること、及び検出アッセイで使用する特定の抗体の上昇を可能にすること(例えば、新規なエピトープの導入により)を含む。以下に詳細に議論するとおり、実施され得るヒトIL-15またはIL-15ムテインは、PEG化(1つ以上のポリエチレングリコール分子(PEG)またはその誘導体との共有結合);グリコシル化(例えば、N-グリコシル化)、ポリシアリル化及びHES化;アルブミン融合;例えば共役型脂肪酸鎖を介在したアルブミン結合(アシル化);Fc-融合;ならびにPEG模倣体との融合を含むが、それに限定されない。いくつかの実施形態では、リンカーはこのような改変に使用され、以下に記載される。

30

【0068】

ポリペプチドの構造との関係で本明細書で使用される、「N末端」(または「アミノ末端」)及び「C末端」(または「カルボキシル末端」)とは、それぞれポリペプチドのアミノ最端及びカルボキシル最端を指し、一方用語「N末端側」及び「C末端側」とは、それぞれN末端及びC末端に向かうポリペプチドのアミノ酸配列の相対的位置を指し、それぞれN末端及びC末端の残基を含み得る。「じかにN末端側」または「じかにC末端側」とは、第1及び第2のアミノ酸残基が、連続するアミノ酸配列を提供するように共有結合されている、第2のアミノ酸残基に対する第1のアミノ酸残基の位置を指す。

40

【0069】

アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列(例えば、IL-15ポリペプチド「由来の」アミノ酸配列)との関係において「由来する」とは、ポリペプチドまたは核酸が、参照ポリペプチドまたは核酸(例えば天然起源のIL-15ポリペプチドまたはIL-15を

50

コード化する核酸)の配列を基準にしている配列を有することを示すことを意味しており、タンパク質または核酸が作られた供給源または方法を限定することを意味しない。一例として「由来する」という用語は、参照アミノ酸配列またはDNA配列の相同体または変異体を含む。

【0070】

ポリペプチドとの文脈において「単離された」という用語は、天然起源の場合、それが天然に存在し得るとは異なる環境にある目的のポリペプチドを指す。「単離された」は、目的のポリペプチドのために実質的に濃縮された、及び/または目的のポリペプチドを部分的または実質的に精製したサンプル内にあるポリペプチドを含むことを意味する。ポリペプチドが天然起源でない場合、「単離された」とは、ポリペプチドが合成または組み換え手段のいずれかにより作製された環境から分離されたことを示す。

10

【0071】

「濃縮された」とは、サンプルが非天然的に(例えば科学者により)操作されて、その結果目的のポリペプチドが、a)生物学的サンプル(例えば、ポリペプチドが天然に発生する、または投与後それが存在するサンプル)などの出発サンプルのポリペプチド濃度より大きい濃度(例えば、少なくとも3倍より大きく、少なくとも4倍より大きく、少なくとも8倍より大きく、少なくとも64倍より大きく、またはそれ以上に)で、または、b)ポリペプチドが作られる環境(例えばバクテリア細胞)より高濃度で、存在することを意味する。

20

【0072】

「実質的に純粋」とは、成分(例えば、ポリペプチド)が組成物の総含量の約50%超、通常は総ポリペプチド含量の約60%超を構成することを示す。より一般的には「実質的に純粋」とは、総組成物の少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%以上が目的成分である組成物を指す。場合によってはポリペプチドは、組成物の総量の約90%超、または約95%超を構成する。

【0073】

用語「特異的に結合する」または「選択的に結合する」は、リガンド/受容体、抗体/抗原または他の結合対を意味する場合、タンパク質と他の生物学的製剤の異質母集団におけるタンパク質の存在を決定する結合反応を示す。したがって指定した条件下で、特定のリガンドは特定の受容体に結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質に有意な量では結合しない。意図した方法による抗体または抗体の抗原結合部位に由来する結合組成物は、その抗原または変異体またはムテインに、他の抗体またはそれから誘導される結合組成物の有する親和性より、少なくとも2倍超、少なくとも10倍超、少なくとも20倍超、または少なくとも100倍超の親和性で結合する。特定の実施形態において、抗体は、例えばスキャチャード解析で決定されるように、約 $10^9$  L/molよりも大きい親和性を有するであろう(Munsen, et al., 1980 Analyt. Biochem., 107:220-239)。

30

【0074】

IL-15

MGC9721とも称されるIL-15は、染色体4q31上の34kbの領域によってコード化される12.8kDaの単量体糖タンパク質であると予測される。IL-15は4つの $\alpha$ -ヘリックス束群に属しており、その他の要素はIL-2、IL-4、IL-7、IL-9、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)及び顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)を含む。ヒトIL-15のゲノム構造は、9つのエクソン(1~8及び4A)及び8つのイントロンを含む。ヒト及びマウスは、類似のイントロン/エクソン構造を共有する。成熟タンパク質をコード化するIL-15遺伝子の部分の全体のイントロン/エクソン構造は、IL-2遺伝子及び他の4つの $\alpha$ -ヘリックス束サイトカインに類似している。

40

【0075】

当業者は、IL-15核酸及びアミノ酸配列が遺伝子データベース(例えば、GenB

50

ank) に一般公開されていることを理解するであろう。図 1 C に示すように (配列番号 3)、成熟ヒト IL-15 タンパク質は 114 アミノ酸残基 (12.8 kDA) を含む。E. coli で産生する組み換えヒト IL-15 は、単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である (12.9 kD の分子量を有する N 末端メチオニンを含む、115 アミノ酸残基)。2 つの転写物が報告されており、両方とも同じ成熟タンパク質を産生した。図 1 A を参照すると (配列番号 1)、IL-15 の長いシグナルペプチド (LSP) タンパク質 (受託番号 BC018149.2) は、48 残基シグナルペプチド (下線) を含む 162 アミノ酸残基を含む。図 1 B を参照すると (配列番号 2)、IL-15 の短いシグナルペプチド (SSP) タンパク質 (受託番号 BC100962.1) は、21 残基シグナルペプチド (下線) を含む 135 アミノ酸残基を含む。LSP は分泌型タンパク質と記載されており、SSP は細胞内に残存すると記載されている。

10

## 【0076】

図 2 A は、長いシグナルペプチド (LSP) cDNA ORF (162 アミノ酸残基をコード化する 489 塩基対 (配列番号 4)) (受託番号 BC018149.2) を示し、シグナルペプチド (下線) は最初の 48 アミノ酸をコード化する塩基対 1~144 を含む。図 2 B は、短いシグナルペプチド (SSP) cDNA ORF (135 アミノ酸残基をコード化する 408 塩基対 (配列番号 5)) (受託番号 BC100962.1) を示し、シグナルペプチド (下線) は最初の 21 アミノ酸をコード化する塩基対 1~63 を含む。図 2 C は、成熟ヒト IL-15 タンパク質をコード化する核酸配列を示す (114 アミノ酸残基をコード化する 345 塩基対 (配列番号 6))。

20

## 【0077】

非ヒトの例示の哺乳動物の IL-15 核酸またはアミノ酸配列は、例えば霊長類、イヌ科、ネコ科、ブタ科、ウマ科、ウシ科、ヒツジ、げっ歯類、マウス、ラット、ハムスター及びモルモットからのものであり得る。例示の非ヒト哺乳動物の IL-15 核酸配列の受託番号は、U19843 (マカク); DQ021912 (マカク); AB000555 (マカク); NM\_214390 (ブタ); DQ152967 (ヒツジ); NM\_174090 (ウシ); NM\_008357 (マウス); NM\_013129 (ラット); DQ083522 (スイギュウ); XM\_844053 (イヌ); DQ157452 (ウサギ) 及び NM\_001009207 (ネコ) を含む。例示の非ヒト哺乳動物の IL-15 アミノ酸配列の受託番号は、AAB60398 (マカク); AAY45895 (マカク)、NP\_999555 (ブタ); NP\_776515 (ウシ); AAY83832 (スイギュウ); ABB02300 (ヒツジ); XP\_849146 (イヌ); NP\_001009207 (ネコ); NP\_037261 (ラット) 及び NP\_032383 (マウス) を含む。ヒト IL-15 (「hIL-15」) と比較した成熟マカクザル IL-15 (「cIL-15」) の同一性は 96% であり、一方で成熟マウス IL-15 (「mIL-15」) 及び成熟 hIL-15 の同一性は 75% である。

30

## 【0078】

ヒト IL-15 は位置 C42~C88 及び C35~C85 で 2 つのジスルフィド結合を含有し、前者は IL-2 内の C-C と相同である。N79 及び N112 に 2 つの N-結合グリコシル化部位がある (使用する分析法に応じて、N71 は第 3 のグリコシル化部位であるとみなすことができる)。成熟 IL-15 タンパク質は、その 4 つの -ヘリックス束構造を支持する、アミノ酸残基 1~15、18~57、65~78 及び 97~114 で強いヘリックスモーメント有すると予測された (Fehniger, et al., Blood 97 (1) (Jan 1, 2001))。

40

## 【0079】

前述のように、ネクサスが IL-15 と IL-2 の間に存在する。IL-15 及び IL-15R 発現の複雑な調節及び差異パターンに基づいて、この受容体/リガンド対の臨界生体内機能が IL-2 及び IL-2R と異なる可能性は高い。IL-15 はいくつかの重要な非重複の役割を示し、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NK-T 細胞及び腸上皮内リンパ球の発達及び機能中のその重要性を含む。IL-15 が自己免疫プロセス (例え

50



ば、リウマチ性関節炎)及び悪性腫瘍(例えば、T細胞白血病)で報告によれば役割を果たすので、通常のIL-15機能の破壊は対象の好ましくない影響に係る。

【0080】

両方は受容体サブユニットIL-2R及び共通鎖(c)を通してシグナル伝達するが、IL-15及びIL-2はすべての同じ生物学的機能を共有するわけではない。IL-15-IL-15R-IL-2R-(c)4成分複合体の構造において、IL-15は、IL-2-IL-2R-IL-2R-(c)複合体に似ているヘテロ二量体のIL-2R及び(c)と結合する。IL-15Rは実質的にIL-2RのためIL-15の親和性を増加させることを示し、それは同様にIL-15トランスシグナル伝達のために必要とされる。IL-15及びIL-2は類似のシグナルを誘起し、IL-2R対IL-15Rの特異性は細胞反応を測定することを示した(Ring et al, Nat. Immunol. 13(12):1187-95(Dec. 13, 2012)参照)。

10

【0081】

IL-15は主に膜結合型として存在するが、それは可溶性分子として存在し(Jakobisiak, et al., Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109(April 2011))、それは2つの異なるシグナル伝達機構と関連する。第1の機構は、膜結合型複合体IL-15/IL-15Rにより介在されるトランス提示である。このシグナル伝達機構では、その細胞表面上にIL-15R c複合体を有する細胞を取り囲むための次の提示により、IL-15はIL-15R受容体と結合する。第2の機構はシス提示であり、IL-15は、IL-15Rにより同じ細胞上の15R cシグナル伝達複合体に提示される。第1のシグナル伝達機構を参照すると、IL-15とIL-15R受容体の結合、及びIL-15R c複合体を有する細胞を取り囲むことへの次の提示の際、IL-15サブユニットはヤヌスキナーゼ1(Jak1)を活性化し及びcサブユニットはヤヌスキナーゼ2(Jak2)を活性化して、それは、転写3(STAT3)及びSTAT5の信号トランスデューサならびに活性化因子の、リン酸化ならびに活性化へと続く。IL-15及びIL-2が受容体サブユニットを共有するので、それらは類似の下流効果を有し、それはB細胞リンパ腫(Bcl-2)の誘導;マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAP)経路、及びリンパ球-活性タンパク質チロシンキナーゼ(Lck)と脾臓チロシンキナーゼ(Syk)のリン酸化反応を含み、それは細胞増殖及び成熟をもたらす(Schluns, et al., Int J Biochem Cell Biol 37(8):1567-71(Aug 2005))。

20

30

【0082】

それに対し、肥満細胞のIL-15Rシグナル伝達経路は、Jak1/3及びSTAT3/5の代わりにJak2及びSTAT5を含む。リン酸化STATは転写因子を形成して、適切な遺伝子の転写を作用させる。IL-15Rの鎖は、Lck、Fyn及びLynキナーゼを含むSrcファミリーのタンパク質チロシンキナーゼを組み入れて、更に活性化する。鎖は更にホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)及びAKTシグナル伝達経路を活性化して、c-Fos、c-Jun、c-Myc及びNF-Bを含む種々の転写因子の発現を誘起する(Jakobisiak, et al., Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109(April 2011))。

40

【0083】

先に示したように、本開示は更に、本明細書中の教示と併せて、生体内で、試験管内及び生体外での遺伝子治療の使用を意図する。遺伝子治療は、新規遺伝子を導入するために、既存の遺伝子の追加のコピーを導入するために、既存の遺伝子の機能を損なうために、または存在するが非機能的な遺伝子を修復するために、対象内の内因性細胞に、通常ベクターにパッケージングした遺伝物質を送達することにより行われる。細胞内で一度、核酸は細胞機構により発現し、目的のタンパク質の産生をもたらす。本開示の文脈において

50

、遺伝子治療は、本明細書に記載の疾患、障害もしくは状態の治療または予防において使用するためのIL-15剤をコード化する核酸を送達するための治療法として使用される。本明細書で使用する場合、遺伝子治療は細胞の対象からの除去についても記載し、それはIL-15をコード化する核酸分子を有する細胞をトランスフェクションし、及びその細胞を対象に戻す。

#### 【0084】

上述のように遺伝子治療の使用及び方法において、対象の細胞は、生体内で本明細書に記載のIL-15関連ポリペプチドをコード化する核酸で形質転換することができる。あるいは細胞は、導入遺伝子またはポリヌクレオチドで生体外で形質転換し、その後治療を行うために対象の組織内に移植することができる。更に初代細胞分離株または株化細胞株は、IL-15関連ポリペプチドをコード化する導入遺伝子またはポリヌクレオチドで形質転換ことができ、その後場合により対象の組織内に移植できる。

10

#### 【0085】

##### PEG化IL-15

組み換えヒトIL-15の有用性はしばしば比較的短い血清半減期によって制限されており、それは例えば腎クリアランスまたはタンパク質分解に起因し得る。その結果、その二量体構造を不利に破壊し、そのため活性に悪影響を与えることがないように、様々なアプローチはIL-15の薬物動態プロファイルを改善するために検討されてきた。IL-15のPEG化は、例えば中国特許第102145178号に報告されているように、特定の薬物動態パラメータ（例えば、血清半減期）の改善をもたらす。しかし中国特許第102145178号は、N末端PEG化に焦点を当てている。IL-15及びFcを含む融合分子は、半減期を改善することも報告された（例えば中国特許第200410067182号を参照）。

20

#### 【0086】

当業者には明らかであるように、複数のポリエチレングリコール分子は複数のアミノ酸残基に付着できる。したがって本明細書で使用する場合、用語「PEG化IL-15」及び「PEG-IL-15」は、結合が安定するように一般的にリンカーを介して、IL-15タンパク質の少なくとも1つのアミノ酸残基に共有結合で結合する、1つ以上のポリエチレングリコール分子を有するIL-15分子を指す。用語「モノPEG化IL-15」及び「モノPEG-IL-15」は、1つのポリエチレングリコール分子が、一般的にリンカーを介して、IL-15の単一のアミノ酸残基に共有結合されていることを示すために使用される。条件「ジPEG化IL-15」及び「ジPEG-IL-15」は、1つのポリエチレングリコール分子が1つのアミノ酸残基に共有結合し、別のポリエチレングリコール分子は異なるアミノ酸残基に共有結合する、IL-15タンパク質に記載するために用いることができる。例えば1つのポリエチレングリコール分子は、成熟IL-15のN末端アミノ酸残基に共有結合することができ、別のポリエチレングリコール分子はC末端残基に共有結合することができる。それはタンパク質を生成することもでき、ポリエチレン分子は2超のアミノ酸残基に共有結合して、当業者はこのような分子を産生する手段に精通している。

30

#### 【0087】

特定の実施形態では、本開示で使用されるPEG-IL-15は、1~9つのPEG分子が、リンカーを介して、リシン残基の側鎖のN末端でまたはイプシロンアミノ基でアミノ酸残基のアルファ-アミノ基に共有結合される、モノPEG-IL-15である。リンカーは、下記で更に記載する。通常容易にPEG化できない可能性がある成熟IL-15内の部位でPEG化を行うために、IL-15上の1つ以上の異なる部位は1つ以上の変異体を導入し、その後それらのそれぞれを改変することにより、改変される可能性がある。代表的なPEG化条件を本明細書の他の場所に記載する。

40

#### 【0088】

特定の実施形態では、PEG部分の平均分子量は、約5kDa~約50kDaの間である。例えば、PEG部分は、約5kDaより大きく、約10kDaより大きく、約15k

50

D aより大きく、約20kDaより大きく、約25kDaより大きく、約30kDaより大きく、約35kDaより大きく、約40kDaより大きく、約45kDaより大きく、または約50kDaよりも大きい分子量を有してもよい。いくつかの実施形態では、分子量は、約5kDa～約10kDa、約5kDa～約15kDa、約5kDa～約20kDa、約10kDa～約15kDa、約10kDa～約20kDa、約10kDa～約25kDa、または約10kDa～約30kDaである。他の実施形態では、分子量は、約15kDa～約20kDa、約15kDa～約25kDa、約15kDa～約30kDa、約15kDa～約35kDa、約15kDa～約40kDa、または約15kDa～約45kDaである。

#### 【0089】

IL-15のサイズ故に、20kDa（例えば20～40kDaの範囲）より大きいPEGは、特定の実施形態において想到される。いくつかの実施形態では、分子量は、約20kDa～約25kDa、約20kDa～約30kDa、約20kDa～約35kDa、約20kDa～約40kDa、約20kDa～約45kDa、または約20kDa～約50kDaである。いくつかの追加の実施形態では、分子量は、約25kDa～約30kDa、約25kDa～約35kDa、約25kDa～約40kDa、約25kDa～約45kDa、または約25kDa～約50kDaである。更に他の実施形態では、分子量は、約30kDa～約35kDa、約30kDa～約40kDa、約30kDa～約45kDa、または約30kDa～約50kDaである。更に他の実施形態では、分子量は、約35kDa～約40kDa、約35kDa～約45kDa、約35kDa～約50kDa、約40kDa～約45kDa、約40kDa～約50kDa、または約45kDa～約50kDaである。本開示は、5kDaの増分で50kDaより大きい分子量を有するPEG（例えば55kDa、60kDa、65kDaなど）を想到する。

#### 【0090】

本開示は、特異的な方法の使用またはIL-15へのPEGの付着部位の使用を必要としないが、PEG化がIL-15分子の活性を改善するが、それを変えず、または単に形式的に減少させることは、しばしば有利である。特定の実施形態では、半減期の増大の影響は生物活性の低下の影響よりも大きい。PEG-IL-15の生物活性は、細菌性抗原（リポ多糖体（LPS））でチャレンジし、PEG-IL-15で処理した対象の血清中の炎症性サイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）のレベルを評価することにより測定する。生物活性の測定の他の手段は、本明細書の他の場所に記載されている。

#### 【0091】

IL-15変異体

IL-15変異体は、血清半減期の増加；IL-15に対する免疫反応の低下；精製または調製の促進；分解の減少；治療効果の改善；及び治療上の使用中の副作用の重症度または発生の軽減を含む、様々な目的を念頭に置き調製できる。いくつかは翻訳後変異体、例えばグリコシル化変異体であり得るが、アミノ酸配列変異体は通常、天然では見られない変異体をあらかじめ定めている。IL-15の任意の変異体は、それがIL-15活性の適切なレベルを維持する場合、使用できる。IL-15活性は、本明細書の他の場所に記載されている（例えば、T細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞の活性化及び増殖の調節）。

#### 【0092】

「保存的アミノ酸置換」という語句は、類似の酸性度、塩基度、電荷、極性を有する側鎖または類似の側鎖サイズを有するアミノ酸で、タンパク質のアミノ酸（複数を含む）を置換することにより、タンパク質の活性を保存する置換を意味する。「保存的アミノ酸置換」とは、一般的に以下の群内：1）L、I、M、V、F；2）R、K；3）F、Y、H、W、R；4）G、A、T、S；5）Q、N；及び6）D、Eでのアミノ酸残基の置換を指す。置換、挿入または欠失の指針は、異なる変異タンパク質または異なる種からのタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントに基づくことができる。したがって任意の天然起源のIL-15ポリペプチドに加えて、置換が通常保存的アミノ酸置換である場合、1、

10

20

30

40

50

2、3、4、5、6、7、8、9または10つ、通常20、10または5つ以下のアミノ酸置換を有することを、本開示は想到する。場合により1つ以上の非天然アミノ酸は、部位特異的共役化を促進する手段として、IL-15に導入してもよいことに留意すべきである。

#### 【0093】

本開示は、成熟IL-15に由来する連続アミノ酸残基を含む成熟IL-15の活性フラグメント（例えば、サブ配列）も想到する。ペプチドまたはポリペプチドのサブ配列の連続アミノ酸残基の長さは、サブ配列が由来する特定の天然起源のアミノ酸配列により異なる。一般にペプチド及びポリペプチドは、約20アミノ酸～約40アミノ酸、約41アミノ酸～約50アミノ酸、約51アミノ酸～約60アミノ酸、約61アミノ酸～約70アミノ酸、約71アミノ酸～約80アミノ酸、約81アミノ酸～約90アミノ酸、約91アミノ酸～約100アミノ酸、約101アミノ酸～約105アミノ酸、約106アミノ酸～約110アミノ酸、または約111、112または113アミノ酸～完全長のペプチドまたはポリペプチドであり得る。

10

#### 【0094】

そのうえIL-15ポリペプチドは、連続するアミノ酸の定義された長さにわたる参照配列（例えば、「比較ウィンドウ」）と比較して、定義した配列同一性を有し得る。比較のための配列のアラインメント方法は当該技術分野において既知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)に記載のローカル相同性アルゴリズムにより; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)に記載の相同性アラインメントアルゴリズムにより; Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)に記載の類似法の探索により; これらのアルゴリズム (GAP, BESTFIT, FASTA, 及び TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.) のコンピュータでの実行により; または手動アラインメント及び目視検査により実施できる (参照: 例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)) 実施することができる。

20

#### 【0095】

一例として、適切なIL-15ポリペプチドは、一続きの約20アミノ酸～約40アミノ酸、約41アミノ酸～約50アミノ酸、約51アミノ酸～約60アミノ酸、約61アミノ酸～約70アミノ酸、約71アミノ酸～約80アミノ酸、約81アミノ酸～約90アミノ酸、約91アミノ酸～約100アミノ酸、約101アミノ酸～約105アミノ酸、約106アミノ酸～約110アミノ酸または約111、112もしくは113アミノ酸～完全長のペプチドもしくはポリペプチドに対する、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%または少なくとも約99%のアミノ酸の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

30

#### 【0096】

更に以下で議論するように、IL-15ポリペプチドは天然源（例えばその天然に存在する環境以外の環境）から単離することができ、組み換えで作ることもでき（例えば細菌、酵母、ピチア、昆虫細胞など遺伝的に改変された宿主細胞中で）、遺伝的に改変された宿主細胞は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で改変される。IL-15ポリペプチドは、合成的に（例えば、無細胞の化学合成により）産生することができる。

40

#### 【0097】

天然起源の及び天然起源ではないアイソ型、対立遺伝子変異体及びスプライス変異体を含む、IL-15分子をコードする核酸分子は、本開示により想到される。天然起源のDNA配列からの1つ以上の塩基を変化させるが、引き続き遺伝コードの縮重によってI

50

IL-15 ポリペプチドに対応するアミノ酸配列に翻訳された核酸配列も、本開示は包含する。

【0098】

IL-15 変異体（例えばムテイン）及び改変 IL-15 分子

本発明は、変異源物質を介したタンパク質機能の操作及び IL-15 に対する他の改変を部分的に示している。いくつかの実施形態において、本発明は改変した IL-15 分子を想到しており、1つ以上の有利な特性が IL-15 に加えられ（特性（複数を含む）が未改変の IL-15 に存在しない場合）、及び/または強化される（最適以下であるにも関わらず、特性（複数を含む）が未改変の IL-15 に存在する場合）。更に以下で論じるように、そのような分子は、例えばヒト IL-15 における一連の点変異の発生を含む、合理的なドラッグデザインアプローチを介して同定し、合成できる。この一連の点変異は、一連の要素の特性（例えば、有効性）の性質及び程度を決定するために評価することができる。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、点変異は、例えば IL-15 ペプチドの合成を容易にするために使用され、ペプチドは共有結合または非共有結合の改変（例えば PEG 化、Fc 融合及び HSA 融合）を含む。同様に改変されたペプチドの体系的評価は、IL-15 の一次アミノ酸配列の位置を画定するために実施でき、この改変は a) タンパク質の生物活性を保持する；b) 特定のタンパク質機能を促進する；c) 他方を維持しつつ、特定の IL-15 の機能を重視しない；または d) a) ~ c) のいくつかを組み合わせを実行している間、影響を与えることができる。

20

【0100】

本明細書で想到する合理的なドラッグデザインアプローチの1つの目標は、他の特性の追加または強化を可能にする間、生物活性への悪影響を有することなく改変できる IL-15 のこれらのアミノ酸残基及び領域の同定である。これらの合理的なドラッグデザインアプローチの別の目的は、他を維持し強化する間、改変が特定の IL-15 の機能の強化を選択的に抑えるために使用できる、IL-15 のアミノ酸残基及び領域を画定することである。したがって特定の実施形態では、IL-15 分子（例えばムテイン）または改変された IL-15 分子は、1つ以上の異なる役割を重視しない間 IL-15 の1つ以上の役割を強調する；他に影響を与えない間（例えば、IL-15 活性の正常レベルを維持しつつ）、1つ以上の IL-15 の役割を強調する；または他に影響を与えない間、1つ以上の IL-15 の役割を重視しない。特定の実施形態では、別の特徴（複数を含む）（例えば、半減期などの薬物動態学的パラメータ）を強化する場合、改変（複数を含む）は生物活性の減少をもたらす、少なくとも治療学的展望から一般的により有益な改変された IL-15 分子をもたらす。

30

【0101】

特定の実施形態において、本明細書に記載の改変（複数を含む）は、そのペプチドの未改変バージョンに比べてペプチドの少なくとも1つの特性または他の特徴（例えば、溶解度）を改善する。本開示の更なる実施形態は、本明細書に記載の方法に従って改変することができる IL-15 の特定のアミノ酸残基またはドメインを同定するための方法及び他の技術に関する。本明細書に記載のペプチドを使用し（例えばその障害もしくはは症状の治療または予防に）同定し及び/または生成する方法も、本開示の態様である。このような態様は本明細書の他の場所で述べられる。他の態様は、例えばペプチドを含む医薬組成物を含む。

40

【0102】

特定の IL-15 の機能ドメインの同定及び IL-15 共役体の特定の種類の生成について説明したが、文献は、それを同定し及び/または生成する方法ならびにそれを使用する方法に伴う、本明細書に記載の IL-15 分子の種類の開示がない。

【0103】

特定の実施形態において、本開示は、例えばヒト IL-15 での一連の点変異の生成、

50

及び哺乳動物または細菌系におけるその変異したIL-15タンパク質（例えば、ムテイン）の発現を想到する。本開示は、本明細書に記載の変異IL-15分子と適合する任意の発現系の使用を想到する。他の実施形態では候補タンパク質発現系は、細菌（例えば大腸菌、コリネバクテリウム、グラム陰性桿菌及び枯草菌）、酵母（例えば出芽酵母）由来のもの及びバキュロウイルス感染昆虫細胞を含むが、哺乳動物のタンパク質発現系は特定の実施形態において想到される。細胞系または無細胞発現系を使用することができる。ほとんどの組み換えサイトカインは細菌封入体中で産生され、その後精製し、再び折り畳まれた。

#### 【0104】

細菌細胞は、サイトカインを発現するために、通常タンパク質の再折り畳みを含む方法で使用される。しかし変異タンパク質が発現されるかを決定するために、最初に哺乳動物発現系を使用することが有利であり得る。哺乳動物細胞が変異タンパク質を発現できる場合、次にタンパク質の折り畳みは変異体により破壊されない可能性が高い。変異分子を折り畳みかつ分泌する哺乳動物細胞系の能力と、更なる評価の候補としてのその分子の生存能力の間に密接な相関がしばしばある。逆に初期発現が細菌中で行われ、変異タンパク質が正しく再折り畳みされていない場合、変異体が破壊されたか、またはタンパク質の再折り畳みプロトコルが最適以下であったかは不明である。

#### 【0105】

発現系（例えば、哺乳動物細胞株ベースの発現系）でタンパク質の折り畳み及び分泌を著しく破壊しない変異IL-15分子は、更なる評価の候補であり得る。例えばこのような変異IL-15分子は、生体内または試験管内/生体外アッセイの1つ以上で、本明細書に記載のCTL-2細胞増殖アッセイを含む生物活性の分析を可能にするために十分に精製され得る。更なる例により、そのような変異IL-15分子は、IL-15/IL-15結合相手の親和性測定を提供する生体外アッセイで評価することができる。更に生体内モデルは記載されており、本明細書に記載のIL-15分子の評価で使用できる。

#### 【0106】

特定の実施形態において、変異IL-15ポリペプチド分子（例えばムテイン）は、例えばPEG化により改変される。これらの改変したIL-15分子は、その後、タンパク質機能への影響を決定するために評価することができる。良好な特性（例えば、正常またはタンパク質機能に影響を与えない）を示す改変したIL-15分子は、更なる改変（例えば、より大きなまたは分枝状PEG）及び評価（例えば、溶解度）の候補であり得る。PEG化及び他の種類の改変を、本明細書の他の場所で詳述する。

#### 【0107】

更に本開示は、本明細書に記載の生体外、生体内またはインシリコ免疫原性アッセイなどの免疫原性を決定するための1つ以上のアッセイを用いて、変異IL-15ペプチド及び改変IL-15ペプチドの評価を想到する。特に良好な特性（例えば、インシリコで決定されるような免疫原性を増加させることなく、強化された有効性）を示す改変されたIL-15分子は、生体内免疫原性分析及び/または生体内設定での追加の分析を含む、更なる評価の候補であり得る。特定の実施形態では、これらの改変されたIL-15分子は、対応する非改変IL-15分子よりも免疫原性が大きくない。

#### 【0108】

IL-15フラグメント；異種タンパク質と複合したIL-15ポリペプチドを含む分子；及び核酸レベルで1つ以上の治療薬に融合したIL-15を含むIL-15融合タンパク質（例えば、抗炎症生物学的薬剤）を含む、他のIL-15分子は本明細書に包含される。そのような分子は、本明細書に記載のアプローチまたは当業者に既知の他のアプローチを用いて改変できる。

#### 【0109】

本開示の合理的なドラッグデザインアプローチは、多くのソースからの結晶学的及び類似データを利用できる。一例としてIL-15Rのsushiドメインとの複合体のIL-15の結晶構造が記載されるOlsen, et al., J. Biol. Chem

10

20

30

40

50

． 282 (51) : 37191 - 204 (Dec. 21 2007)。更に Pettit ら (J. Biol. Chem. 272 : 2312 - 18 (1997)) は、部位特異的突然変異、ポリエチレングリコール共有結合及びホモロジーモデリングを使用する IL - 15 の構造機能研究を記載する。それ自身不十分かつ不完全であるにもかかわらず、そのようなソースに記載された情報及びデータは、変更できる IL - 15 のアミノ酸残基及びドメインの同定に使用する成分を表すことができる。このような情報及びデータを活用した結果、変異 IL - 15 分子 (例えば、ムテイン) ならびに改変された変異 IL - 15 分子 (及びいくつかの実施形態では改変された天然型 hIL - 15) は、本明細書に記載の利点及び/または望ましい特徴を有すると同定された。

#### 【0110】

本明細書に記載されかつ図3で示されるように、成熟 hIL - 15 は、a) ヘリックス A (アミノ酸残基 1 ~ 17)、b) A / B ヘリックス間接合 (A / B ループ) (アミノ酸残基 18 ~ 31)、c) ヘリックス B (アミノ酸残基 32 ~ 53)、d) B / C ヘリックス間接合 (B / C ターン) (アミノ酸残基 54 ~ 57)、e) ヘリックス C (アミノ酸残基 58 ~ 77)、f) C / D ヘリックス間接合 (C / D ループ) (アミノ酸残基 78 ~ 96)、及び g) ヘリックス D (アミノ酸残基 97 ~ 114) を含む。いくつかの実施形態において、本開示は a) ヘリックス A、b) A / B ヘリックス間接合、c) ヘリックス B、d) B / C ヘリックス間接合、e) ヘリックス C、f) C / D ヘリックス間接合、及び g) ヘリックス D を含むペプチドを想定しており、このようなペプチドは更に、i) アミノ酸残基 2 (W)、4 ~ 12 (N V I S D L K K I ; 配列番号 37) もしくは 16 (I) 以外のヘリックス A のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または i i) アミノ酸残基 30 (D) もしくは 31 (V) 以外の A / B ヘリックス間接合のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または i i i) アミノ酸残基 32 (H)、35 (C)、40 (M)、42 ~ 44 (C F L)、47 (L) もしくは 50 (I) 以外のヘリックス B のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または i v) B / C ヘリックス間接合のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または v) アミノ酸残基 59 (I)、61 ~ 66 (D T V E N L ; 配列番号 38) もしくは 68 ~ 70 (I L A) 以外のヘリックス C のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または v i) アミノ酸残基 85 (C) もしくは 88 (C) 以外の C / D ヘリックス間接合のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; または v i i) アミノ酸残基 99 (F)、100 (L)、103 (F) もしくは 105 ~ 112 (H I V Q M F I N ; 配列番号 39) 以外のヘリックス D の少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換 ; のうちの少なくとも 1 つを含む。これらの領域の境界を図3に示す。

#### 【0111】

図3で示したヘリックス及びヘリックス間接合の境界がこれらの特定領域を画定するとして当該技術分野において一般に受け入れられているが、当業者は、このような領域を画定する特定のアミノ酸残基の特定の偏差があり得ることを理解するであろう。当業者は、本開示を実行するとき、このような偏差を考慮に入れることができる。

#### 【0112】

IL - 15 受容体結合及びシグナル伝達の機構は完全には解明されていないが、IL - 15 は IL - 15 R との複合体で機能することが示された。この複合体は、IL - 15 シグナル伝達を達成するために、IL - 2 / IL - 15 R 及び c と協調して作用する。図4AはヒトIL - 15 のタンパク質結晶構造のリボン表現 (平面図) であり、特定のヘリックス及びヘリックス間接合は標示されている。特定のIL - 15 結合相手 (例えば IL - 15 R ) も示される。図4BはヒトIL - 15 のタンパク質結晶構造のリボン表現 (側面図) であり、特定のヘリックス及びヘリックス間接合は標示されている。特定のIL - 15 結合相手 (例えば IL - 15 R ) も示される。

#### 【0113】

改変 (例えば PEG 化) の不良な候補であり得るアミノ酸残基は、改変にアクセスできない疎水性コアの残基 ; 結合界面と接触するまたはそれに極めて接近する残基 (例えば I

10

20

30

40

50

L15 / 受容体結合に関連する残基) ; 及びシステイン系PEG化した化学物質に一般的に非反応性である(ジスルフィド結合のシステインPEG化は定義されたPEG化条件を用いて達成できるが)ジスルフィド結合に関与するシステイン残基を含む。それに対し、改変(例えば、PEG化)の可能性のある良好な候補であり得るアミノ酸残基は、タンパク質間相互作用に関与しない表面露出残基、またはヘリックス間接合を形成する残基を含む。留意すべきは、IL-15Rにより結合されないとき、IL-15は立体構造的に「プラスチック」であると観察された(Ring et al, Nat. Immunol. 13(12): 1187-95 (Dec. 13, 2012))。

#### 【0114】

化学物質は、例えばポリペプチドのN末端、リシン残基、システイン残基、ヒスチジン残基、アルギニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、セリン残基、トレオニン残基、チロシン残基、及びC末端のPEG化のために一般的に存在する。上述のとおり、本開示は、同様にPEG化できる非天然型アミノ酸残基の導入を想到する。しかし、これらのアミノ酸残基のいくつかのみを、部位特異的なやり方で常にPEG化することができる。他のアミノ酸(例えば、グルタミン酸及びセリン残基)のPEG化は有用な多くの位置異性体をもたらすが、他のアミノ酸のPEG化は、複合条件下でのみ部位特異的な方法で実施できる。

#### 【0115】

場合によりPEG化の影響を受けやすい成熟IL-15内の可能性のある残基(例えば、ヒスチジン及びトレオニン)の評価は以下のとおり: PEG化に役立つ部位であるとわかったN末端; PEG化に役立つ可能性のある部位であるとわかったC末端; リジン(K)-7残基は成熟IL-15に存在するが、PEG化に役立つ部位ではないことが判明した; システイン(C)-4残基は成熟IL-15に存在するが、PEG化に役立つ部位ではないことが判明した; ヒスチジン(H)-4残基は成熟IL-15に存在するが、PEG化に役立つ部位ではないことが判明した; アスパラギン酸(D)-6残基は成熟IL-15に存在するが、PEG化に役立つ部位ではないことが判明した; グルタミン酸(E)-12残基は成熟IL-15に存在するが、PEG化に役立つ部位ではないことが判明した; セリン(S)-13残基は成熟IL-15に存在するが、PEG化に役立つ部位ではないことが判明した; スレオニン(T)-6残基は成熟IL-15に存在するが、PEG化に役立つ部位ではないことが判明した; である。一実施形態において、成熟IL-15の唯一のチロシン(Y)残基は、PEG化の可能性のある部位を表す。

#### 【0116】

上述した残基のそれぞれは適切な条件下でPEG化の影響を受けやすいが、商業上PEG化の実際の候補である残基の数は上述のサブセットである。一例として、本リジンベースのPEG化計画は、位置異性体の生成のない特定のリジン(野生型IL-15分子内の7リジン残基中から)をPEG化しない。このような位置異性体は多くの場合、治療薬で許容されない。更にそれらは、製造工程の追加の複雑さをしばしばもたらす。最後に特定のPEG化計画は、その残基が「標的」残基に対して類似の結合または環状構造を有する場合、「非標的」残基(複数を含む)のPEG化をもたらす。

#### 【0117】

本明細書に記載の教示によれば、成熟IL-15の144アミノ酸残基のうち、変異原性及び部位特異的の化学物質の組み合わせを介したアミノ残基の改変は、44残基に有用であるとは予想されない(図5を参照)。このような44残基のうち、4つはジスルフィド結合に関連している可能性がある。残りの40残基は、受容体シグナル伝達複合体と接触している、3次IL-15構造の疎水性コア領域内に埋もれた、またはその両方の可能性がある。IL-15/IL-2受容体シグナル伝達複合体の種々の要素がどのように相互作用するか、及びシグナル伝達がどのように行われるかの理解は、本開示を実行するために必要とされない。しかし3つのIL-15Rサブユニット(、及びc)のうち、シグナル伝達は、及びcサブユニットへのIL-15の結合を含むと考えられている。したがっていくつかの実施形態で、このようなPEG化は少しでもあるとしたらIL-

10

20

30

40

50



15シグナル伝達にほんのわずかな影響のみを与えるので、IL-15R を結合するIL-15の1つ以上のアミノ酸残基のPEG化を、本開示は想到する。逆に本明細書に記載の教示に基づき、突然変異誘発及び部位特異的な化学物質の組み合わせを介したアミノ酸残基の改変は、59残基で実行可能であることを予測し、それは表面露出であり得て、IL-15受容体複合体またはジスルフィド結合に完全には関与していない。11残基は、図5の「+/-」で示されるように、PEG化の可能性がある部位（例えば、受容体結合に関連する1つの残基及び受容体結合に関連していない別の表面露出残基を側面に置く残基）である潜在力を有すると考えられている。使用方法論及び他のパラメータに応じて、残基のうち1つ以上はPEG化の可能性がある部位ではないと見なされる、1つ以上の残基はPEG化の可能性がある部位であるとは見なされる、及び/または1つ以上の残基は場合により、異なるカテゴリーに分類され得るPEG化の可能性がある部位であるとは見なされる（例えば、場合によりPEG化の可能性がある部位である残基は、PEG化の可能性がある部位と結論づけられるかもしれない）と、当業者は結論づける可能性があることを理解すべきである。

10

20

30

40

50

**【0118】**

上述のように59アミノ酸残基は、PEG化のアンカーとして機能するアミノ酸の置換によって、場合により突然変異を許容する部位を表す。これらの可能性がある59の部位のうち、いくつかの変異体は種々の理由により特定の位置で排除される：ヒトIL-15がすでにその位置でのチロシンを含むため、残基26（Y）はチロシンに変異することはできない；残基71（N）はすでにN-X-S N-グリコシル化モチーフを含むため、N-X-Tモチーフのみを導入することができる；残基79（N）はすでにN-X-T N-グリコシル化モチーフを含むため、N-X-Sモチーフのみを導入することができる；残基112（N）はすでにN-X-S N-グリコシル化モチーフを含むため、N-X-Tモチーフのみを導入することができる。残基113（T）と114（S）はそれぞれ最後から2番目の残基と最後の残基であり、したがって3アミノ酸のN-グリコシル化モチーフを付加することができない。3つのアミノ酸にまたがるN-グリコシル化部位のモチーフ（N-X-SまたはN-X-T、X P）故に、N-グリコシル化変異体の側面に位置する残基を変異させることが場合によっては必要であるが、N-グリコシル化が目的の特定の残基で生じるように、このような変異体は設計された。変異体は本明細書に記載の方法を使用して生成され、生物活性を決定するためにCTL-2増殖アッセイで評価した。

**【0119】**

図6は、特定の置換のためのCTL-2増殖データを記載する。データの見直しにより、いくつかの一般状態観察を得る。第1にヘリックス間のループは通常、変異体への良好な場所である。しかしA/Bループ内のいくつかの残基は、改変の不良な候補である。第2に、システイン変異体は多くの場合非常に分裂しやすいが、残基6（I）及び70（A）の変異体だけは不活性だった。PEG化の部位として機能するアミノ酸を導入するために行われ得る正確な置換に関する詳細な考察は、下記のとおりである。しかしいくつかの生物活性を保持しつつ、置換に最も受け入れられる複数の残基を、以下のとおり示す。  
a) アミノ酸残基1（N）のすべての4つの置換（すなわち、チロシン（Y）、システイン（C）、N-X-S及びN-X-T）は活性タンパク質を産生し、標準N末端PEG化計画を直ちに使用することができる；  
b) アミノ酸残基13（E）の15（L）への置換は良好な結果を得た；  
c) アミノ酸残基17（Q）の23（A）への置換は良好な結果を得た；  
d) アミノ酸残基48（Q）、49（V）、51（S）の58（S）及び60（H）への置換は活性タンパク質を産生した；  
e) アミノ酸残基71（N）の84（G）への置換は良好な結果を得たが、この13残基の全長の2つの変異体を除く；  
f) アミノ酸残基89（E）の98（E）への置換は良好な結果を得た；  
g) C末端のアミノ酸残基113（T）及び114（S）は良好な結果を得て、標準C末端PEG化計画を直ちに使用することができる。

**【0120】**

本開示のいくつかの実施形態は、以下の領域 17 ~ 28、36 ~ 38、51 ~ 57、78 ~ 84 または 89 ~ 98 のうちの少なくとも 1 つに、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含むペプチドを想到している。他の実施形態において、ペプチドは、以下の位置 1、17 ~ 28、36 ~ 38、41、45、46、48、49、51 ~ 57、60、67、71 ~ 84、86、87、89 ~ 98、101、113 または 114 のうちの少なくとも 1 つで少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。更なる実施形態において、ペプチドは、以下の位置 1、3、13 ~ 15、17 ~ 29、33、34、36 ~ 39、41、45、46、48、49、51 ~ 58、60、67、71 ~ 84、86、87、89 ~ 98、101、102、104、113 または 114 のうちの少なくとも 1 つで少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。

10

#### 【0121】

生物学的活性を示す変異体の同定

本明細書に記載の方法を用いて、成熟ヒト IL-15 タンパク質の 114 アミノ酸残基のどれが、PEG 部分のためのアンカー部位の形成に貢献する残基との置換に許容されるかを決定するために、評価を実施した。この評価を用いて同定された残基は、置換が生物活性を示す変異体（ムテイン）をもたらすかを決定するために分析された。当業者は、生体外アッセイで活性であるすべての変異体が生体内設定で活性を有するとは限らず、そして逆もまた同様であることを理解するであろう。

#### 【0122】

上述及び図 5 に示したとおり、114 残基成熟ヒト IL-15 ポリペプチドのうちの 4 アミノ酸残基（「-」で表す）は PEG 化の候補ではない。これらの 4 残基のうちの 4 つは、ジスルフィド結合（残基 35 -> 85 及び残基 42 -> 88）を形成するシステインであり、したがって変異体に利用できない。残りの 40 残基は、受容体シグナル伝達複合体と接触している、3 次 IL-15 構造の疎水性コア領域内に埋もれた、またはその両方の可能性がある。したがって 70 残基（図 5 でそのうちの 59 は「+」で、11 は「+/-」で表す）は、PEG 化のアンカーとして機能するアミノ酸の置換によって突然変異を許容する可能性がある部位を表す。これらの可能性がある部位での変異体はそれから、本明細書に記載されているように CTL-2 細胞増殖アッセイを使用して評価された。

20

#### 【0123】

評価の結果を図 6A ~ 図 6B にまとめる。図 6A ~ 図 6B の最初の行は、IL-15 の各領域：a) ヘリックス A；b) A/B ループ（すなわち A/B ヘリックス間接合）；c) ヘリックス B、d) B/C ターン（B/C ヘリックス間接合）；e) ヘリックス C、f) CD ループ（すなわち C/D ヘリックス間接合）；及び g) ヘリックス D の境界を画定する。第 2 の行は、114 残基の成熟 IL-15 ポリペプチドの各アミノ酸残基を記載する。図 6 の次の 4 行は、各残基：システイン、チロシンならびに N-X-S 及び N-X-T N-グリコシル化モチーフに導入された変異体の種類に関連する。

30

#### 【0124】

図 6A ~ 図 6B の影を参照すると、下記に記載の「x」のあるダークグレイの欄を除いて、PEG のアンカーとして機能することができるアミノ酸の導入の良好な候補であるとみなされなかったので、ダークグレイの欄の残基は変異せず、または分析の一部でもなく；上述のように、このような残基は、受容体シグナル伝達複合体と接触している、3 次 IL-15 構造の疎水性コア領域内に埋もれた、またはその両方の可能性がある。しかし、N-グリコシル化部位の導入との関係において、これらの残基のいくつかは変異した点に留意する必要がある。ライトグレイの欄内の残りの 70 残基は、ホモ二量体上に表面露出する可能性が高く、受容体結合を妨げる可能性が低い残基を表す。1 つ以上の残基が異なって分類できると当業者は結論づけることができることを理解すべきである（すなわち、ダークグレイの欄内にある残基は、ライトグレイの欄内に置かれてもよい）。

40

#### 【0125】

変異体（例えば、システインまたはチロシン）は本明細書に記載の方法を使用して生成

50

され、その生物活性は、実験の項に記載されている及びSomanら(J Immunol Methods 348(1-2): 83-94(2009 August 31))に記載されているものと実質的に類似しているCTL-2細胞増殖アッセイで評価した。変異体が発現され、生物活性を示した場合、該当する欄に「+」を入れた(例えば、アミノ酸残基41を参照すると、チロシン変異体は活性を示すが、一方システイン変異体は示さなかった)。評価の目的のために、任意の生物活性の測定は「+」記号を割り当てた。「+」のないライトグレイの欄内の変異体(すなわち、空のグレイの欄)は、変異体が発現せず、またはCTL-2アッセイで活性ではなかったことを示す。

#### 【0126】

図6A~図6Bの特定のアミノ酸残基に関連するライトグレイの列のいくつかで、いくつかの欄(ライトグレイ)は空である、または「+」がはいり、他の欄はダークグレイで「x」を含む。これらの例で、ダークグレイの「x」の欄は、種々の理由で変異させることができなかった。ヒトIL-15がすでにその位置にチロシンが含まれているため、残基26(Y)は、チロシンに変異することができなかった。残基71(N)において、タンパク質はすでにN-X-S N-グリコシル化モチーフを含むため、N-X-S N-グリコシル化モチーフを導入することができなかった。残基79(N)において、タンパク質はすでにN-X-T N-グリコシル化モチーフを含むため、N-X-T N-グリコシル化モチーフを導入することができなかった。残基113(T)において、N-グリコシル化モチーフが3アミノ酸長(N-X-SまたはN-X-T)を含むため、N-グリコシル化部位をタンパク質の最後から2番目の基に導入できない。残基114(S)において、N-グリコシル化モチーフが3アミノ酸長を含むため、N-グリコシル化部位をタンパク質の最後の残基に導入できない。

#### 【0127】

図6A~図6Bに示す及び本明細書の他の箇所に記載する教示を考慮して、当業者は、以下を認識する。1)PEG部分を固定するために変異体が導入される、可能性のある70残基がある(すなわち、70のライトグレイの列がある)。2)可能性のある70残基のうち、残基46(E)が試験した変異体のいずれかを有する活性タンパク質を生成しなかったため、69残基は、それらをPEG部分を固定させるための実行可能な候補とする特性を保持することを、更なる評価は示した。3)すでにチロシンである残基26を除いて、チロシンは69残基のそれぞれと置換して、生理活性タンパク質を産生できる。4)残基26(Y)、41(K)、57(A)及び71(N)を除いて、システインは69残基のそれぞれと置換して、生理活性タンパク質を産生できる。5)残基3(V)、23(A)~26(Y)、33(P)、37(V)~39(A)、41(K)、45(L)、67(I)、83(S)、86(K)及び101(Q)を除いて、N-X-Sグリコシル化モチーフは69残基のそれぞれで生成されて、生理活性タンパク質を産生できる。上述したように、それらが天然型ヒトIL-15の最後の2残基を表すので、残基113(T)及び114(S)はグリコシル化部位を収容することができない。残基71(N)はすでに、N-X-Sグリコシル化モチーフのアスパラギンを表す。6)残基3(V)、23(A)~28(E)、33(P)、37(V)~39(A)、41(K)、45(L)、67(I)、83(S)、86(K)、101(Q)及び104(V)を除いて、N-X-Tグリコシル化モチーフは69残基のそれぞれで生成され得る。上述したように、それらが天然型ヒトIL-15の最後の2残基を表すので、残基113(T)及び114(S)はグリコシル化部位を収容することができない。残基79(N)はすでに、N-X-Tグリコシル化モチーフのアスパラギンを表す。

#### 【0128】

IL-15の改変された形態の免疫原性の考察

免疫原性、対象の体液性(B細胞)及び/または細胞媒介性(T細胞)の免疫反応を誘発する抗原の能力は、「望ましい」または「望ましくない」として分類することができる。望ましい免疫原性は通常、ワクチン注射により誘発される病原体(例えば、ウイルスまたは細菌)に対して開始する対象者の免疫応答を意味する。本文脈中、免疫応答は有利で

10

20

30

40

50

ある。逆に望ましくない免疫原性は通常、治療用タンパク質（例えば、IL-15）などの抗原に対して開始する対象の免疫反応を意味し、前記免疫反応は、例えば治療用タンパク質の有効性に、もしくはその薬物動態学的パラメータに悪影響を与え及び/または他の副作用に寄与する抗薬物抗体（ADA）をもたらすことができる。本文脈中、免疫反応は不利である。

#### 【0129】

タンパク質治療薬の対象の免疫反応に影響を与える、対象固有及び産生物固有の多くの要因がある。対象固有の要因は、対象の免疫状態及び反応能：アレルギーの前感作/履歴；投与経路；投与量及び頻度；対象の遺伝状態；及び内因性タンパク質に対する免疫寛容の対象の状態を含む。免疫原性に影響を与える産生物固有の要因は、産生物の起源（外因性または内因性）；産生物の1次分子構造/翻訳後修飾、3次及び4次構造など；産生物の凝集体の存在；共役化/改変（例えば、グリコシル化及びPEG化）；アジュバント活性を有する不純物；産生物の免疫調節特性；及び配合を含む。

10

#### 【0130】

自家またはヒト様ポリペプチド治療薬は、いくつかの用途では驚くべきことに免疫原性であり、及び他では驚くべきことに非免疫原性であることが証明されている。特定のIL-15ムテイン、及び他の改変型IL-15（例えば、PEG化IL-15ならびにIL及びIL-15ドメイン）は、体液性及び細胞媒介性免疫反応の範囲を誘発する可能性がある。本明細書で更に議論されるように、T細胞エピトープ及び/もしくはB細胞エピトープの除去または改変は、免疫原性を低下することができる。実際に特定の文脈において、1つ以上のアミノ酸残基と「マスキング剤」（例えば、PEG）との共役化及び/またはアミノ酸残基自身への変化（例えば、置換による）は、他の高度な免疫原性タンパク質の免疫原性を劇的に低下させることができる。

20

#### 【0131】

T細胞エピトープ。更に以下で議論するように、多くの場合2次及び3次タンパク質構造に依存する複雑な三次元B細胞エピトープとは対照的に、CD4+T細胞エピトープは、通常約11~約20アミノ酸残基長の線状ペプチド配列である。臨床免疫原性データが存在するタンパク質の範囲の比較解析は、対応するタンパク質の免疫原性を有するT細胞エピトープの存在と潜在能の間の強力な関係を示す。

#### 【0132】

インシリコのスクリーニングツールは、包括的なT細胞エピトープ評価の最初の工程としてしばしば使用される。ペプチドへのヘルパーCD4+T細胞応答の誘導は、MHCクラスIIに結合するペプチドを必要とする。このようなペプチド結合データの解析は、治療用タンパク質の開発プロセスに利用することができる。一例として、Antitope Ltd (Cambridge, UK) は、34MHCクラスII対立遺伝子へのペプチドの結合をモデル化する、インシリコ分子モデリング技術(iTope (商標))で独自技術を有する。個々のアミノ酸残基のペプチド結合への寄与は各対立遺伝子について決定することができ、それからこれらのデータは、T細胞エピトープが結合を破壊するように突然変異している「脱免疫化」配列の変異体のデザインで使用することができる。

30

#### 【0133】

更に「免疫インフォマティクス」アルゴリズム及びT細胞エピトープを同定するための他の技術は、高リスクと低リスクのカテゴリーにタンパク質治療薬をトリアージするために使用することができる。例えばタンパク質配列は、ほとんどのヒトの遺伝的背景を「包含する」8つの共通クラスIIのHLA対立遺伝子のそれぞれへの結合の可能性をその後評価される、重複9量体ペプチドフレームを解析することができる。タンパク質内の高スコアリングフレームの密度を算出することにより、タンパク質の全体的「免疫原性スコア」を推定することができる。更に潜在的な免疫原性のぎっしりつまった高スコアリングフレームまたは「クラスター」のサブ領域を、同定することができ、クラスタースコアを計算しコンパイルできる。免疫原性の他の決定と共にタンパク質の「免疫原性スコア」は、そのタンパク質が免疫反応を誘発する可能性を決定するために、その後、使用することが

40

50

できる。

【0134】

治療用タンパク質の免疫原性を低下させる更なる手段を、用いてもよい。技術（例えば、Antitopeの商品名EpiScreen（商標）ヒト生体外T細胞アッセイシステム）は、タンパク質、ペプチド、製剤などへのヘルパーCD4+T細胞応答を決定することができる。このような技術を使用して作成したデータは、出発タンパク質配列内のヘルパーCD4+T細胞エピトープをマッピングするために使用することができ、T細胞エピトープは、下記：ヒトMHCクラスIIへの結合を低減し/排除するために突然変異を設計すること；ペプチド/MHCクラスII複合体の認識を破壊するために、T細胞受容体接触残基を標的化すること；望ましいタンパク質活性を維持するために重要なアミノ酸残基の標的化及び置換を導くために、構造及び相同性解析を行うこと；及び潜在能に基づく除去のためのT細胞エピトープの優先順位付けを行うこと；のうちの1つ以上によってタンパク質から除去することができる。

10

【0135】

B細胞エピトープ。B細胞エピトープは、2つのカテゴリーのいずれかに入れることができる。第1のカテゴリーでは、エピトープはタンパク質の特定領域の一次アミノ酸配列によって定義され、エピトープの構成要素はタンパク質上に連続的に配置される。これらの線形B細胞エピトープは一般に、約5～約20アミノ酸残基長の範囲である。第2のカテゴリーでは、エピトープはタンパク質の立体構造によって定義され、エピトープの構成要素は、天然タンパク質の折り畳まれた2次または3次構造で、互いに接近するタンパク質の別個の部分に位置している。ほとんどのB細胞エピトープはタンパク質の立体構造に基づくので、B細胞エピトープは（それらの一次アミノ酸配列によって決定される）T細胞エピトープよりも同定することが困難である。

20

【0136】

以前使用された配列に基づくB細胞エピトープの予測因子の例としては、Saha S, and Raghava GP (“ABC Predict technology”) (Proteins (2006) 65: 40-48); Chen et al. (Amino Acids (2007) 33: 423-28); El-Manzaway Y, et al. (“BC Predict” technology) (J Mol Recognit (2008) 21: 243-55); Sweredoski MJ, and Baldi P (“COBEpro” technology) (Protein Eng Des Sel (2009) 22: 113-20); Wee LJ, et al. (“BayesB” technology) (BMC Genomics (2010) 11: S21); Ansari HR, and Raghava GP (“CBTOPE” technology) (Immunome Res (2010) 6: 6)に記述された技術を含む。

30

【0137】

サポートベクターマシンツール（「BEST」）を用いてB細胞エピトープを予測することは、有望な新しいB細胞エピトープの技術である（Gao J, et al. (2012) PLoS ONE 7 (6): e40104. doi: 10.1371/journal.pone.0040104）。サポートベクターマシン（SVM）により、20量体のスライドから生成した、選択スコアの平均に基づく新しいアーキテクチャを使用して、短い配列フラグメントのみから予測する多くの従来の方法とは対照的に、BEST法は抗原配列からエピトープを予測する。SVM予測因子は、既知（トレーニング）のエピトープの鎖、配列保存、類似性に由来し、ならびに2次構造及び相対的溶媒接触性を予測する情報を組み合わせることにより生成された入力のカスタムデザインのセットを利用する。更にいくつかの事業者は、B細胞エピトープを評価するために独自の技術を利用する（例えば、ProImmune's B-cell ELISpot technology; ProImmune Ltd.; Oxford, UK）。

40

【0138】

免疫原性を評価する目的で、常にではないが一般的に抗原特異的B細胞応答を刺激する

50

潜在的 T 細胞エピトープに集中することが有用である。

【0139】

IL - 15 産生の方法

本発明のポリペプチドは、非組み換え（例えば、化学合成）及び組み換え法を含む任意の適切な方法により産生することができる。

【0140】

化学合成

ポリペプチドが化学合成される場合、合成は液相または固相を介して進行できる。固相ペプチド合成（SPPS）は、非天然アミノ酸及び/またはペプチド/タンパク質骨格改変の組み込みを可能にする。9 - フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）及び t - 10  
ブチルオキシカルボニル（BOC）などの S P P S の様々な形態は、本開示のポリペプチドを合成するために利用可能である。化学合成の詳細は当該技術分野で既知である（例えば、Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6 : 3 - 10 ; 及び Camarero J. A. et al. , (2005) Protein P  
ept Lett. 12 : 723 - 8 ) 。

【0141】

固相ペプチド合成は、以下に記載されるように実施され得る。アルファ官能基（N）及び任意の反応性側鎖は、酸不安定基または塩基不安定基で保護される。保護基は、アミド結合を連結するための条件下で安定的だが、形成したペプチド鎖を損なわずに容易に切断することができる。 - アミノ官能基に適した保護基としては、下記の Boc、ベンジルオキシカルボニル（Z）、O - クロロベンジルオキシカルボニル、ピフェニルイソプロピルオキシカルボニル、tert - アミルオキシカルボニル（Amoc）、 - ジメチル - 3 , 5 - ジメトキシ - ベンジルオキシカルボニル、o - ニトロスルフェニル、2 - シアノ - t - ブトキシ - カルボニル、Fmoc、1 - ( 4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン ) エチル（Dde）などが挙げられるが、これらに限定されない。 20

【0142】

適切な側鎖保護基は、アセチル、アリル（All）、アリルオキシカルボニル（Allo）、ベンジル（Zl）、ベンジルオキシカルボニル（Z）、t - ブチルオキシカルボニル（Boc）、ベンジルオキシメチル（Bom）；o - プロモベンジルオキシカルボニル、t - ブチル（tBu）、t - ブチルジメチルシリル、2 - クロロベンジル；2 - クロロベンジルオキシカルボニル、2 , 6 - ジクロロベンジル、シクロヘキシル、シクロペンチル、1 - ( 4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン ) エチル（Dde）、イソプロピル、4 - メトキシ - 2 , 3 , 6 - トリメトキシベンジルスルホニル（Mtr）、2 , 3 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホニル（Pmc）、ピパリル、テトラヒドロピラン - 2 - イル、トシル（Tos）、2 , 4 , 6 - トリメトキシベンジル、トリメチルシリル、及びトリチル（Trt）が挙げられるが、これらに限定されない。固相合成では、C 末端アミノ酸は好適な支持体材料に結合される。好適な支持体材料は、合成工程の段階的凝縮及び切断反応のための試薬ならびに反応条件に対して不活性であるもの、ならびに使用される反応媒質に溶解しないものである。市販の支持体材料の例としては、反応基で改変され得るスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー、及び/または、ポリエチレングリコール；クロロメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマー；ヒドロキシメチル化またはアミノメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマーなどが挙げられる。 30

【0143】

ペプチド酸の調製が望ましいとき、ポリスチレン（1%） - ジビニルベンゼン、または 4 - ベンジルオキシベンジル - アルコールで誘導体化された Tentagel（登録商標）（Wang - アンカー）、または 2 - クロロトリチルクロリドを使用できる。ペプチドアミドの場合、ポリスチレン（1%） - ジビニルベンゼン、または 5 - ( 4 ' - アミノメチル ) - 3 ' , 5 ' - ジメトキシフェノキシ）吉草酸（PAL - アンカ - ）もしくは p - 40

10

20

30

40

50

(2,4-ジメトキシフェニル-アミノメチル)-フェノキシ基(Rinkアミドアンカー)で誘導化されたTentaGel(登録商標)を使用できる。

【0144】

ポリマー支持体への連結は、室温または高温(例えば40~60)で、例えば2~72時間の反応時間で、エタノール、アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、N-メチルピロリドン、または類似する溶媒中の活性化試薬を添加することにより、C末端Fmoc保護アミノ酸を支持体材料と反応させることにより達成され得る。

【0145】

N保護アミノ酸(例えばFmocアミノ酸)のPAL、WangまたはRinkアンカーへのカップリングは、例えばN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)または他のカルボジイミド; 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラート(TBTU)または他のウロニウム塩; O-アシル-尿素; ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)または他のホスホニウム塩; N-ヒドロキシスクシンイミド; 他のN-ヒドロキシイミドもしくはオキシムなどのカップリング剤を使用して、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールもしくは1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールの存在下または非存在下で; 例えばHOBtを加えたTBTUを使用して; 例えばジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、トリエチルアミンもしくはN-メチルモルホリンなどの塩基を添加してまたは添加しないで; 例えばジイソプロピルエチルアミンで反応時間2~72時間で(例えばアミノ酸及びカップリング剤の1.5倍~3倍超で、例えば2倍超で、3時間、約10~50の温度で、例えば25で、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、またはジクロロメタン、例えばジメチルホルムアミドなどの溶媒中で)実施できる。

10

20

【0146】

カップリング剤の代わりに、活性エステル(例えば、ペンタフルオロフェニル、p-トロフェニルなど)、N-Fmoc-アミノ酸の対称無水物、その酸クロリドまたはフルオリドを上記の条件下で使用することも可能である。

【0147】

N保護アミノ酸(例えば、Fmocアミノ酸)は、DIEAを添加したジクロロメタン中の2-クロロトリチル樹脂に、10~120分の反応時間で、例えば20分間で、この溶媒及びこの塩基の使用を限定せずにカップリングできる。

30

【0148】

保護アミノ酸の連続カップリングは、ペプチド合成の従来の方法に従い、通常は自動ペプチド合成装置で実行され得る。例えばジメチルホルムアミド中のピペリジン(10%~50%)で5~20分、例えばDMF中の50%のピペリジンで2x2分、及びDMF中の20%のベリジンで1x15分処理することによる、固相上に結合されたアミノ酸のN-Fmoc保護基の切断後、3~10倍超、例えば10倍超の次の保護されたアミノ酸が、約10~50、例えば25の温度で、ジクロロメタン、DMFまたはその2つの混合物などの不活性で非水性の極性溶媒中で前のアミノ酸にカップリングされる。第1のN-Fmocアミノ酸をPAL、WangまたはRinkアンカーへカップリングするための前述の試薬は、カップリング剤として適している。保護アミノ酸の活性エステルまたはクロリドまたはフルオリドまたはその対称無水物も、代替物として使用することができる。

40

【0149】

固相合成の終了時に、ペプチドは支持体材料から切断され、同時に側鎖保護基を切断する。切断は、トリフルオロ酢酸または他の強酸性の媒体をジメチルスルフィド、エチルメチルスルフィド、チオアニソール、チオクレゾール、m-クレゾール、アニソール、エタンジチオール、フェノールまたは水などの5%~20%V/Vのスカベンジャーを加えて

50

、例えば15% V/Vのジメチルスルフィド/エタンジチオール/m-クレゾール1:1:1で、0.5~3時間で、例えば2時間で実施することができる。完全に保護された鎖を有するペプチドは、氷酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン2:2:6で、2-クロロトリチルアンカーを切断することにより得られる。保護されたペプチドは、シリカゲル上のクロマトグラフィーにより精製することができる。ペプチドがWangアンカーを介して固相に連結される場合、及びC末端アルキルアミド化によってペプチドを得ることが意図される場合、切断はアルキルアミンまたはフルオロアルキルアミンを用いたアミノ分解によって実行され得る。アミノ分解は、約12~24時間(例えば、約18時間)の反応時間で、約-10~50の温度(例えば、約25)で実施する。更にペプチドを、例えばメタノールで再エステル化することにより、支持体から切断することができる。

10

## 【0150】

ペプチドを沈殿させ、したがってエーテルに残存するスカベンジャー及び切断された保護基を分離するために、得られた酸性溶液は、3~20倍量の氷エーテルまたはn-ヘキサン、例えば10倍超のジエチルエーテルと混合され得る。更なる精製は、氷酢酸からペプチドを数回再沈殿させることによって行うことができる。得られた沈殿物は、水もしくはtert-ブタノールまたはその2つの溶媒の混合物、例えばtert-ブタノール/水の1:1の混合物に取り込んで、凍結乾燥され得る。

## 【0151】

得られたペプチドは、酢酸形態中で弱塩基性樹脂のイオン交換を含む、下記の様々なクロマトグラフィー法:非誘導体化ポリスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー(例えば、Amberlite(登録商標)XAD)上の疎水性吸着クロマトグラフィー;シリカゲル上の吸着クロマトグラフィー;例えばカルボキシメチルセルロース上のイオン交換クロマトグラフィー;例えばSephadex(登録商標)G-25上の分配クロマトグラフィー;遠心向流分配クロマトグラフィー;または例えばオクチルまたはオクタデシルシリルシリカ(ODS)相上の逆相HPLCなどの高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製することができた。

20

## 【0152】

## 組み換え産生物

IL-15(例えばマウス及びヒトIL-15)は、本明細書に記載のものなど当該技術分野で既知の標準的技術を用いて多数の方法で合成することができる。IL-15はウイルス起源であり得て、Epstein Barrウイルス(BCRF1タンパク質)からクローニング及びウイルス性IL-15の発現がMooreら(1990)Science 248:1230に開示されている。更に組み換えIL-15は、多くの供給原(例えば、Life Technologies(Grand Island, NY)及びBioLegend(San Diego, CA))から市販されている。

30

## 【0153】

部位特異的突然変異(部位特異的突然変異誘発及びオリゴヌクレオチド特定の突然変異とも参照される)は、DNAに特異的突然変異を生成して、改善した望ましい特性を有する、本開示の合理的に設計されたタンパク質(例えば、特定のIL-15ドメイン及びそのドメインを含むIL-15の他の改変バージョン)を産生するために使用できる。部位特異的突然変異誘発のための技術は、当該技術分野で周知である。初期の部位特異的変異法(例えば、クンケル法;カセット変異導入法;PCR部位特異的突然変異誘発;及びSPRINTPを含む全プラスミド突然変異生成)は、Delitto perfetto(Storici F. and Resnick MA, (2006) Methods in Enzymology 409:329-45);形質転換「ポップインポップアウト」;PCR及び1つのリサイクル可能なマーカーによる直接遺伝子欠失及び部位特異的突然変異;長い相同領域を用いた、PCR及び1つのリサイクル可能なマーカーによる直接遺伝子欠失及び部位特異的突然変異;及び合成オリゴヌクレオチドによる生体内部位特異的突然変異誘発(参照、例えば:In Vitro Mutagenesis Prot

40

50



ocols (Methods in Molecular Biology), 2nd Ed. ISBN 978-0896039100) を含む様々な生体内方法などのより正確で効率的な方法により置き換えられる。更に部位特異的突然変異誘発を行うためのツールが市販されている(例えば、Stratagene Corp. (La Jolla, CA))。

#### 【0154】

ポリペプチドが組み換え技術を用いて産生される場合、ポリペプチドはそれぞれ任意の適切な構築物、及び細菌(例えば、大腸菌)などの原核細胞もしくは真核細胞であり得る、任意の適切な宿主細胞または酵母宿主細胞を用いて、細胞内タンパク質または分泌タンパク質として産生できる。宿主細胞として使用することができる真核細胞の他の例としては、昆虫細胞、哺乳類細胞及び/または植物細胞が含まれる。哺乳動物宿主細胞が使用される場合、それらは、ヒト細胞(例えば、HeLa細胞、293、H9及びJurkat細胞); マウス細胞(例えば、NIH3T3、L細胞及びC127細胞); 霊長類細胞(例えば、Cos1、Cos7及びCV1); 及びハムスター細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を含んでもよい。

10

#### 【0155】

ポリペプチドの発現に適した様々な宿主-ベクター系は、当該分野で公知の標準的な手順に従って使用することができる。例えば Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York 及び Ausubel et al., 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons を参照のこと。宿主細胞への遺伝物質の導入方法としては、例えば、形質転換、エレクトロポレーション、接合、リン酸カルシウム法などを含む。導入されたポリペプチドをコード化する核酸の安定な発現を提供するように転換する方法が選択できる。ポリペプチドをコード化する核酸は、遺伝性エピソーム要素(例えば、プラスミド)として提供することができる、またはゲノム的に統合することができる。目的のポリペプチド産生に使用する種々の適切なベクターが市販されている。

20

#### 【0156】

ベクターは、宿主細胞内の染色体外維持のために提供することができる、または宿主細胞ゲノムへの組み込みを提供することができる。発現ベクターは転写及び翻訳の調節配列を提供し、及び誘導的または構成的発現を提供することができ、コード領域は転写開始領域、転写及び翻訳終結領域の転写制御の元で作動可能に連結される。一般的に転写及び翻訳の調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を含むが、これらに限定されない。プロモーターは構成的または誘導的のいずれかであり得て、強力な構成的プロモーター(例えば、T7)であり得る。

30

#### 【0157】

発現構築物は一般的に、目的のタンパク質をコード化する核酸配列の挿入を提供するために、プロモーター配列の付近に配置される簡便な制限部位を有する。発現宿主で作動する選択マーカーは、ベクターを含む細胞の選択を容易にするために存在してもよい。更に発現構築物は、追加の要素を含んでもよい。例えば発現ベクターは1つまたは2つの複製系を有していてもよく、したがって、発現のために生物内で、例えば哺乳動物または昆虫細胞で、ならびにクローニング及び増幅のために原核生物宿主で維持することが可能である。更に発現構築物は、形質転換された宿主細胞の選択を可能にするために、選択マーカー遺伝子を含んでもよい。選択遺伝子は当該分野で公知であり、使用する宿主細胞により変化する。

40

#### 【0158】

タンパク質の単離及び精製は、当該分野で公知の方法に従って行うことができる。例えばタンパク質は、構成的に及び/または誘導時にタンパク質を発現するように、遺伝的に

50

改変された細胞の溶解物から、または免疫親和性の精製により合成反応混合物から単離することができ、それは一般的に、サンプルを抗タンパク質抗体と接触させ、非特異的に結合した物質を除去するために洗浄し、特異的に結合したタンパク質を溶出させることを含む。単離したタンパク質は更に、透析によって及びタンパク質精製に用いられる他の方法によって精製することができる。一実施形態でタンパク質は、金属キレートクロマトグラフィー法を用いて単離することができる。タンパク質は、単離を容易にするための改変を含んでもよい。

#### 【0159】

ポリペプチドは、実質的に純粋な形態または単離された形態（例えば、他のポリペプチドを含まない）で調製され得る。ポリペプチドは、存在し得る他の成分に対して（例えば他のポリペプチドまたは他の宿主細胞成分）、ポリペプチドが濃縮された組成物中に存在し得る。例えば精製されたポリペプチドは、ポリペプチドが他の発現タンパク質を実質的に含まない組成物中に、例えば約90%未満、約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満または約1%未満存在するように提供され得る。

10

#### 【0160】

IL-15ポリペプチドは、IL-15ポリペプチドをコード化することができる構築物を提供するために、当該技術分野において既知の異なるIL-15関連核酸を操作する組み換え技術を用いて生成され得る。特定のアミノ酸配列が提供されるとき、当業者は、例えば個体の分子生物学の背景及び経験を考慮して、そのようなアミノ酸配列をコード化する様々な異なる核酸分子を認識することは理解されるであろう。

20

#### 【0161】

##### アミド結合置換

いくつかの場合では、IL-15はペプチド結合以外の1つ以上の連結を含み、例えば少なくとも2つの隣接するアミノ酸はアミド結合以外の連結を介して結合される。例えば、望ましくないタンパク質分解または分解の他の手段を低減もしくは排除するため、及び/または血清の安定性を増加させるために、及び/または骨格内の立体配座の柔軟性を制限もしくは増加させるために、IL-15の主鎖内の1つ以上のアミド結合を置換できる。

#### 【0162】

別の例では、IL-15の1つ以上のアミド結合(-CO-NH-)は、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-（シス及びトランス）、-COCH<sub>2</sub>-、-CH(OH)CH<sub>2</sub>-または-CH<sub>2</sub>SO-などのアミド結合のアイソスターである連結で置換され得る。IL-15の1つ以上のアミド結合は、例えば減少したアイソスター偽ペプチド結合によっても置換され得る。Couder et al. (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41:181-184を参照のこと。そのような代替方法及びそれを達成する方法は、当業者には既知である。

30

#### 【0163】

##### アミノ酸置換

1つ以上のアミノ酸置換は、IL-15ポリペプチド内で行われる。下記は非限定的な例である。

40

#### 【0164】

a) アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、ノルロイシン、(S)-2-アミノ酪酸、(S)-シクロヘキシルアラニン、または分枝状、環状及び直鎖状アルキル、アルケニルもしくはアルキニル置換を含むC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>炭素からの脂肪族側鎖により置換された他の単純なアルファ-アミノ酸置換を含む、アルキル置換の疎水性アミノ酸の置換。

#### 【0165】

b) フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、スルホチロシン、ビフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、2-ベンゾチエニルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、ヒスチジンを含む、芳香族置換された疎水性アミノ酸の置換

50

であり、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アザ、ハロゲン化（フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード）または上述の芳香族アミノ酸のアルコキシ置換型（ $C_1 \sim C_4$ ）を含み、その代表例としては、2 -、3 - または 4 - アミノフェニルアラニン、2 -、3 - または 4 - クロロフェニルアラニン、2 -、3 - または 4 - メチルフェニルアラニン、2 -、3 - または 4 - メトキシフェニルアラニン、5 - アミノ -、5 - クロロ -、5 - メチル - または 5 - メトキシトリプトファン、2' -、3' - または 4' - アミノ -、2' -、3' - または 4' - クロロ -、2 -、3 - または 4 - ビフェニルアラニン、2' -、3' - または 4' - メチル -、2 -、3 - または 4 - ビフェニルアラニン、及び 2 - または 3 - ピリジルアラニンがある。

【0166】

c) 置換基がヘテロ原子（アルファ窒素または遠位窒素または窒素など）上、または例えばプロR位置のアルファ炭素上にあるかに関わらず、前述のアミノ酸のアルキル、アルケニルまたはアリール置換された（ $C_1 \sim C_{10}$  分枝状、直線状もしくは環状からの）誘導体を含む、アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、ホモアルギニンを含む、塩基性側鎖を含有するアミノ酸の置換。代表的例として機能する化合物は、N - イプシロン - イソプロピル - リジン、3 - (4 - テトラヒドロピリジル) - グリシン、3 - (4 - テトラヒドロピリジル) - アラニン、N, N - ガンマ, ガンマ' - ジエチル - ホモアルギニンを含む。アルファ - メチルアルギニン、アルファ - メチル - 2, 3 - ジミアノプロピオン酸、アルファ - メチルヒスチジン、アルファ - メチルオルニチンなどの化合物も含まれ、アルキル基はアルファ - 炭素のプロR位を占める。アルキル、芳香族、ヘテロ芳香族（ここでヘテロ芳香族基は、1つ以上の窒素、酸素もしくは硫黄原子を単独でまたは組み合わせて有する）、カルボン酸、または酸クロリド、活性エステル、活性アゾリド及び関連誘導体ならびにリシン、オルニチンもしくは2, 3 - ジアミノプロピオン酸などの多くの公知の活性化誘導体のいずれかも、含まれる。

【0167】

d) アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、チロシン、アルキル、アリール、アリールアルキル、及び2, 4 - ジアミノプロピオン酸、オルニチンまたはリジンのヘテロアリールスルホンアミド、ならびにテトラゾール置換したアルキルアミノ酸を含む、酸性アミノ酸の置換。

【0168】

e) アスパラギン、グルタミン、及びアスパラギンもしくはグルタミンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含む側鎖アミド残基の置換。

【0169】

f) セリン、トレオニン、ホモセリン、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、及びセリンもしくはトレオニンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含む、ヒドロキシル含有アミノ酸の置換。

【0170】

いくつかの場合では、IL - 15 は、アミノ酸の1つ以上の天然起源の非遺伝的にコード化されるL - アミノ酸、合成L - アミノ酸またはD - エナンチオマーを含む。いくつかの実施形態では、IL - 15 はD - アミノ酸のみを含む。例えばIL - 15 ポリペプチドは、下記の残基：ヒドロキシプロリン、 - アラニン、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、m - アミノメチル安息香酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、 - アミノイソ酪酸、N - メチルグリシン（サルコシン）、オルニチン、シトルリン、t - ブチルアラニン、t - ブチルグリシン、N - メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン、ナフチルアラニン、ピリジルアラニン、3 - ベンゾチエニルアラニン、4 - クロロフェニルアラニン、2 - フルオロフェニルアラニン、3 - フルオロフェニルアラニン、4 - フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸、 - 2 - チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、ホモアルギニン、N - アセチルリシン、2, 4 - ジアミノ酪酸、ロー - アミノフェニルアラニン、N - メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン

10

20

30

40

50

、 $\alpha$ -アミノヘキサ酸、 $\beta$ -アミノヘキサ酸、 $\alpha$ -アミノヘプタン酸、 $\beta$ -アミノオクタ酸、 $\alpha$ -アミノデカン酸、 $\beta$ -アミノテトラデカン酸、シクロヘキシルアラニン、 $\alpha$ -ジアミノ酪酸、 $\beta$ -ジアミノプロピオン酸、 $\alpha$ -アミノ吉草酸、2,3-ジアミノ酪酸のうちの一つ以上を含むことができる。

#### 【0171】

追加の改変

システイン残基またはシステイン類似体は、ジスルフィド結合を介して別のペプチドに結合を提供するために、またはIL-15ポリペプチドの環化を提供するために、IL-15ポリペプチドに導入され得る。システインまたはシステイン類似体を導入する方法は、当該技術分野で既知である（例えば米国特許第8,067,532号を参照）。環化の他の手段は、オキシムリンカーまたはランチオニンリンカーの導入を含む。例えば米国特許第8,044,175号を参照。環化結合を形成することができるアミノ酸（または非アミノ酸部分）の任意の組み合わせが使用される、及び/または導入することができる。環化結合は、アミノ酸（またはアミノ酸と $-(CH_2)_n-CO-$ もしくは $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$ ）と、架橋の導入を可能にする官能基との任意の組み合わせを用いて生成することができる。いくつかの例は、ジスルフィド、ジスルフィド模倣体（例えば $-(CH_2)_n$ -カルバ架橋、チオアセタール、チオエーテル架橋（シスタチオニンまたはランチオニン））ならびにエステル及びエーテルを含有する架橋である。これらの例では、 $n$ は任意の整数であり得るが、往々にして10未満である。

10

#### 【0172】

他の改変は、例えばN-アルキル（またはアリール）置換（ $[CONR]$ ）、またはラクタム及び他の環状構造を構築するための骨格架橋を含む。他の誘導体は、C末端ヒドロキシメチル誘導体、*o*-修飾誘導体（例えば、C-末端ヒドロキシメチルベンジルエーテル）誘導体；アルキルアミド及びヒドラジドなどの置換アミドを含むN-末端修飾誘導体を含む。

20

#### 【0173】

場合によっては、IL-15ポリペプチドの一つ以上のL-アミノ酸は、一つ以上のD-アミノ酸で置換される。

#### 【0174】

場合によっては、IL-15ポリペプチドポリペプチドは、レトロインベルソ類似体である（例えばSela and Zisman (1997) FASEB J. 11: 449参照）。レトロインベルソペプチド類似体は線状ポリペプチドの異性体であり、そのアミノ酸配列の方向は逆転し（レトロ）、例えばL-アミノ酸の代わりにD-アミノ酸を用いて、内部の一つ以上のアミノ酸のキラリティ、D体もしくはL体が反転した（インベルソ）[例えば、Jameson et al. (1994) Nature 368: 744；及びBrady et al. (1994) Nature 368: 692参照]。

30

#### 【0175】

IL-15ポリペプチドは「タンパク質導入ドメイン」（PTD）を含むことができ、それは、脂質二層、ミセル、細胞膜、オルガネラ膜もしくは小胞膜を横断することを支援する、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物または有機もしくは無機分子を意味する。別の分子に結合したPTDは、細胞外空間から細胞内空間へ、またはオルガネラ内の細胞質ゾルへ行くために、膜を横断する分子を支援する。いくつかの実施形態においては、PTDはIL-15ポリペプチドのアミノ末端に共有結合するが、一方他の実施形態においては、PTDはIL-15ポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合する。代表的なタンパク質形質導入ドメインとしては、最小のウンデカペプチドタンパク質導入ドメイン（YGRKKRRQRRR；配列番号11を含むHIV-1TATの残基47~57に対応する）；細胞内に直接組み入れるのに十分なアルギニン残基の数を含むポリアルギニン配列（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10または10~50アルギニン）；VP22ドメイン（Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9(6): 489-96）；ショウジョウバエのアンテナペディアタンパク質形

40

50

質導入ドメイン；(Noguchi et al. (2003) Diabetes 52 (7) : 1732 - 1737)；切断されたヒトカルシトニンペプチド (Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21 : 1248 - 1256)；ポリリシン (Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 13003 - 13008)；RRQRRTSKLMKR (配列番号7)；トランスポートタンク GWT LNSAGYLLGKINLKALAA LAKKIL (配列番号8)；KALAW EAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKEA (配列番号9)；及び、RQIKIWFQNR RMKWKK (配列番号10)を含むが、これらに限定されない。代表的なPTDは、YGRKKRRQR RR (配列番号11)；RKRRQR RR (配列番号12)；3アルギニン残基～50アルギニン残基のアルギニンホモポリマーを含むがこれらに限定されない。代表的なPTDドメインアミノ酸配列は、YGRKKRRQR RR (配列番号13)；RKKRRQR RR (配列番号14)；YARAAARQARA (配列番号15)；THRLPRRRRRR (配列番号16)；及びGRRRARRRRRR (配列番号17)のいずれかを含むが、これらに限定されない。

#### 【0176】

IL-15ポリペプチドのC末端のアミノ酸のカルボキシル基COR<sub>3</sub>は、遊離形態(R<sub>3</sub> = OH)で、または生理学的に耐性のある、例えばナトリウム、カリウムもしくはカルシウム塩などアルカリもしくはアルカリ土類塩の形態などで存在することができる。カルボキシル基は、例えばメタノール、分枝状もしくは非分枝状C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルアルコール、例えばエチルアルコールもしくはtert-ブタノールなどの1級、2級または3級アルコールでエステル化もされ得る。カルボキシル基は、アンモニア、分枝状もしくは非分枝状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルアミン、またはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>ジアルキルアミン、例えばメチルアミンまたはジメチルアミンなどの1級または2級アミンでアミド化もできる。

#### 【0177】

IL-15ポリペプチドのN末端のアミノ酸NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>のアミノ基は、遊離形態(R<sub>1</sub> = H及びR<sub>2</sub> = H)で、または例えば塩化物もしくは酢酸塩などの生理学的に許容される塩の形態で存在し得る。アミノ基は、R<sub>1</sub> = H及びR<sub>2</sub> = アセチル、トリフルオロアセチルまたはアダマンチルであるように、酸でアセチル化もされ得る。アミノ基は、上記で提供されるものなどペプチド化学で従来より使用されているアミノ保護基で保護された形態でも存在し得る(例えば、Fmoc、ベンジルオキシ-カルボニル(Z)、Boc、及びAlloc)。アミノ基はN-アルキル化されることができ、R<sub>1</sub>及び/またはR<sub>2</sub> = C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルもしくはC<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニルもしくはC<sub>7</sub>～C<sub>9</sub>アララルキルである。アルキル残基は、直鎖、分枝状または環状(例えばそれぞれエチル、イソプロピル及びシクロヘキシル)であり得る。

#### 【0178】

IL-15機能を増強する及び/または模倣するための特定の修飾

本明細書に開示された治療法(例えば、IL-15ムテイン)及び/またはそれらを投与方法における1つ以上の物理的特性を向上させることは、しばしば有益であり、時には必須である。物理的特性の改善は、例えば免疫原性を調節すること；水溶解性、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び/もしくは治療半減期、ならびに/または生物学的活性を増加する方法を含む。特定の改変は、例えば検出アッセイ(例えばエピトープタグ)で使用するための抗体を産生するために、及びタンパク質精製の容易性を提供するためにも有用であり得る。このような改変は一般的に、治療モダリティの生物活性に悪影響を与えないことなく(もしくは名目上与えないことなく)、及び/またはその免疫原性を増大させることなく付与される必要がある。

#### 【0179】

IL-15のPEG化は、本開示により想到される特定の改変であり、一方他の改変は、グリコシル化(N-及びO-結合)；ポリシリル化；血清アルブミンを含むアルブミン融合分子(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、シヤノ血清アルブミンまたはウシ血清アルブミン(BSA))；例えば共役型脂肪酸鎖によるアルブミン結合(アシル化)

；及び、Fc融合タンパク質を含むが、これらに限定されない。更にPEG模倣体は、本明細書で意図する他の薬物を表す。

#### 【0180】

PEG化：タンパク質治療薬の臨床効果は、短い血漿半減期及びプロテアーゼ分解を受けやすいことにより制限されることが多い。このような困難性が、非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコールもしくはポリオキシアルキレンの多様なポリペプチド配列のいずれかと共役化し、または連結することを含む、様々な改変により克服され得ることを、様々な治療用タンパク質の研究は示している。これは、タンパク質及び非タンパク質ポリマー、例えばPEGの両方に共有結合された連結部分によりしばしば行われる。このようなPEG共役型生体分子は、良好な物理的及び熱的安定性、酵素分解の感受性に対する保護、増大した溶解性、長い生体内循環半減期及び低下したクリアランス、低下した免疫原性及び抗原性、ならびに低下した毒性を含む、臨床的に有用な特性を有することが示される。

10

#### 【0181】

ポリペプチド配列への共役化に適したPEGは一般的に室温で水溶性であり、及び一般式 $R(O-CH_2CH_2)_nO-R$ を有し、式中Rは水素またはアルキルまたはアルカノール基などの保護基であり、nは1~1000の整数である。Rが保護基である場合、それは一般的に1~8つの炭素を有する。ポリペプチド配列に共役化したPEGは、直鎖状または分枝状であり得る。分枝状PEG誘導体、「スターPEG」及び多分岐PEGは、本開示により想到される。本開示で使用されるPEGの分子量は、任意の特定の範囲に制限されていない。特定の実施形態は5kDa~20kDaの間の分子量を有し、他の実施形態は4kDa~10kDaの間の分子量を有する。追加の分子量を有するPEGを記載する更なる実施形態は、本明細書の他の箇所に記載される。

20

#### 【0182】

本開示は共役体の組成物も想到し、PEGは異なるn値を有し、したがって様々な異なるPEGは特定の割合で存在する。例えばいくつかの組成物は共役体の混合物を含み、ここでn=1、2、3及び4である。いくつかの組成物で共役体のパーセントは、n=1の場合18~25%、n=2の場合50~66%、n=3の場合12~16%、n=4の場合最大5%である。このような組成物は、当該技術分野で既知の反応条件及び精製方法により産生できる。代表的な反応条件は、本明細書の至るところに記載されている。カチオン交換クロマトグラフィーは共役体を分離するために使用され、次に、例えば所望の数のPEGが付着され、精製された共役体を含むし、非改変タンパク質配列及び他の数のPEGが付着した共役体を含まないフラクションが同定される。

30

#### 【0183】

PEG化は最も頻繁に、ポリペプチドのN終端のアルファ-アミノ基、リシン残基の側鎖上のイプシロン-アミノ基、及びヒスチジン残基の側鎖上のイミダゾール基で起こる。ほとんどの組み換えポリペプチドは単一のアルファ及び多数のイプシロンアミノならびにイミダゾール基を有しているので、多くの位置異性体はリンカー化学物質に応じて生成できる。当該分野で既知の一般的なPEG化計画を、本明細書で適用することができる。PEGは、ポリペプチド配列の1つ以上の遊離アミノ基またはカルボキシル基とポリエチレングリコールの間の結合を媒介する末端反応性基(「スペーサー」)を介して、本開示のポリペプチドに結合することができる。遊離アミノ基に結合し得るスペーサーを有するPEGは、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシニルイミドで活性化させることにより調製され得る、N-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールを含む。遊離アミノ基に結合され得る別の活性化されたポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルを塩化シアヌルと反応させることにより調製され得る、2,4-ビス(O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンである。遊離のカルボキシル基に結合する活性化ポリエチレングリコールは、ポリオキシエチレンジアミンを含む。

40

#### 【0184】

50

スパーサーを有する PEG への本開示のポリペプチド配列のうちの 1 つ以上の共役化は、様々な従来の方法により実行され得る。例えば共役化反応は、pH 5 ~ 10 の溶媒中、4 ~ 室温の温度、30 分 ~ 20 時間、タンパク質対試薬のモル比が 4 : 1 ~ 30 : 1 で実施できる。反応条件は、主に望ましい程度の置換を産生するように、反応を誘導することを選択できる。一般に、低温、低 pH (例えば pH = 5) 及び短い反応時間は、接合される PEG の数を減少させる傾向があり、一方、高温、中性 ~ 高 pH (例えば pH 7) 及び長い反応時間は、共役化される PEG の数を増加させる傾向がある。当該技術分野で既知の種々の手段は、反応を停止するために使用できる。いくつかの実施形態では、反応は、反応混合物を酸性化し、かつ例えば -20 で凍結することにより停止する。種々の分子の PEG 化は、例えば米国特許第 5,252,714 号、同第 5,643,575 号、同第 5,919,455 号、同第 5,932,462 号及び同第 5,985,263 号に記載されている。

10

**【0185】**

上述したように PEG 化は最も頻繁に、N 末端、リシン残基の側鎖及びヒスチジン残基の側鎖上のイミダゾール基で起こる。このような PEG 化の有用性は、例えば反応条件の最適化及び精製工程の改善による精密化で強化される。最近の残基特異的化学反应は、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、セリン、トレオニン及びチロシン、ならびにカルボキシ末端の PEG 化を可能にする。このいくつかのアミノ酸残基は特異的に PEG 化できるが、他はより無差別的である、または特定の条件下で部位特異的 PEG 化のみをもたらす。

20

**【0186】**

追加のアミノ酸残基の PEG 化を可能にする現在のアプローチは、架橋 PEG 化 (ジスルフィド架橋)、酵素 PEG 化 (グルタミン及び C 末端) 及びグリコ PEG 化 (O-及び N-グリコシル化部位、または糖タンパク質のグリカン)、ならびにヘテロ二機能性 PEG 化を含む。更なるアプローチは、非天然アミノ酸を含むタンパク質の PEG 化、C 末端 PEG 化のためのインテイン融合タンパク質、トランスグルタミナーゼ介在 PEG 化、ソルターゼ A 介在 PEG 化及び分離可能かつ非共有結合 PEG 化が示される。更に遺伝子工学技術を用いた特定の PEG 化アプローチの組み合わせは、例えば直交する反応基を含有する天然または非天然アミノ酸とポリペプチドの特定のアミノ酸残基との置換によって、ポリエチレングリカンポリマーがタンパク質表面の任意の位置に本質的にカップリングすることを可能にする。一般的に例えば、Pasut, G. and Veronese, F.M., (2012) J. Controlled Release 161: 461-72; Roberts, M.J. et al., (2012) Advanced Drug Delivery Rev. 64: 116-27; Jevsevar, S. et al., (2010) Biotechnol. J. 5: 113-28; 及び Yoshioka, Y. (2011) Chem. Central J. 5: 25 を参照のこと。

30

**【0187】**

PEG 化分子の治療上の価値は十分に検証されている。以前の及び / または現在の医薬品は、OMONTYS (Affymax / Takeda); PEGLOTICASE (Savient); CIMZIA (Nektar / UCB Pharma); MACUGEN (Pfizer); NEULASTA (Amgen); SOMAVERT (Pfizer); PEGASYS (Roche); DOXIL (Ortho Biotech) 及び PEGINTRON (Schering-Plough) を含む。

40

**【0188】**

本開示は PEG 模倣体の使用も想到する。いくつかの追加の有利な性質を付与する一方で、PEG の特質 (例えば強化された血清半減期) を保持する組み換え PEG 模倣体が開発された。一例として、PEG に類似する伸長した立体構造を形成することができる単純なポリペプチド鎖 (例えば Ala、Glu、Gly、Pro、Ser 及び Thr を含む) は、既に目的のペプチドまたはタンパク質薬物に融合された状態で、組み換えにより産生され得る (例えば Amunix' XTEN technology (Mountain

50

View、CA))。これは、製造過程中に更なる共役化工程の必要性を取り除く。更に確立された分子生物学技術は、ポリペプチド鎖の側鎖組成の制御を可能にし、免疫原性及び製造特性の最適化を可能にする。

【0189】

グリコシル化：本開示の目的のため、「グリコシル化」は、グリカンタンパク質、脂質または他の有機分子に結合する酵素プロセスを広く指すことを意味する。

【0190】

本開示と関連した用語「グリコシル化」の使用は一般的に、1つ以上の炭水化物部分を付加する、もしくは欠失させる（潜在するグリコシル化部位を除去することによる、または化学及び/もしくは酵素手段によりグリコシル化を欠失させることによる）、ならびに/または天然配列に存在しても存在しなくてもよい1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することが意図される。更に前記語句は、存在する様々な炭水化物部分の性質及び比率の変化を含有する、天然タンパク質のグリコシル化の質的变化を含む。

10

【0191】

グリコシル化はIL-15などのポリペプチドの物理的性質（例えば溶解度）に劇的に影響を与える可能性があり、タンパク質の安定性、分泌及び細胞内局在性にも重要であり得る。グリコシル化ポリペプチドは更に、強化された安定性を示すことができる、または半減期など1つ以上の薬物動態特性を改善することができる。更に溶解度の改善は例えば、非グリコシル化ポリペプチドを含む製剤よりも、医薬品投与でより適した製剤の生成を可能にすることができる。

20

【0192】

適切なグリコシル化は、生物活性に必須であり得る。実際、真核生物からのいくつかの遺伝子は、グリコシル化タンパク質の細胞過程を欠く細菌（例えば、E. coli）で発現されるとき、それらのグリコシル化の欠失の理由により、ほとんどまたはまったく活性がなく回収されるタンパク質をもたらす。

【0193】

グリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変更することにより達成され得る。ポリペプチドの変更は例えば、1つ以上のセリンもしくはスレオニン残基（O-結合グリコシル化部位において）もしくはアスパラギン残基（N-結合グリコシル化部位において）の付加、またはそれによる置換により行うことができる。各種類に見られるN-結合及びO-結合オリゴ糖及び糖残基の構造は、異なってもよい。両方に一般的に見られる糖の1つの種類は、N-アセチルノイラミン酸（以後シアル酸と称する）である。シアル酸は通常N-結合及びO-結合オリゴ糖の両方の末端残基であり、その負の電荷により、糖タンパク質に酸性の性質を付与することができる。本開示の特定の実施形態は、N-グリコシル化変異体の生成及び使用を含む。

30

【0194】

本開示のポリペプチド配列は、核酸レベルでの変化を通じて、特に所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生成されるように予め選択された塩基でポリペプチドをコード化する核酸を突然変異させることにより、任意に変更することができる。ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学または酵素カップリングによる。炭水化物の除去は、化学的もしくは酵素的に、またはグリコシル化されるアミノ酸残基をコード化するコドンの置換により達成され得る。化学的脱グリコシル化技法は公知であり、ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素切断は、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。

40

【0195】

ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）欠損チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、組み換え糖タンパク質の生成のために、一般的に使用される宿主細胞である。これらの細胞は酵素ベータ-ガラクトシドアルファ-2,6-シアルルトランスフェラーゼを発現せず、したがってアルファ-2,6結合におけるシアル酸を、これらの細胞で生成された糖タンパク質のN-連結オリゴ糖に付加しない。

50



## 【0196】

ポリシアル化：本開示は、ポリシアル化の使用、ポリペプチドの安定性及び生体内薬物動態を改善するための、天然起源の生分解性 - (28) 結合ポリシアル酸 (「PSA」) へのポリペプチドの共役化も想到する。PSAは、高度に親水性である生分解性、非毒性の天然ポリマーであり、血中においてその血清半減期を増加させる大きな見かけ上の分子量を付与する。更にペプチド及びタンパク質の治療薬の範囲のポリシアル化は、著しく減少したタンパク質分解、生体内活性の維持、ならびに免疫原性及び抗原性の減少をもたらした (例えば、G. Gregoriadis et al., Int. J. Pharmacoeutics (2005) 300 (1-2) : 125-30を参照)。他の共役体 (例えば、PEG) による改変と同様に、部位特異的ポリシアル化の様々な技法が利用可能である (例えば、T. Lindhout et al., PNAS 108 (18) 7397-7402 (2011)を参照)。

10

## 【0197】

アルブミン融合：共役化のための追加の好適な成分及び分子としては、ヒト血清アルブミン (HSA)、カニクイザル血清アルブミン、及びウシ血清アルブミン (BSA) などのアルブミンが挙げられる。

## 【0198】

約20日の血清半減期を有する成熟HSA、585アミノ酸のポリペプチド (約67 kDa) は、膠質浸透血圧の維持、血液pHならびに多数の内因性及び外因性リガンドの輸送及び分布を主に担う。タンパク質は3つの構造的に相同のドメイン (ドメインI、II及びIII) を有し、ほぼ完全にアルファヘリックスの構造にあり、17のジスルフィド架橋により高度に安定化される。アルブミンの3つの主要な薬物結合領域は、サブドメイン内の3つのドメインIB、IIA及びIIIAの各々に位置する。

20

## 【0199】

アルブミン合成は肝臓で行われ、これは短寿命の一次産物であるプレプロアルブミンを生成する。したがって完全長のHSAは、18つのアミノ酸 (MKWVTFISLLFLFSSAYS; 配列番号40) のシグナルペプチド、続いて6つのアミノ酸のプロドメイン (RGVFRR; 配列番号41) を有し、この24アミノ酸残基はプレ-プロドメインと称され得る。HSAは、プレ-プロドメインとしてのその内因性シグナルペプチドを用いて、発現かつ分泌することができる。あるいはHSAは、成熟構築物に融合したIgKシグナルペプチドを用いて、発現かつ分泌することができる。プレプロアルブミンは、そのアミノ末端で、小胞体内腔において素早く共翻訳的に切断されて、安定した609アミノ酸前駆体ポリペプチド、プロアルブミンを生成する。次いでプロアルブミンはゴルジ装置へと通過し、ここでそれはフーリン依存性アミノ末端切断により、585アミノ酸成熟アルブミンに変換される。

30

## 【0200】

アルブミンの一次アミノ酸配列、構造及び機能は、アルブミン合成及び分泌のプロセスであるために、種にわたり高度に保存される。HSAと同等のアルブミン血清タンパク質は、例えばカニクイザル、ウシ、イヌ、ウサギ及びラットに見出される。非ヒト種のうち、ウシ血清アルブミン (BSA) はHSAに最も構造的に類似している (例えばKosa et al., Nov 2007 J Pharm Sci. 96 (11) : 3117-24参照)。本開示は、例えば薬物開発プロセスにおいて上に記載されるものを含むが、これらに限定されない、非ヒト種からのアルブミンの使用を想定する。

40

## 【0201】

本開示によると、アルブミンは、薬物分子 (例えば、本明細書に記載されるポリペプチド) のカルボキシル末端、アミノ末端、カルボキシル末端とアミノ末端の両方で、及び内部に共役化され得る (例えば、米国特許第5, 876, 969号及び米国特許第7, 056, 701号を参照されたい)。

## 【0202】

本開示により想定されるHSA - 薬物分子共役体において、アルブミン分泌プレ配列及

50

びその変異体、その断片及び変異体、ならびにH S A変異体などの様々な形態のアルブミンが使用され得る。そのような形態は概して、1つ以上の所望のアルブミン活性を有する。追加の実施形態では、本開示は、直接もしくは間接的にアルブミン、アルブミン断片、及びアルブミン変異体などに融合されるポリペプチド薬物分子を含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は非融合薬物分子よりも高い血漿安定性を有する、及び/または融合タンパク質は非融合薬物分子の治療活性を維持する。いくつかの実施形態では、間接的融合は、ペプチドリンカーまたはその改変された型などのリンカーによってもたらされる。

#### 【0203】

細胞内切断は、例えばフリーリンまたはカスパーゼによって酵素的に行われてもよい。細胞は低レベルのその内因性酵素を発現し、これは融合分子の一部を細胞内で切断することができる。したがってポリペプチドのうちのいくつかは、H S Aに共役化されずに細胞から分泌されるが、一方、他はH S Aを含む融合分子の形態で分泌される。本開示の実施形態は、様々なフリーリン融合構築物の使用を想定する。例えば配列R G R R (配列番号18)、R K R K K R (配列番号19)、R K K R (配列番号20)またはR R R K K R (配列番号21)を含む、構築物が設計されてもよい。

10

#### 【0204】

本開示はまた、細胞外切断(生体外切断)を想定し、それにより融合分子は細胞から分泌され、精製に供され、次いで切断される。切断は、成熟I L - 15からH S A - リンカー複合体全体、またはH S A - リンカー複合体全体未満を解離し得ることが理解される。

#### 【0205】

上述のように、本開示の1つ以上のポリペプチドへのアルブミンへの融合は、例えばH S Aをコード化する核酸、またはそのフラグメントが、1つ以上のポリペプチド配列をコード化する核酸に接合されるように遺伝子操作で実施できる。その後、好適な宿主は、融合ポリペプチドを発現するように、例えば好適なプラスミドの形態の融合されたヌクレオチド配列で形質転換される、またはそれを遺伝子導入され得る。発現は、例えば原核細胞もしくは真核細胞から試験管内で、または例えば遺伝子導入生物から生体内でもたらされ得る。本開示のいくつかの実施形態では、融合タンパク質の発現は、哺乳動物細胞株、例えばC H O細胞株において実施される。形質転換は、外因性の遺伝的物質(外因性核酸)の細胞膜を通過する直接的な取り込み、組み込み及び発現によって生じる、細胞の遺伝子変異を指すように本明細書において広く使用される。形質転換はいくつかの細菌において天然に生じるが、他の細胞において人工的な手段によってももたらされ得る。

20

30

#### 【0206】

更にアルブミン自体は、その循環半減期を延長するように改変され得る。改変アルブミンのI L - 15への融合は、上述の遺伝的操作法により、または化学的共役化により達成され得、得られた融合分子は非改変アルブミンとの融合物の半減期を超える半減期を有する(W O 2 0 1 1 / 0 5 1 4 8 9号参照)。

#### 【0207】

代替的なアルブミン結合戦略:いくつかのアルブミン結合方法が、共役型脂肪酸鎖を介したアルブミン結合(アシル化)を含む、直接融合の代替物として開発されている。血清アルブミンは脂肪酸の輸送タンパク質であるため、アルブミン結合活性を有するこれらの天然リガンドは、小タンパク質治療薬の半減期の延長に使用されている。例えば、承認された糖尿病の製品であるインスリンデテムル(L E V E M I R)は、遺伝的に改変されたインスリンに共役化したミスチル鎖を含み、長期作用インスリン類似体をもたらす。

40

#### 【0208】

本開示は、アルブミン結合ドメイン(A B D)ポリペプチド配列、及び本明細書に記載されるポリペプチドの1つ以上の配列を含む、融合タンパク質を想定する。文献に記載されるいずれのA B Dポリペプチド配列も、融合タンパク質の成分であり得る。融合タンパク質の成分は所望により、本明細書に記載されるそれらのリンカーなどのリンカーを介して、共有結合させることができる。本開示のいくつかの実施形態では、融合タンパク質は、N末端部分としてのA B Dポリペプチド配列、及びC末端部分としての本明細書に記載

50

されるポリペプチドを含む。

【0209】

本開示はまた、アルブミン結合ポリペプチドの断片を含む融合タンパク質を想定し、断片は、実質的に、アルブミン結合を維持する、または単量体単位としての少なくとも2つのアルブミン結合ポリペプチドもしくはそれらの断片を含む、アルブミン結合ポリペプチドもしくはそれらの断片の多量体を維持する。A B D及び関連技術の一般考察に関しては、W O 2 0 1 2 / 0 5 0 9 2 3号、W O 2 0 1 2 / 0 5 0 9 3 0号、W O 2 0 1 2 / 0 0 4 3 8 4号、及びW O 2 0 0 9 / 0 1 6 0 4 3号を参照されたい。

【0210】

他の分子との共役化：共役化のための追加の好適な成分及び分子は、例えば、チログロブリン；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリアミノ酸（ポリ（D - リジン；D - グルタミン酸）など）；ロタウイルスのV P 6ポリペプチド；インフルエンザウイルスヘマグルチニン、インフルエンザウイルスヌクレオタンパク質；キーホールリンペットヘモシアニン（K L H）；ならびにB型肝炎コアタンパク質及び表面抗原、または前述の任意の組み合わせを含む。

10

【0211】

したがって本開示は、別のポリペプチド（例えば、対象ポリペプチドとは異種であるアミノ酸配列を有するポリペプチド）などのポリペプチド配列のN末端及び/もしくはC末端での、1つ以上の追加の成分もしくは分子、または担体分子の共役体を想定する。したがって代表的なポリペプチド配列は、別の成分または分子との共役体として提供できる。

20

【0212】

共役体改変は、第2の分子に由来する更なるもしくは相補的な機能または活性を伴う活性を維持するポリペプチド配列をもたらしことができる。例えばポリペプチド配列は、例えば溶解度、貯蔵、生体内もしくは保存半減期または安定性、免疫原性の減少、遅延または制御された生体内放出などを促進するように、分子に共役化されてもよい。他の機能または活性は、非接合ポリペプチド配列に対して毒性を減少させる体、非共役化ポリペプチド配列より効率的な種類の細胞もしくは器官を標的とする共役体、または本明細書に記載される疾患、障害もしくは状態（例えば、癌）に関連する原因もしくは作用に更に対抗する薬物を含む。

【0213】

I L - 1 5ポリペプチドは、タンパク質；セファロース、アガロース、セルロースまたはセルロースビーズなどの多糖；ポリグルタミン酸またはポリリジンなどのポリマー性アミノ酸；アミノ酸コポリマー；不活性化されたウイルス粒子；ジフテリア、破傷風、コレラまたはロイコトキシン分子からのトキソイドなどの不活性化された細菌性毒素；不活性化された細菌；及び樹状細胞などの、大きくゆっくり代謝される巨大分子にも共役化され得る。このような共役化した形態は、所望する場合、本開示のポリペプチドに対して抗体を生成するように使用され得る。

30

【0214】

共役化のための追加の候補成分及び分子は、単離または精製に適したものを含む。特定の非限定的な例としては、ビオチン（ビオチン - アビジン特異的結合対）、抗体、受容体、リガンド、レクチン、または固体支持体（例えば、プラスチックもしくはポリスチレンビーズ、プレート、磁気ビーズ、試験片及び膜を含む）を含む分子などの結合分子が挙げられる。

40

【0215】

カチオン交換クロマトグラフィーなどの精製方法は、共役体をそれらの様々な分子量に効率的に分離する電荷の差によって共役体を分離するために使用され得る。例えばカチオン交換カラムは、充填され、次に約20mMの酢酸ナトリウム、pH約4で洗浄され、次に約3~5.5のpH、例えばpH約4.5で緩衝された(0M~0.5M)NaClの直線的勾配で溶出され得る。カチオン交換クロマトグラフィーによって得られた画分の内容物は、例えば質量分析、SDS-PAGEなどの従来の方法、または分子量により分子

50

実体を分離するための他の公知の方法を用いて、分子量により特定され得る。

【0216】

Fc融合分子：特定の実施形態では、本開示のポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端は、免疫グロブリンFc領域（例えば、ヒトFc）と融合されて、融合共役体（または融合分子）を形成することができる。Fc融合共役体は、生物製剤の全身半減期を増加することが示され、よって、生物製剤製品は頻繁な投与をあまり必要としない可能性がある。Fcは血管を覆う内皮細胞の新生児Fc受容体（FcRn）に結合し、結合によりFc融合分子は分解から保護され、循環内に再放出され、分子をより長く循環内に保つ。このFc結合は、内因性IgGがその長い血漿半減期を維持する機構であると考えられる。より最近のFc融合技術は、従来Fc融合共役体と比較して、生物製剤の薬物動態及び薬力学の性質を最適化するために、生物製剤の単一コピーを抗体のFc領域に連結する。

10

【0217】

他の改変：本開示は、現在既知であるまたは将来開発される、1つ以上の性質を改善するためのIL-15の他の改変の使用を想定する。そのような1つの方法の、ポリペプチド配列の特性を改変するために、他の分子に連結されたヒドロキシエチルデンブリン誘導体を利用するHES化によるポリペプチド配列の改変を含む。HES化の様々な態様は、例えば米国特許出願第2007/0134197号及び同第2006/0258607号に記載されている。

20

【0218】

本開示は、融合タグとしての低分子ユビキチン様修飾因子（SUMO）を含む融合分子を想定する（LifeSensors, Inc.; Malvern, PA）。本明細書に記載されるポリペプチドのSUMOへの融合は、発現の増強、溶解度の改善及び/または精製方法の開発の支援を含む、いくつかの有益な効果をもたらし得る。SUMOプロテアーゼはSUMOの3次構造を認識し、SUMOのC末端で融合タンパク質を切断し、したがって所望のN末端アミノ酸を伴う本明細書に記載されるポリペプチドを放出する。

【0219】

本開示は、PASylation（商標）（XL-Protein GmbH（Freising, Germany））の使用も想到する。この技術は、タンパク質の治療生物活性に悪影響を及ぼすことなく、腎系球体の孔径以上に目的のタンパク質の見かけの分子サイズを拡大させて、それによりタンパク質の腎クリアランスを低下させる。

30

【0220】

リンカー：リンカー及びその使用は上述してある。本開示のポリペプチド配列を改変するために使用される上述の成分及び分子のいずれも、リンカーを介して任意に共役化され得る。好適なリンカーは、改変されたポリペプチド配列と連結された成分及び分子との間のある程度の移動を可能にするのに一般的に十分な長さである「可動性リンカー」を含む。リンカー分子は一般的に、約6～50つの原子の長さである。リンカー分子はまた、例えばアリアルアセチレン、2～10つのモノマー単位を含有するエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二塩基酸、アミノ酸、またはこれらの組み合わせであってもよい。適切なリンカーは容易に選択することができ、1アミノ酸（例えば、Gly）、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、30～50または50超アミノ酸など任意の適切な長さであり得る。

40

【0221】

例示的な可動性リンカーは、グリシンポリマー（G）<sub>n</sub>、グリシン-セリンポリマー（例えば（GS）<sub>n</sub>、GSGGS<sub>n</sub>（配列番号22）、GGGS<sub>n</sub>（配列番号23）、（G<sub>m</sub>S<sub>o</sub>）<sub>n</sub>、（G<sub>m</sub>S<sub>o</sub>G<sub>m</sub>）<sub>n</sub>、（G<sub>m</sub>S<sub>o</sub>G<sub>m</sub>S<sub>o</sub>G<sub>m</sub>）<sub>n</sub>（配列番号：24）、（GSGGS<sub>m</sub>）<sub>n</sub>（配列番号25）、（GSGS<sub>m</sub>G）<sub>n</sub>（配列番号26）及び（GGGS<sub>m</sub>）<sub>n</sub>（配列番号：27）ならびにこれらの組み合わせであり、ここでm、n及びoは少なくとも1つの整数からそれぞれ選択される）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマーならびに他の可動性リンカーを含む。グリシン及びグリシン-セリン

50

ポリマーは比較的構造不定であり、したがって成分間のニュートラルなテザーとして機能することができる。例示の可動性リンカーは、GGSG（配列番号28）、GGSGG（配列番号29）、GSGSG（配列番号30）、GSGGG（配列番号31）、GGGSG（配列番号32）及びGSSSG（配列番号33）を含むが、これらに限定されない。

#### 【0222】

本開示の特定の実施形態において、PEGは、1つ以上のPEG分子に共有結合する活性化されたリンカーを介してIL-15に共役化している。化学的に反応し、ペプチドの反応基へ共有結合できる状態の場合、リンカーは「活性化」されている。1つ以上のPEG分子を収納し、適切な反応条件でアミノ酸残基と共有結合を形成することができる場合、本開示は任意の活性化リンカーの使用を意図する。特定の態様で活性化リンカーは、他の結合部位上に高度に選択的な方法でアミノ基に結合する（例えば、リシンのα-アミノ基またはヒスチジンのイミノ基）。

10

#### 【0223】

いくつかの実施形態において、活性化PEGは、式： $(PEG)_b - L'$ で表されることができて、ここでPEGはエーテル結合を形成するためにリンカーの炭素原子に共有結合し、bは1~9であり（すなわち、1~9つのPEG分子がリンカーに結合できる）、L'はIL-15へのPEGの共有結合を提供するために、例えばアミノ酸残基上のアミノ基またはイミノ基と反応することができる反応基（活性化部分）を含むことができる。他の実施形態では、活性化リンカー（L'）は式RCHOのアルデヒドを含み、Rは直鎖または分枝鎖のC<sub>1-11</sub>のアルキル基であり、IL-15へ活性化リンカーとの共有結合後、リンカーは2~12つの炭素原子を含む。本開示は、プロピオンアルデヒドが代表的な活性化リンカーである、実施形態を想到する。PEGプロピオンアルデヒド（CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO）は、米国特許第5,252,714号に記載されており、市販品として入手可能である（例えば、Shearwater Polymers (Huntsville, AL)）。他の活性化PEGリンカーは、例えば、Shearwater Polymers and Enzon, Inc. (Piscataway, N.J.)から市販品として入手することができる。

20

#### 【0224】

いくつかの実施形態では、2つ以上のPEG分子をIL-15に共有結合することは望ましく、適切な活性化分枝状リンカー（すなわち「多分岐」）が使用できる。2つ以上のPEG分子をIL-15のアミノ酸残基上のアミノ基（例えばN末端のα-アミノ基）へ共有結合する任意の好適な分枝状PEGリンカーを、使用できる。特定の実施形態では、本開示で想到される分枝状リンカーは、2つまたは3つのPEG分子を含む。一例として、分枝状PEGリンカーは、加水分解的に安定であり、かつ活性化部分を含む直鎖状または分枝鎖状の脂肪族基（例えば、アルデヒド基）であり得て、それは上述したとおりアミノ酸残基のアミノ基と反応し、分枝状リンカーの脂肪族基は2~12つの炭素を含むことができる。いくつかの実施形態において、脂肪族基は、例えば3つの炭素原子のそれぞれに3つのPEG分子（すなわち、合計9つのPEG分子）及びt-ブチルの4番目の炭素上に反応性アルデヒド部分を含む、t-ブチルであり得る。

30

#### 【0225】

更なる例示の分枝状PEGリンカーは、米国特許第5,643,575号、同第5,919,455号、同第7,052,868号、及び同第5,932,462号に記載されている。当業者は、例えば反応性アルデヒド部分の付加により、分枝状PEGリンカーへの改変を作製することができる。使用のためにリンカーを調製する方法も、当該技術分野で既知であり、例えば上述の米国特許に記載されている。

40

#### 【0226】

##### 治療的及び予防的使用

本開示は、疾患、障害及び/もしくは状態ならびに/またはその症状の広い範囲の治療または予防における本明細書に記載のIL-15ポリペプチド（例えばPEG-IL-15）の使用を想到する。特定の用途を以下に詳細に記載するが、本開示はそのように限定

50

されないことを理解すべきである。更に、特定の疾患、障害及び状態の一般的なカテゴリーを以下に記載するが、疾患、障害及び状態のいくつかは、2つ以上のカテゴリーに属することができ、他のものは開示されたカテゴリーのいずれかに属さない可能性がある。

【0227】

下記で更に詳述するように、IL-15は、免疫及び炎症性の機能（例えば自己免疫関連した障害（例えばリウマチ性関節炎）、サルコイドーシス、炎症性腸疾患及び移植拒否）、癌（例えば白血病、リンパ増殖症候群及び固形腫瘍）ならびに感染症（例えばHIV）と関連した疾患、障害及び状態で役割を果たすことを示した。[例えばFehniger, et al., Blood 97(1)(Jan 1, 2001)参照]。

【0228】

免疫及び炎症状態：いくつかの実施形態では、本開示は、免疫系の抑制及び免疫関連の疾患、障害及び状態の治療を想到する。本明細書で使用される場合「免疫疾患」、「免疫状態」、「免疫障害」、「炎症性状態」、「炎症性障害」、「炎症性疾患」などの用語は、広く任意の免疫または炎症性に関連する状態（例えば、病理学的炎症及び自己免疫疾患）を包含することを意味する。そのような状態はしばしば、他の疾患、障害及び状態に密接に関連している。一例として、「免疫状態」は、免疫系による根絶に抵抗する感染症（急性及び慢性）、腫瘍ならびに癌を含む、癌、腫瘍ならびに脈管形成などの増殖状態を意味することができる。

【0229】

野生型IL-15とIL-15受容体複合体の間の相互作用の結果として通常起きる、細胞事象のうちの一つ以上を阻害するのに効果的な量の投与を介して免疫機能を抑制するために、本明細書に記載のIL-15ペプチドを使用することができる。あるいは本明細書に記載のIL-15ペプチドをコード化する核酸分子または本明細書に記載のIL-15ペプチドを発現する組み換え細胞を、投与できる。特定の実施形態において、IL-15ペプチドは、IL-15受容体複合体を野生型IL-15に類似する親和性で結合するが、細胞内シグナル伝達を活性化することができない。IL-15ペプチドが効果的に野生型IL-15と競合して、IL-15シグナル伝達に反応して通常関連する事象を阻害することは、有利である。

【0230】

例えば炎症性サイトカインによって引き起こされ得る免疫及び炎症に関連する疾患、障害及び状態の非限定的リストは、関節炎（例えばリウマチ性関節炎）、サルコイドーシス、腎不全、ループス、喘息、乾癬、大腸炎、膵炎、アレルギー、線維症、手術合併症（例えば、炎症性サイトカインが治癒を妨げる場合）、貧血、及び線維筋痛症を含む。慢性炎症と関連し得る他の疾患及び障害は、アルツハイマー病、うっ血性心不全、脳卒中、大動脈弁狭窄症、動脈硬化症、骨粗しょう症、パーキンソン病、感染症、炎症性腸疾患（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）、アレルギー性接触性皮膚炎及び他の湿疹、全身性硬化症、移植ならびに多発性硬化症を含む。IL-15分子が特に有効であり得る（例えば、現在の治療法が限界であるため）上述の疾患、障害及び状態は、より詳細に下記に記載される。

【0231】

本開示のIL-15ポリペプチドは、炎症性腸疾患（IBD）の治療及び予防に特に有効であり得る。IBDはクローン病（CD）及び潰瘍性大腸炎（UC）を含み、その両者は消化管の任意の部分に影響を与えることができる突発性慢性疾患であり、それは多くの好ましくない影響に関連し、長期のUCを患う患者は大腸癌を発症するリスクが高い。現在のIBDの治療は炎症症状を制御することを目的とし、一方で特定の薬剤（例えば、コルチコステロイド、アミノサリチル酸及び標準免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン、アザチオプリン及びメトトレキサート））は限られた成功をもたらし、長期的な治療は、肝臓障害（例えば、線維症または肝硬変）及び骨髄抑制を引き起こす可能性があり、患者はしばしばそのような治療に抵抗性となり得る。

【0232】

10

20

30

40

50

乾癬、一連の一般的な免疫媒介性の慢性皮膚疾患は、米国では450万人以上の人々に影響を与え、そのうち、150万人が中等度から重症度の疾患を有していると考えられる。更に乾癬患者の10%以上が乾癬性関節炎を発症し、それは関節周囲の骨及び結合組織に損傷を与える。乾癬の根本的な生理学的理解の向上は、例えば疾患の炎症性性質の原因となるTリンパ球及びサイトカインの活性を標的とする薬剤の導入をもたらした。そのような薬剤は、ENBRELE(エタネルセプト)、REMICADE(インフリキシマブ)及びHUMIRA(アダリムマブ)などのTNF-阻害剤(関節リウマチ(RA)の治療でも使用される)、ならびにAMEVIVE(アレファセプト)、RAPTIVA(エファリズマブ)などのT細胞阻害剤を含む。これらの薬剤のいくつかは特定の患者集団である程度有効ではあるが、いずれもすべての患者を効果的に治療するためには示されない。

10

#### 【0233】

一般的に関節の膜ライニング(滑膜)の慢性炎症を特徴とするリウマチ性関節炎(RA)は、米国人口の約1%(約210万人)に影響を与えている。炎症過程におけるTNF-及びIL-1を含むサイトカインの役割の更なる理解は、新種の疾患改変性の抗リウマチ薬(DMARD)の開発及び導入が可能になった。薬剤(いくつかは他の治療法と重複する)としては、ENBRELE(エタネルセプト)、REMICADE(インフリキシマブ)、HUMIRA(アダリムマブ)及びKINERET(アナキンラ)が挙げられる。これらの薬剤のいくつかは症状を緩和し、構造的損傷の進行を阻害し、特定の患者集団における身体機能を改善するが、有効性の改善、作用の補完機構、及びより少ない/少ない重篤な有害作用を有する代替薬の必要性が依然として存在する。

20

#### 【0234】

器官及び組織の移植の拒絶反応は、特定の状況でIL-15関連成分に関係することがわかった。拒絶反応は、自然免疫応答の要素と共に、細胞性免疫及び体液性免疫により媒介される適応性免疫反応である。異種の移植臓器及び組織は、拒絶反応機能の異なるバランスをしばしば有する。腎臓、心臓、骨髄、皮膚及び血液は、最も頻繁に移植拒絶反応に関与する器官及び組織である。移植拒絶反応の治療は、拒絶反応(例えば、超急性、急性または慢性)の医学的カテゴリーによって多くの場合決定する。免疫抑制療法は、移植拒絶反応を治療する主要な手段を構成する。治療は一般的に、副腎皮質ステロイド(例えば、プレドニゾン)により開始される。併用療法は通常、カルシニューリン阻害剤(例えば、シクロスポリン及びタクロリムス)及び抗増殖剤(例えば、アザチオプリン)の添加を伴う。特定の免疫構成要素に特有の抗体は、免疫抑制療法に加えることが可能であり、抗体治療は、モノクローナル抗IL-2R受容体抗体(例えば、ダクリズマブ)及びモノクローナル抗CD20抗体(例えば、リツキシマブ)を含む。多くの状況で有用であるが、IL-15関連剤などの代替の治療物が必要である。

30

#### 【0235】

現在の治療が症状を軽減するまたは障害の進行を遅らせるだけなので、多発性硬化症(MS)、脳及び脊髄のミエリンの炎症及び瘢痕の多数の領域を含む、重篤な衰弱性の自己免疫疾患を患う対象は特に本明細書に記載のIL-15ポリペプチドによって助けられることができる。

40

#### 【0236】

IL-15の高い血清レベルは、C型肝炎により誘発された肝疾患の間ならびに肝硬変及び慢性肝炎において観察される。IL-15レベルは、肝細胞癌を患っている対象で特に上昇する。

#### 【0237】

同様にIL-15ポリペプチドは、アルツハイマー病(AD)、患者の思考、記憶、及び言語処理を著しく損なう脳障害;ならびにパーキンソン病(PD)、例えば異常運動、硬直及び震えにより特徴付けられるCNSの進行性疾患;などの神経変性障害、ならびに真性糖尿病に罹患している対象に対して特に有益であり得る。これらの障害は進行性かつ衰弱性であり、何の治療剤も使用できない。

50

## 【0238】

癌及び関連状態。本開示により、本明細書に記載のIL-15分子（例えば、ペプチド）は、IL-15受容体を発現する細胞の望ましくない増殖がある対象を治療するために用いることができる。あるいは本明細書に記載のIL-15ペプチドをコード化する核酸分子または本明細書に記載のIL-15ペプチドを発現する組み換え細胞を、投与できる。IL-15が抗増殖効果を及ぼす根底にある作用機序の理解は本開示を実践するのに必要ではないが、細胞増殖は補体依存性細胞溶解または抗体依存性細胞毒性により阻害されることができる。

## 【0239】

本明細書に記載のIL-15ペプチドは、癌、例えば子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、消化管（例えば、食道、咽頭、胃、小腸もしくは大腸、結腸、もしくは直腸）、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髄、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、膵臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳（例えば、グリオーマ）、神経節、中枢神経系（CNS）及び末梢神経系（PNS）、造血系の癌や免疫系（例えば、脾臓または胸腺）の癌を含む、増殖性状態もしくは疾患を治療または予防するために使用することができる。本開示は例えば、免疫原性腫瘍、非免疫原性腫瘍、休眠腫瘍、ウイルス誘発性癌（例えば、上皮細胞癌、内皮細胞癌、扁平上皮癌及びパピローマウイルス）、腺癌、リンパ腫（例えば、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL））、細胞腫、黒色腫、白血病、骨髄腫、肉腫、奇形癌、化学的に誘発された癌、転移、及び血管形成を含む、他の癌関連の疾患、障害もしくは状態を治療または予防する方法も提供する。

10

20

## 【0240】

特定の実施形態では、腫瘍または癌は、大腸癌、卵巣癌、乳癌、黒色腫、肺癌、神経膠芽腫、または白血病（例えばHTLV-1介在性成人T細胞白血病）である。癌関連疾患、障害及び状態の用語（複数を含む）の使用は、癌に直接または間接的に関連し、例えば脈管形成及び異形成などの前癌性状態を含む、幅広い状態を指すことを意味する。

## 【0241】

いくつかの実施形態において、本開示は、増殖性状態、癌、腫瘍もしくは前癌性状態を、IL-15分子及び少なくとも1つの追加の治療薬または診断薬、例えば本明細書の他の箇所で記載したもので、治療するための方法を提供する。

## 【0242】

ウイルス性及び細菌性状態。ウイルス性及び細菌性疾患、障害ならびに状態におけるIL-15の役割への関心が高まっている。IL-15がその受容体結合活性及び他の因子に応じて、促進効果及び抑制効果の両方を生成することを想定している。

30

## 【0243】

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に関して、IL-15は、IL-2の作用を模倣するその能力によって2つの矛盾する効果を有する。1つの効果は有益な可能性がある免疫機能の強化であり、一方で他の効果は有害な可能性があるHIV複製の活性化である。これらの対向する効果は、他のウイルス性関連障害にも存在する。緊密な時間相関が、IL-15レベルとウイルス量の変動の間に観察された。本開示は、IL-15による治療が有益であり得る、任意のウイルス性疾患、障害及び/もしくは状態の治療または予防におけるIL-15ポリペプチドの使用を想到する。想到するウイルス性疾患、障害及び状態の例には、エプスタインバールウイルス、B型肝炎、C型肝炎、HIV、ヘルペスウイルス及びサイトメガロウイルス（CMV）が含まれる。

40

## 【0244】

IL-15は最近、特定の細菌性及び他の侵襲性感染症と関連している。一例として報告は、例えばサルモネラ菌及び熱帯熱マラリア原虫によって生じる感染症の前に組み換えIL-15を投与することは、生物に対する防御及びそのクリアランスを改善することを示す。

## 【0245】

医薬組成物

50



本開示の I L - 1 5 ポリペプチドは、対象に投与するのに適した組成物の形態であり得る。一般にそのような組成物は、I L - 1 5 及び 1 つ以上の薬学的に許容されるもしくは生理学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤を含む「医薬組成物」である。特定の実施形態では、I L - 1 5 ポリペプチドは治療的に許容される量で存在する。医薬組成物は本開示の方法で使用されることができ、すなわち例えば医薬組成物は、本明細書に記載される治療法及び予防法ならびに使用を実践するために、生体外でまたは生体内で対象に投与され得る。

【 0 2 4 6 】

本開示の医薬組成物は意図される投与方法または投与経路に適合するように製剤化され得て、例示的な投与経路は本明細書に記載される。更に医薬組成物は、本開示により想定される疾患、障害及び状態を治療するまたは予防するために、本明細書に記載される、他の治療的に有効な薬剤または化合物と組み合わせて使用され得る。

10

【 0 2 4 7 】

医薬組成物は通常、治療に有効な量の本開示により想定される I L - 1 5 ポリペプチドと、1 つ以上の薬学的及び生理学的に許容される製剤用薬剤とを含む。好適な薬学的に許容されるもしくは生理学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤は、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸及び重硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、エチルもしくは n - プロピル、p - ヒドロキシベンゾエート）、乳化剤、懸濁剤、分散剤、溶媒、充填剤、増量剤、洗剤、緩衝剤、ビヒクル、希釈剤及び/または補助剤を含むが、これらに限定されない。例えば好適なビヒクルは、生理食塩溶液またはクエン酸緩衝生理食塩水であってよく、可能であれば一般的に非経口投与用の医薬組成物に他の材料が補充される。更なる例示的なビヒクルは、中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水である。当業者は、本明細書で想到する医薬組成物及び投与形態に使用することができる様々な緩衝剤を容易に認識するだろう。通常緩衝剤は、薬学的に許容される弱酸、弱塩基またはこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。一例として緩衝剤の成分は、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸及びそれらの塩などの水溶性材料であり得る。許容される緩衝剤は、例えば、トリス緩衝液、N - ( 2 - ヒドロキシエチル ) ピペラジン - N ' - ( 2 - エタンスルホン酸 ) ( H E P E S ) 、 2 - ( N - モルホリノ ) エタンスルホン酸 ( M E S ) 、 2 - ( N - モルホリノ ) エタンスルホン酸ナトリウム塩 ( M E S ) 、 3 - ( N - モルホリノ ) プロパンスルホン酸 ( M O P S ) 、 及び N - トリス [ ヒドロキシメチル ] メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 ( T A P S ) を含む。

20

30

【 0 2 4 8 】

医薬組成物が製剤化された後、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体または無水もしくは凍結乾燥された粉末として滅菌バイアルに保管され得る。そのような製剤は、すぐに使用できる形態、使用前に再構成を必要とする凍結乾燥形態、使用前に希釈を必要とする液体形態、または他の許容される形態のいずれかで保管され得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、単回使用容器（例えば、単回使用バイアル、アンプル、シリンジまたは自動注射器（例えば、E p i P e n（登録商標）に類似）で提供され、一方、多回使用容器（例えば、多回使用バイアル）は他の実施形態において提供される。任意の薬物送達装置は、I L - 1 5 を送達するために使用されることができ、移植片（例えば、移植可能なポンプ）ならびにカテーテル系、スロー注入ポンプ及び装置を含み、そのすべては当業者に周知である。一般的に皮下または筋肉内に投与されるデポ剤注射も、定義された期間にわたり、本明細書に開示されるポリペプチドを放出するために利用され得る。デポ剤注射は通常固系または油系のいずれかであり、本明細書に記載される製剤成分のうちの少なくとも 1 つを一般的に含む。当業者は、デポ剤注射の可能な製剤及び使用に精通している。

40

【 0 2 4 9 】

医薬組成物は、滅菌の注射可能な水性または油性の懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、本明細書に記載されるそれらの好適な分散剤または湿潤剤及び懸濁剤を用いた、既

50

知の技術分野に従い製剤化され得る。滅菌の注射可能な調製物も、例えば、1, 3 - ブタンジオール中の溶液などの非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌の注射可能な溶液または懸濁液であってもよい。採用され得る許容される希釈剤、溶媒、及び分散媒質は、水、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウム溶液、Cremophor EL (商標) (BASF, Parsippany, NJ)、またはリン酸緩衝食塩水 (PBS)、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール)、及びそれらの好適な混合物を含む。更に滅菌の固定油は、溶媒または懸濁媒質として常用される。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激性固定油を用いてもよい。更にオレイン酸などの脂肪酸は、注射可能物の調製に用途を見出す。特定の注射可能製剤の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤 (例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチン) を含むことにより達成され得る。

10

#### 【0250】

活性成分を含有する医薬組成物は、例えば錠剤、カプセル、トローチ剤、ロゼンジ剤、水性もしくは油性懸濁液、分散性粉末もしくは顆粒、エマルジョン、硬カプセルもしくは軟カプセル、またはシロップ、溶液、マイクロビーズ、またはエリキシル剤として、経口使用に好適な形態であり得る。経口使用を目的とする医薬組成物は、医薬組成物の製造の分野に公知の任意の方法に従い調製されることができ、そのような組成物は、薬学的に優れたかつ美味の調製物を提供するために、例えば甘味剤、風味剤、着色剤及び防腐剤などの1つ以上の薬剤を含有することができる。錠剤、カプセルなどは、錠剤の製造に適する非毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物中に活性成分を含有する。これらの賦形剤は、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、またはリン酸ナトリウムなどの希釈剤；例えばコーンスターチまたはアルギン酸などの顆粒剤及び崩壊剤；例えばデンプン、ゼラチンまたはアカシアなどの結合剤；及び例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクなどの潤滑剤であり得る。

20

#### 【0251】

経口投与に適した錠剤、カプセルなどは、消化管における崩壊及び吸収を遅らせ、それによって持続作用を提供するための既知の技法によりコーティングされても、されなくてもよい。例えばモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの時間遅延材料を用いてもよい。それらは当該技術分野に公知の技法によりコーティングされ、制御放出用の浸透性治療錠剤を形成することができる。追加の薬剤は、投与した組成物の送達を制御するために、ポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、エチレン - 酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、もしくはラクチド/グリコリドコポリマー、ポリラクチド/グリコリドコポリマー、またはエチレン酢酸ビニルコポリマーなどの生分解性もしくは生体適合性粒子またはポリマー物質を含む。例えば経口剤は、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルもしくはポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルの使用により、それぞれ、コアセルベーション技法により、もしくは界面重合により調製されたマイクロカプセル、またはコロイド薬物送達系に封入され得る。コロイド状分散系は、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロ球体、マイクロビーズ、及び脂質に基づく系を含んでおり、それは水中油型エマルジョン、ミセル、混合されたミセル及びリポソームを含む。上述の製剤を調製するための方法は当業者に明らかである。

30

40

#### 【0252】

経口使用のための製剤は、活性成分が、不活性固形希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリン、または微結晶セルロースと混合される硬ゼラチンカプセルとして、あるいは活性成分が、水、または油性媒質、例えば、ピーナッツ油、流動パラフィン、もしくはオリーブ油と混合される軟ゼラチンカプセルとして、提示されてもよい。

#### 【0253】

水性懸濁液は、その製造に適した賦形剤との混合物中に活性材料を含有する。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロー

50

ス、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントガム、及びアカシアガムであり、分散剤もしくは湿潤剤、例えば天然のホスファチド（例えば、レシチン）、またはアルキレンオキシドと脂肪酸の縮合物（例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン）、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールの縮合物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、またはエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール由来の部分エステル縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール無水物由来の部分エステル縮合物（例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエート）であり得る。水性懸濁液は、1つ以上の防腐剤も含み得る。

【0254】

油性懸濁液は、活性成分を植物油、例えば落花生油、オリーブ油、ゴマ油もしくはヤシ油中に、または流動パラフィンなどの鉱物油中に懸濁させることによって製剤化され得る。油性懸濁液は、糊剤、例えば蜜蝋、固形パラフィンまたはセチルアルコールを含有し得る。上述のものなどの甘味剤及び風味剤は、美味の経口調製物を提供するために添加され得る。

【0255】

水の添加による水性懸濁液の調製に適した分散性粉末及び顆粒は、分散剤または湿潤剤、懸濁剤及び1つまたはそれ以上の保存剤と混合した活性成分を提供し得る。好適な分散剤もしくは湿潤剤、及び懸濁剤は、本明細書において例示される。

【0256】

本開示の医薬組成物は、水中油型エマルジョンの形態でもよい。油相は、植物油、例えばオリーブ油もしくは落花生油、または鉱物油、例えば流動パラフィン、またはこれらの混合物であり得る。好適な乳化剤は、天然起源のガム（例えば、アカシアガムもしくはトラガントガム）、天然起源のホスファチド（例えば、大豆、レシチン、及び脂肪酸由来のエステルまたは部分エステル）、ヘキシトール無水物（例えば、ソルビタンモノオレエート）、ならびに部分エステルとエチレンオキシドの縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）であり得る。

【0257】

製剤は、移植片、リポソーム、ヒドロゲル、プロドラッグ、及びマイクロ封入された送達系を含む制御放出製剤などの、迅速な分解または身体からの排除に対して組成物を保護するための担体も含み得る。例えば、モノステアリン酸グリセリル、もしくはステアリン酸グリセリルなどの時間遅延材料が単独でまたは蝋との組み合わせを用いてもよい。

【0258】

本開示は、直腸投与用の坐剤の形態でのIL-15ポリペプチドの投与を想定する。坐剤は、薬物を、通常温度では固体であるが、直腸温度で液体であり、従って薬物を放出するために直腸で融解する好適な非刺激性賦形剤と混合することにより調製され得る。そのような材料は、ココアバター及びポリエチレングリコールを含むが、これらに限定されない。

【0259】

本開示により想定されるIL-15ポリペプチドは、現在既知の、また将来開発される任意の他の好適な薬学的組成物の形態（例えば、鼻または吸入用途のためのスプレー）であり得る。

【0260】

製剤中のポリペプチドまたはその断片の濃度は、広く変動し得（例えば、約0.1重量%未満、通常約2重量%または少なくとも2重量%～20重量%程度～50重量%以上）、主に、例えば選択される特定の投与形態による、流体量、粘度、及び対象に基づき、通常選択される。

【0261】

投与経路

本開示は、任意の適切な方法でIL-15分子及びその組成物の投与を想定する。好適

10

20

30

40

50

な投与経路は、非経口（例えば筋肉内、静脈内、皮下（例えば注射または移植片）、腹腔内、大槽内、関節内、腹腔内、脳内（実質内）及び脳室内）、経口、経鼻、経膈、舌下、眼内、直腸内、局所（例えば経皮）、舌下ならびに吸入を含む。一般的に皮下または筋肉内投与されるデポ剤注射も、定義された期間にわたり、本明細書に開示されるIL-15分子を放出するために利用され得る。

【0262】

本開示の特定の実施形態は非経口投与を想到し、更なる特定の実施形態で非経口投与は皮下である。

【0263】

併用療法

本開示は、1つ以上の活性治療剤（例えばサイトカイン）または他の予防または治療法（例えば放射線）と併用した、IL-15分子の使用を想定する。そのような併用療法では、様々な活性剤は、往々にして、異なる相補的な作用機序を有する。そのような併用療法は、薬剤のうちの1つ以上の用量減少を可能にし、それによって、薬剤のうちの1つ以上に関連する有害な作用を減少させる、または排除することにより特に有益である。更にそのような併用療法は、基礎疾患、障害または状態に対して相乗治療または予防作用を有し得る。

【0264】

本明細書で使用される「併用」とは、別個に投与され得る、例えば、別個に投与するために別個に製剤化される（例えば、キットに提供され得るような）療法、及び単一の製剤と一緒に投与され得る（すなわち、共製剤化）療法を含むことが意味される。

【0265】

特定の実施形態では、IL-15ポリペプチド及び1つ以上の活性治療薬または他の予防もしくは治療法は、順次投与される、または適用され、例えば1つの薬剤が1つまたは複数の他の薬剤の前に投与される。他の実施形態では、IL-15ポリペプチド及び1つ以上の活性治療薬または他の予防もしくは治療法は、同時に投与され、例えば2つ以上の薬剤が同時にまたはほぼ同時に投与され、2つ以上の薬剤は、2つ以上の別個の製剤に存在するか、または単一製剤に組み合わせられ得る（すなわち、共製剤化）。2つ以上の薬剤が順次にまたは同時に投与されるか否かに関わらず、それらは本開示の目的のために併用して投与されると考えられる。

【0266】

本開示のIL-15ポリペプチドは、状況下に適切な任意の様式で、少なくとも1つ他の（活性）薬剤と併用して使用され得る。一実施形態では、少なくとも1つの活性剤及び少なくとも1つの本開示のIL-15ポリペプチドを用いた治療は、一定の時間にわたり保持される。別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた処置は削減される、または中断され（例えば、対象が安定しているとき）、一方本開示のIL-15ポリペプチドを用いた治療は一定の投薬レジメンで保持される。更なる実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた処置は削減される、または中断され（例えば、対象が安定しているとき）、一方本開示のIL-15ポリペプチドを用いた治療は削減される（例えば、低用量、投薬頻度の減少、または処置レジメンの短縮）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた処置は削減される、または中断され（例えば、対象が安定しているとき）、一方本開示のIL-15ポリペプチドを用いた処置は増加される（例えば、高用量、投薬頻度の増加、または処置レジメンの延長）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた処置は保持され、本開示のIL-15ポリペプチドを用いた処置は削減される、または中断される（例えば、低用量、投薬頻度の減少、または処置レジメンの短縮）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた処置は保持され、本開示のIL-15ポリペプチドを用いた処置は削減される、または中断される（例えば、低用量、投薬頻度の減少、または処置レジメンの短縮）。

【0267】

免疫及び炎症状態。本開示は、ウイルス性疾患、障害及び状態、ならびにそれに関連す

10

20

30

40

50

る障害を、IL-15分子及び少なくとも1つの追加の治療薬もしくは診断薬で治療する及び/または予防するための方法を提供する。

【0268】

併用療法において有用な治療薬の例としては、アスピリン、イブプロフェンならびに他のプロピオン酸誘導体（アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、フェンブフェン、フェノプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、インドプロフェン、ケトプロフェン、ミロプロフェン、ナブロキセン、オキサプロジン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、スプロフェン、チアプロフェン酸及びチオキサプロフェン）などの非ステロイド系の抗炎症薬（NSAID）、酢酸誘導体（インドメタシン、アセメタシン、アルクロフェナック、クリダナク、ジクロフェナク、フェンクロフェナク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フィロフェナック、イブフェナック、イソキセパック、オキシピナック、スリンダク、チオピナク、トルメチン、ジドメタシン、及びゾメピラク）、フェナム酸誘導体（フルフェナム酸、メクロフェナム酸、メフェナム酸、ニフルム酸及びトルフェナム酸）、ピフェニルカルボン酸誘導体（ジフルニサル及びフルフェニサル）、オキシカム（イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム及びテノキシカム）、サリチル酸（アセチルサリチル酸、スルファサラジン）ならびにピラゾロン（アパゾン、ベンゾピペリロン、フェブラゾン、モフェブタゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン）が挙げられるが、これらに限定されない。他の組み合わせは、シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）阻害剤が含まれる。

10

【0269】

組み合わせの他の活性薬剤は、プレドニゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、またはヒドロコルチゾンなどのステロイドが含まれる。1つ以上のステロイドの悪影響は、必要なステロイド用量を漸減することによって低減することができるまたは除去できるので、そのような組み合わせは特に有利であり得る。

20

【0270】

例えば慢性関節リウマチの治療のために組み合わせることができる活性薬剤の追加の例は、サイトカインを抑制する抗炎症剤（複数を含む）（CSAID）、他のヒトサイトカインまたは成長因子、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGFまたはPDGFの抗体または拮抗剤を含む。

30

【0271】

活性薬剤の特定の組み合わせは、自己免疫及びその後炎症カスケードの異なる時点で妨げることができて、TNF拮抗剤（例えばキメラ、ヒト化またはヒトTNF抗体）、REMICADE、抗TNF抗体フラグメント（例えば、CDP870）及び可溶性p55またはp75TNF受容体（その誘導剤、p75TNFR1gG（ENBREL）またはp55TNFR1gG（LENERCEPT）を含むことができ、可溶性IL-13受容体（sIL-13）、更にはTNF-変換酵素（TACE）阻害剤、同様にIL-1阻害剤（例えば、インターロイキン-1-変換酵素阻害剤）も効果的であり得る。他の組み合わせは、インターロイキン11、抗P7s及びp-セレクチン糖タンパク質リガンド（PSGL）を含む。本明細書に記載のIL-15ポリペプチドと組み合わせる有用な薬剤の他の例は、インターフェロン-1a（AVONEX）、インターフェロン-1b（BETASERON）、コパキソン、高圧酸素、静注用免疫グロブリン、クラブリピン、及び他のヒトサイトカインもしくは成長因子の抗体またはアンタゴニスト（例えば、CD40リガンド及びCD80に対する抗体）を含む。

40

【0272】

本開示は、上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を包含する。

【0273】

癌及び関連状態。本開示は、増殖性状態、癌、腫瘍もしくは前癌性疾患、障害もしくは状態を、IL-15分子及び少なくとも1つの追加の治療薬もしくは診断薬で治療するならびに/または予防するための方法を提供する。

50

## 【 0 2 7 4 】

化学療法剤の例としては、チオテパ及びシクロホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロールメラミンを含むエチレンイミン及びメチレンイミン；チオランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどの窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロノマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピュロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質；メトトレキセート及び5 - フルオロウラシル（5 - F U）などの抗代謝産物；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5 - F Uなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオンスタノール、メピチオステイン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトテイン、トリロステインなどの抗副腎抗体；フォリン酸などの葉酸補充液；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトレキセート；デホファミン；デメコルチン；ジアジコン；エルホルミチン；エリプチニウム酢酸塩；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピタモール；ニトラクリン；ペントスタチン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；ラゾキサソ；シゾフィラン；シピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2, 2 - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（A r a - C）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、バクリタキセル及びドセタキセル；クロラムブシル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金及び白金配位錯体；ピンブラスチン；エトボシド（V P - 1 6）；イホスファミド；マイトマイシン C；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；C P T 1 1；トポイソメラーゼ阻害剤；ジフルオロメチルオルニチン（D M F O）、レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタピン；及び上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。化学療法剤は、抗エストロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節し、または阻害するように作用する、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、4（5） - イミダゾールを阻害するアロマターゼ、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、オナプリストン、及びトレミフェンを含む、抗ホルモン剤；及び、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリンなどの抗アンドロゲン；及び薬学的に許容される塩、酸または上記のいずれかの誘導体も含有する。特定の実施形態において、併用療法は、ホルモンまたは関連ホルモン剤の投与を含む。

10

20

30

40

50

## 【0275】

IL-15ポリペプチドと組み合わせて用いることができる追加の治療法は、IL-12、INFもしくは抗上皮成長因子受容体などのサイトカインもしくはサイトカインアンタゴニスト、放射線療法、他の腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体、モノクローナル抗体及び毒素の複合体、T細胞アジュバント、骨髄移植、または抗原提示細胞（例えば、樹状細胞療法）を含む。ワクチン（例えば、可溶性タンパク質として、またはタンパク質をコード化する核酸として）も、本明細書に提供される。

## 【0276】

本開示は、上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を包含する。

## 【0277】

ウイルス性及び細菌性状態。本開示は、ウイルス性疾患、障害及び状態、ならびにそれに関連する障害を、IL-15分子及び少なくとも1つの追加の治療薬もしくは診断薬（例えば1つ以上の他の抗ウイルス薬及び/またはウイルス治療と関係のない1つ以上の薬剤）で治療する及び/または予防するための方法を提供する。

## 【0278】

このような併用療法は、ウイルス脱殻阻害剤（例えば、アマンタジン及びリマンチジン）；逆転写酵素阻害剤（例えば、アシクロビル、ジドブジン及びラミブジン）；インテグラーゼを標的とする薬剤；ウイルスDNAへの転写因子の結合をブロックする薬剤；翻訳に影響を与える薬剤（例えば、アンチセンス分子）（例えば、ホミビルセン）；翻訳/リボザイム機能を調節する薬剤；プロテアーゼ阻害剤；ウイルス組み合わせ調節剤（例えば、リファンピシン）；ウイルス粒子（例えば、ザナミビル及びオセルタミビル）の放出を防止する薬剤を含む、様々なウイルスのライフサイクルステージを標的とし、異なる作用機構を有する抗ウイルス剤が含まれるが、これらに限定されない。特定のウイルス感染（例えば、HIV）の治療及び/または予防は、しばしば、抗ウイルス剤の群（「カクテル」）を伴う。IL-15ポリペプチドと組み合わせて使用するために意図される他の抗ウイルス薬としては、アバカビル、アデフォビル、アマンタジン、アンブレナビル、アンプリゲン、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、ボセプレビルレルテット、シドフォビル、コンビビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エンドクスジン、エファビレンツ、エムトリシタピン、エンフビルチド、エンテカビル、ファミシクロビル、ホスアンブレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、ガンシクロビル、イバシタピン、イムノビル、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、様々なインターフェロン（例えば、ペグインターフェロン-2a）、ロピナビル、ロビリド、マラビロク、モロキシジン、メチサゾン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネクサビル、ペンシクロビル、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン、ラルテグラビル、リバビリン、リトナビル、ピラミジン、サキナビル、スタブジン、テラプレビル、テノホビル、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ピクリピロク、ビダラピン、ピラミジン、及びザルシタピンを含むが、これらに限定されない。

## 【0279】

桿状のグラム陰性細菌のサルモネラ属のIL-15治療は、開発中のワクチンと組み合わせて最も効果的であると考えられる。熱帯熱マラリア原虫寄生虫の治療のための併用療法に関して、抗マラリア薬物（例えば、クロロキン）アルテミシニンがIL-15ペプチドとの併用療法で効果的であり得る。

## 【0280】

本開示は、上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を包含する。

## 【0281】

## 適用量

本開示のIL-15ポリペプチドは、例えば、投与の目標（例えば、所望される消散の程度）、対象の年齢、体重、性別ならびに健康及び身体状態、ならびに/または投与される製剤、投与経路、ならびにその疾患、障害、状態または症状に依存する量で対象に投与

10

20

30

40

50

され得る。投薬レジメンは、投与される薬剤（複数を含む）に関連する任意の有害作用の存在、性質、及び程度を考慮に入れることができる。有効投与量及び投与レジメンは、例えば安全性及び用量漸増試験、インビボ研究（例えば、動物モデル）、及び当業者に公知の他の方法により容易に決定することができる。

【0282】

一般に投薬パラメータは、対象に不可逆的に有害であり得る量未満（最大許容量（MTD））の投与量であり、対象に対して測定可能な作用を生成するために必要とされる量未満ではないことを必要とする。そのような量は、投与経路及び他の要因を考慮に入れる、例えばADMEに関連する薬物動態及び薬力学パラメータにより決定される。

【0283】

有効量（ED）は、それを服用する対象のある一定の割合において、治療応答または所望の作用を生成する薬剤の用量または量である。薬剤の「50%有効量」またはED50は、それを投与される集団の50%において、治療応答または所望の作用を生成する薬剤の用量または量である。ED50は通常、薬剤の作用の妥当な予測の手段として使用されるが、臨床医がすべての関連要因を考慮に入れた、適切であると判断し得る用量とは限らない。したがっていくつかの場合では、有効量は計算されたED50超であり、他の場合では有効量は計算されたED50未満であり、また他の場合では有効量は計算されたED50と同じである。

【0284】

更に本開示のIL-15分子の有効量は、対象に1つ以上の用量で投与されたとき、健康な対象に対して所望の結果を生成する量であり得る。例えば特定の障害を経験する対象に関して、有効量とは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または90%超だけその障害の診断パラメータ、指標、マーカーなどを改善するものであり得て、100%とは通常の対象によって示される診断パラメータ、指標、標識などとして定義される。本明細書に記載の疾患、障害または状態を治療するために必要なIL-15分子の量は、共役タンパク質のIL-15活性を基準にしており、それはは、当該技術分野において既知のIL-15活性アッセイによって決定され得る。

【0285】

IL-15分子の治療に有効な量は、約0.01~約100µgタンパク質/kg体重/日、約0.1~20µgタンパク質/kg体重/日、約0.5~10µgタンパク質/kg体重/日、または約1~4µgタンパク質/kg体重/日の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、IL-15分子の治療に有効な量は、約1~16µgタンパク質/kg体重/日の範囲であり得る。本開示は、例えば約50~800µgタンパク質/kg体重/日の送達するため連続注入することによるIL-15分子の投与を想到する。注入速度は、例えば副作用及び血液細胞数の評価に基づいて変えることができる。

【0286】

経口剤の投与に関して、組成物は、1.0~1000ミリグラムの活性成分、特に1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0または1000.0ミリグラムの活性成分を含有する、錠剤、カプセルなどの形態で提供され得る。

【0287】

特定の実施形態では、開示されるIL-15ポリペプチドの投与量は、「単位投与形態」で含有される。「単位投与形態」という語句は物理的に分離した単位を指し、各単位は、単独または1つ以上の追加の薬剤との併用のいずれかで、所望の作用を生成するのに十分な既定量の本開示のIL-15ポリペプチドを含有する。単位投与形態のパラメータは、達成される特定の薬剤及び作用に依存することが理解される。

【0288】

10

20

30

40

50



キット

本開示は、IL-15及びその医薬組成物を含むキットも想定する。キットは一般的に、以下に記載される様々な成分を収容する物理構造の形態であり、例えば本明細書記載の方法を実施する際に利用され得る。

【0289】

キットは、対象に投与するのに適した医薬組成物の形態であり得る、本明細書に開示されるIL-15ポリペプチドのうちの一つ以上を含み得る（例えば、滅菌容器に提供される）。IL-15ポリペプチドは、すぐに使用できる形態で、または例えば投与前に再構成または希釈を必要とする形態で提供され得る。IL-15ポリペプチドがユーザによって再構成される必要がある形態であるとき、キットは緩衝液、薬学的に許容される賦形剤なども含み、IL-15ポリペプチドと一緒にまたは別個にパッケージされ得る。併用療法が想定されるとき、キットは別個にいくつかの薬剤を含有する、またはそれらはキットに既に組み合わされてよい。キットの各成分は個々の容器内に密閉され得て、様々な容器のすべては単一のパッケージ内にあり得る。本開示のキットは、その中に収容された成分を適切に保持するのに必要な状態（例えば、冷却または凍結）に設計され得る。

10

【0290】

キットは、その中の成分についての情報及びそれらの使用説明書（例えば作用機序、薬物動態及び薬力学、有害作用、禁忌等を含む、活性成分の投薬パラメータ、臨床薬理）を特定することを含むラベルまたは添付文書を含み得る。ラベルまたは挿入物は、ロット番号及び使用期限などの製造情報を含み得る。ラベルまたは包装挿入物は、例えば成分を収容する物理構造に統合されるか、物理的構造内に別個に収容される、またはキットの成分（例えばアンプル、チューブまたはバイアル）に添付され得る。

20

【0291】

ラベルまたは挿入物は、ディスク（例えばハードディスク、カード、メモリディスク）、光学ディスク（CD-もしくはDVD-ROM/RAMなど）、DVD、MP3、磁気テープもしくは電気記憶媒体（RAM及びROMなど）、もしくはこれらのハイブリッド（磁気/光学記憶媒体、FLASHメディアもしくはメモリ型カードなど）などのコンピュータ可読媒体を更に含む、またはそれに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、実際の説明書は、キットに存在しないが、例えばインターネットを介して遠隔源から説明書を得るための手段が提供される。

30

【0292】

実験

以下の実施例は、当業者に本発明をどのように作製及び使用するかの完全な開示及び説明を提供するように提示され、本発明者が自身の発明とみなすものの範囲を限定するようには意図されておらず、以下の実験が実施された及びすべての実験が実施され得ることを示すようにも意図されていない。現在形で書かれた例示の記述は必ずしも実施されたものとは限らず、むしろ、説明は、本明細書に記述されたデータなどを生成するために実施できることと理解すべきであろう。使用される数字（例えば量、温度など）に関して正確さを保証するために努力がはらわれているが、いくつかの実験誤差及び偏差があることを考慮すべきであろう。

40

【0293】

特に指示のない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏（ $^{\circ}\text{C}$ ）であり、及び圧力は大気圧またはそれに近い圧力である。

【0294】

下記の標準的略号を使用する：bp = 塩基対（複数を含む）；kb = キロ塩基（複数を含む）；pl = ピコリットル（複数を含む）；sまたはsec = 秒（複数を含む）；min = 分（複数を含む）；hまたはhr = 時間（複数を含む）；aa = アミノ酸（複数を含む）；kb = キロ塩基（複数を含む）；nt = ヌクレオチド（複数を含む）；ng = ナノグラム； $\mu\text{g}$  = マイクログラム；mg = ミリグラム；g = グラム；kg = キログラム；dlまたはdL = デシリットル； $\mu\text{l}$ または $\mu\text{L}$  = マイクロリットル；mlまたはmL = ミ

50

リットル；lまたはL = リットル；nM = ナノモル濃度； $\mu$ M = マイクロモル濃度；mM = ミリモル濃度；M = モル濃度；kDa = キロダルトン；i.m. = 筋肉内に；i.p. = 腹腔内に；s.c. = 経皮的に；QD = 日毎；BID = 1日に2回；QW = 週毎；QM = 月毎；HPLC = 高速液体クロマトグラフィー；BW = 体重；U = ユニット；ns = 統計的に有意ではない；PBS = リン酸塩 - 生理食塩水緩衝液；PCR = ポリメラーゼ連鎖反応；NHS = N - ヒドロキシスクシンイミド；DMEM = ダルベッコ変法イーグル培養液；GC = ゲノムコピー；ELISA = 酵素結合免疫吸着アッセイ；EDTA = エチレンジアミン四酢酸；PMA = ホルポールミリストレートアセテート；rhIL - 15 = 組み換えヒトIL - 15；LPS = リポ多糖体。

【0295】

材料及び方法

下記の一般的な材料及び方法を、以下の実施例で使用する。

【0296】

分子生物学での標準的方法は記載されている（例えば、Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 及び Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1 - 4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y. 参照、それは、細菌細胞及びDNA突然変異誘発のクローニング (Vol. 1)、哺乳類細胞及び酵母のクローニング (Vol. 2)、複合多糖及びタンパク質の発現 (Vol. 3) 及び生物情報学 (Vol. 4) について記載する。

【0297】

科学文献には、免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、及び結晶化、ならびに化学分析、化学改変、翻訳後改変、融合タンパク質の産生、及びタンパク質のグリコシル化を含むタンパク質精製のための方法が記載されている（例えば、Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vols. 1 - 2, John Wiley and Sons, Inc., NY 参照）。

【0298】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の産生、精製及びフラグメント化が下記に記載されている（例えば Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 参照）。リガンド/受容体相互作用を特徴付けるための標準的な技術が利用可能である（例えば Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., NY 参照）。蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含むフローサイトメトリーのための方法が利用可能である（例えば Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ 参照）。例えば診断試薬としての使用のための、核酸プライマー及びプローブ、ポリペプチドならびに抗体を含む核酸を改変するのに適した蛍光試薬が利用可能である (*Molecular Probes* (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.; *Sigma-Aldrich* (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO.)。

【0299】

免疫系の組織学の標準的な方法が記載されている（例えば Louis et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY 参照）。

【0300】

10

20

30

40

50

免疫細胞 (CD4<sup>+</sup> 及び CD8<sup>+</sup> T細胞) の欠失は、抗体媒介性の消失により行うことができる。例えば 250 µg の CD4 - または CD8 - 特異的抗体を毎週注射して、細胞欠失は FACS 及び IHC 分析を用いて確認できる。

【0301】

例えば、抗原性フラグメント、リーダー配列、タンパク質折り畳み、機能ドメイン、グリコシル化部位、及び配列アラインメントを決定するためのソフトウェアのパッケージ及びデータベースが利用可能である (例えば、GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA) 及び DeCypher (商標) (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV) 参照)。

【0302】

免疫応答性 Balb/C または B細胞 - 欠損 Balb/C マウスを、Jackson Lab. (Bar Harbor, ME) から入手して、標準法に従い使用できる (例えば、Martin et al (2001) Infect. Immun., 69 (11) : 7067 - 73 and Compton et al. (2004) Comp. Med. 54 (6) : 681 - 89 参照)。本開示により想到される実験作業に適した他のマウス株は当業者に既知であり、一般的には Jackson Lab から入手可能である。当業者は、本開示の作業でも使用され得るモデル及び細胞株 (例えば、炎症のモデル) を熟知している。

【0303】

血清 IL-15 濃度レベル及び曝露レベルは、当該技術分野で使用される標準的な方法により決定することができる。例えば血清曝露レベルのアッセイは、全血 (約 50 µL / マウス) をマウスの尻尾切断から毛細管に採取して、遠心分離により血清及び血液細胞を分離し、標準的な ELISA キット (例えば、R&D Systems) と技術により、IL-15 曝露レベルを決定することにより実施できる。あるいはまたは更に、下記に記載する ELISA 手順 (または類似の手順) は、ムテインまたは改変したムテインの生体内半減期を決定するための手段として、ヒト IL-15 の血清レベルを測定するように適合させることができる。

【0304】

ムテインの生成及び評価

ヒト IL-15 発現ベクター、pSecTag2hygro-huIL15 の構成体。ヒト IL-15 哺乳動物発現ベクターは、DNA テンプレートとして pCMV6-AC-ヒト-IL15 (Origene # SC300099; Genbank 受託 # NM\_00057.2) を使用する、プラチナ Pfx DNA ポリメラーゼ (Life Technologies # 11708~039; 製造業者のプロトコルに従う) を使用する PCR、ならびにプライマー 5' - tataGCTAGCCACCATGCACAGCTCAGCACTGC - 3' (配列番号 34) 及び 5' - tataGGGCCCTCAGTTTCGTATCTTCAATTG - 3' (配列番号 35) を介して、完全ヒト IL-15 オープンリーディングフレームを増幅することにより構築した。得られた PCR 反応物は、QIAquick PCR 精製キット (Qiagen # 28106) を用いて精製した。精製したヒト IL-15 の PCR フラグメント及び哺乳動物発現ベクター pSecTag2hygro (B) (Life Technologies # V910-20) は、pSecTag2hygro (B) 消化に加えた子ウシ腸ホスファターゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA) で、37、1時間、SfiI 及び ApaI (New England Biolabs, Ipswich, MA) を用いて消化処理した。消化された DNA フラグメントは、100V で 1時間、1% アガロースゲル (Lonza # 54803) 上で培養し、その後切除し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen # 28706) を用いて精製した。ヒト IL-15 の PCR フラグメントは、Rapid DNA 結合キット (Roche # 11635379001) を用いて pSecTag2hygro (B) ベクターに連結し、One Shot TOP10 化学的コンピテント大腸菌 (Life Technologies #

10

20

30

40

50

C404006) に形質転換し、100 µg/mL のアンピシリンを含む寒天プレートに植えて、37 で一晩増殖させた。翌日、細菌コロニーを個別に採取し、200 RPM で振盪培養器中で LB + 100 µg/mL のアンピシリンを含む、3 mL の培養液に入れ、37 で 8 ~ 20 時間増殖させた。各培養物 2 mL をその後 2 mL の試験管に分取して、細胞を 10 分間、卓上遠心分離機で 6000 RPM でペレット化し、培養液を吸引して、DNA を QIAprep Spin Miniprep キット (Qiagen # 27106) を使用して細菌から分離して精製した。適切な発現ベクターを、DNA 配列決定法 (MC Lab, South San Francisco, CA) を介して同定した。

#### 【0305】

ムテインの発現ベクターの生成。ヒト IL-15 ムテインの発現ベクターは、前述のヒト IL-15 の哺乳動物発現ベクター pSecTag2hygro-huIL-15 を、Quickchange II 部位特異的突然変異誘発キット (Agilent Technologies # 200524) を使用して、以下の分類の製造業者のプロトコルに従い変異させた。プライマーは常に推奨 Tm を満たすとは限らなかった。PCR 反応は、6 ~ 7 分の継続時間で 16 ~ 18 ラウンド循環させた。4 µL の DpnI 処理反応は、前述のように One Shot TOP10 化学的コンピテント細胞 (Life Technologies # C404006) に形質転換させた。ミニプレップ培養物 3 mL を増殖させ、精製して、前述のように配列検証した。いくつかのムテインにおいて、400 mL の培養物を増殖させ、精製した。簡単に説明すると、1つの細菌コロニーを 400 mL の LB + 100 µg/mL のアンピシリン中に取り出し、2 L のバッフル付き三角フラスコ中の 200 RPM で振盪培養器中で、37、12 ~ 20 時間成長させた。次いで培養物を、遠心分離機 (JA-10 ローター中の Beckman Avanti J-25 T の 6000 RPM、20 分間) でペレット化し、培養液を吸引して、製造業者のプロトコルに従って EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen # 12381) を用いて DNA を抽出した (最終 DNA 濃度を増加させるために、DNA 沈殿法で行われる当業者に馴染みの種類をごくわずかに変更)。

#### 【0306】

複数のアミノ酸の変化を必要とするムテインは、一度に 1つの変異体を挿入することにより作製した。N-グリコシル化モチーフ、N-X-S 及び N-X-T の導入は、X P (プロリン) であるため、3つの変異体の導入を必要とすることがある。ムテインに使用する番号付け規則は、最初の位置として開始コドンを割り当て、したがって最初の 48 残基 (MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHFVFI LGC FSAGLPKTEA (配列番号 36)) はシグナルペプチドを含み、成熟タンパク質の第一の残基はアスパラギン 49 である。

#### 【0307】

タンパク質トランスフェクションのプロトコル。すべてのヒト IL-15 発現ベクター (野生型及びムテイン) は、過渡的に HEK293FT 細胞 (Life Technologies # R700-07) で発現させることができる。細胞は、T175 フラスコ (Greiner One/CellStar # 660175) 中の 50 mL の DMEM (Life Technologies # 11995-073) + 10% の特性決定したウシ胎児血清 (Hyclon/Thermo Scientific # SH30071.03) + 1x ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies # 15140-122) で 37、5% CO<sub>2</sub> 中で維持することができる。集密化したら、細胞を 10 mL の PBS + 5 mM の EDTA で分離して、細胞を追加の 10 mL の成長培養液で採取し、遠心分離機 (Beckman Allegra 6R) を用いて 1000 RPM でペレット化し、培養液を吸引し、細胞を新鮮な培養液で再懸濁し、その後 45 mL の成長培養液を含む 3つの T175 フラスコの間に分取することができる。

#### 【0308】

すべての発現ベクターを、6 ウェルプレートまたは T175 フラスコにトランスフェク

10

20

30

40

50

ションすることができる。6ウェルプレートのトランスフェクションにおいて、HeK293FT細胞を集密化したT175フラスコから採取して、細胞を上述のとおり採取し、その後20mLの新鮮な増殖培養液に再懸濁させることができる。700 $\mu$ Lの細胞懸濁液を、2mLの新鮮な培養液を含む6ウェルプレート(Falco#353046)の各ウェルに加えて、記載されているように一晚成長させることができる。翌日、細胞をLipofectamine2000(Life Technologies#1388795)を用いて、次のプロトコルを使用してトランスフェクトすることができる。250 $\mu$ LのOptiMEMI血清低減培養液(Life Technologies#31985-088)を2つのEppendorfチューブに分取して、その後、10 $\mu$ LのLipofectamine2000トランスフェクション試薬(Life Technologies#1388795)を1つのアリコートに加えて、4 $\mu$ gのDNAを他方に加えた。2つの溶液を室温で5分間別々に培養し、その後、2つの溶液を合わせて、更に30分間室温で培養することによりトランスフェクション複合体を形成した。完全な500 $\mu$ Lの混合物を、その後、6ウェルプレートの1つのウェルに滴下して添加し、4時間、培養器に戻した。それからトランスフェクション培養液を吸引し、DMEM+ペニシリン/ストレプトマイシンで置き換えて、約36時間増殖させた。馴化培養液を収集して、4で保存した。それから以下の点を除いて、上述のとおりT175-フラスコをトランスフェクトすることができる。42~45mLの増殖培養液入りのT175フラスコは、トランスフェクション前に95%コンフルエンスまで増殖させて、175 $\mu$ LのLipofectamine2000を4.4mLのOptiMEMIに、及び75~100 $\mu$ LのDNAを第2の4.4mLのOptiMEMIに加えることにより、トランスフェクション複合体を形成した。トランスフェクション複合体の吸引時に、50mLの培養液を各フラスコに加えた。

10

20

30

40

50

**【0309】**

モックトランスフェクションはpSecTag2hygro(B)発現ベクターが消失する、またはDNAを含まず、上述したとおり調製した。

**【0310】**

ヒトIL-15検出ELISA。96ウェルプレート(Nunc Maxisorp#442404)を、100 $\mu$ L/ウェルで、PBS+1 $\mu$ g/mLの抗ヒトIL-15抗体(例えばATCC HB-12062、クローンM111、Manassas, VA)を4で一晩コーティングして、DPBS-Tween20(Teknova#P0297)6 $\times$ 200 $\mu$ Lで洗浄し、200 $\mu$ L/ウェルで、PBS+5%BSA(Calbiochem社2960)を用いて、2時間、室温でロッキングプラットフォーム上でブロックして、上述のとおり洗浄してもよい。試料をPBS中で連続的に希釈し、そして100 $\mu$ L/ウェルをアッセイプレートに加えてもよい。試料を、二重でまたは三重で用いてもよい。陽性対照として精製したヒトIL-15を添加し、一方モックトランスフェクションからの緩衝液または馴化培地を陰性対照として用い、両方を連続希釈できる。試料をロッキングプラットフォーム上で4で一晩培養し、次いで上述のとおり洗浄できる。100 $\mu$ L/ウェルのPBS+抗ヒトIL-15抗体(例えばab7213; Abcam)を各ウェルに加え、ロッキングプラットフォーム上で室温で1時間培養し、上述のとおり洗浄して、その後、100 $\mu$ L/ウェルのロバ抗ウサギIgG(H+L)-HRP(Jackson Immuno Research#711-035-152、1:10,000に希釈)を加えて、ロッキングプラットフォーム上で室温で更に1時間培養してもよい。上述のとおりプレートを洗浄して、100 $\mu$ L/ウェルの1-Step Ultra TMB-ELISA(Pierce/Thermo#34029)を用いて1~5分間成長させ、その後、反応を100 $\mu$ L/ウェルの停止溶液(Life Technologies#SS04)で停止させてもよい。プレートを、Molecular Devices M2プレートリーダーで450nmで読み取った。

**【0311】**

別のELISA形式は、プレメイドキット(例えばヒトIL-15Quantikin

eELISAキット(R&D Systems #D1500, Minneapolis, MN)の製造業者の推奨するプロトコルによる)を含むことができる。

【0312】

野性型ヒトIL-15及びムテインヒトIL-15の精製抗ヒトIL-15抗体(例えばATCC HB-12062、クローンM111、Manassas, VA)は、CNBr活性化セファロース4Fast Flow(GE Healthcare #71-5000-15AF、製造業者のプロトコルに従う)にカップリングして、PBSで平衡化することができる。M111-セファロースの500 $\mu$ L~1mLを、ガラスEcono-カラム(Bio-Rad, Hercules, CA)内に収容された馴化培地の100mL毎に加えて、ロッキングプラットフォーム上で室温で1~2時間培養できる。培地を重力流を介してカラムに通過させて、1 $\times$ PBS(pH7.4)で1 $\times$ 洗浄して、0.1Mグリシン(pH2.9)で溶出し、10%の量の1Mトリス緩衝液(pH8.0)量で中和することができる。タンパク質は濃縮されて、緩衝液はAmicon Ultra遠心分離フィルタ装置(Millipore, Billerica, MA; 5,000kD分画分子量)を使用してPBS(pH7.4)へ交換することができる。タンパク質濃度は280nmの分光光度計で測定することができる。

10

【0313】

SEC解析タンパク質1100シリーズHPLC(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を使用して、タンパク質20~50 $\mu$ gを、TSK3000swカラム(Tosoh Biosciences, 東京、日本)に注入して、PBS(pH7.4)で平衡化して、流速1mL/分で流すことができる。

20

【0314】

IL-15のPEG化

PEG(NOF Corporation, 日本)は、NaCl100mMで、pH4~8の50mMリン酸塩中の濃度10~100mg/mLに希釈することができ、ヒトIL-15は、pH7.4のPBS中の濃度2~10mg/mLに希釈することができる。最終反応混合物は、5~50mMの最終濃度で、比率範囲10:1~2:1(PPA PEG:ヒトIL-15)のPEG及びヒトIL-15、ならびにシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含むことができる。反応物を4~25で2~48時間インキュベートすることができる。所望のタンパク質種及び/または緩衝液交換を選択するために、PEG化タンパク質はSECを介して分留することができる(上述したように)、またはPEG化反応混合物の非タンパク種の大部分及び/または緩衝液交換を除去するために、PEG-IL-15反応混合物は限外ろ過工程を受けさせることができる(例えば、Millipore Lab scale TFFシステムを、分子量5kDaカットオフで、再生セルロース(PLCGC)膜と共に使用できる)。

30

【0315】

IL-15 改変体の生物活性を判定するためのアッセイ

本開示は、本明細書に記載のIL-15分子の生物活性を判定するための当該技術分野で既知の任意のアッセイ及び方法の使用を想到する。本明細書に記載のアッセイは代表例であり、排他的ではない。

40

【0316】

CTL-2細胞増殖アッセイSomanら(J Immunol Methods 348(1-2):83-94(2009 August 31))は、量的にIL-15生物活性を推定するための、可溶性CellTiter96 Aqueous One試薬(Promega; Madison, WI)を用いた、CTL-2細胞の最適化したテトラゾリウム染料に基づく比色分析の細胞増殖アッセイを記載する。CTL-2は、IL-2依存性ネズミ細胞株である。

【0317】

Somanらに記載されているものと実質的に類似しているCTL-2細胞増殖アッセイを、IL-15生物活性を判定するために本明細書で使用した。簡単に説明するとC

50

TLL-2細胞(ATCC TIB-214、Manassas、VA)を、10% FBS及び10% T-STIM(Corning #354115、Tewsbury、MA)を補充したRPMI 1640(Life Technologies、11875-093、Grand Island、NY)で培養した。細胞を、密度10,000細胞/mLと100,000細胞/mLの間で5%のCO<sub>2</sub>を補充して37に維持して、それら対数増殖期で増殖したとき(通常凍結後2~3週間;細胞生存度95%)採取して、T-STIMのない20mLの増殖培地で4回洗浄した(1000rp、5分の遠心分離)。次にT-STIMのない増殖培地の100μL中の25,000細胞/ウェルを、きれいな96ウェル組織培養プレートに小分けして、インキュベーターに戻す一方で、タンパク質を希釈した。IL-15サンプルは、アッセイ培地中の最初の濃度8ng/mLに希釈して、その後続いて2倍の希釈し、それから100μLを96ウェル組織培養プレートのウェルに加えて、37、5%のCO<sub>2</sub>のインキュベーターに48時間戻した。48時間の培養時間後、Cell Titer 96(登録商標)Aqueous One溶液を加えて(20μL/ウェル)、懸濁液を更に1~4時間、37及び5%CO<sub>2</sub>で培養した。プレートを490nmで読み取り、媒体入りウェルのバックグラウンド読み取りを試料ウェル容器読み出しから除去した。

10

## 【0318】

M07e細胞増殖アッセイKanakuraら(Blood 76(4):706-15(1990 August 15); Calicetiら(PLoS One 7(7):e41246.doi:10.1371/journal.pone.0041246(2012));及びZaunerら(BioTechniques 20:905-13(May 1996))は、M07e、その増殖がIL-3またはGM-CSFに依存する、ヒト白血病巨核球性細胞株を使用する細胞増殖アッセイを記載する。M07e細胞はDSMZから購入できる(DSMZ番号ACC104; Braunschweig、Germany)。

20

## 【0319】

M07e細胞株は、10% FBS、rhGM-CSF(10ng/mL)またはrhIL-3(10ng/mL)を補充したRPMI 1640培地(Gibco、Grand Island、NY)で培養でき、あるいは細胞は、5% FCS及び10ng/mLのIL3を補充したIMDMで培養できる。MTT[3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(Sigma)の組み込みを、M07e細胞の因子誘導増殖を定量するために用いてもよい。簡単に説明すると、M07e細胞の3つの小分けを、平底マイクロタイタープレート(100μL/ウェル)で3772時間培養することができる。MTTは培養の最後の4時間に加えることができる(PBS中のMTT 5mg/mL溶液の10μL)。72時間で、100μLの酸イソプロパノール(イソプロパノール中の0.04N HCl)をすべてのウェルに加えて、混合することができる。光学密度は540nmでマイクロELISAプレートリーダーで測定した。

30

## 【0320】

CD8+/CD4+T細胞アッセイ。活性化した一次ヒトCD8+及びCD4+T細胞は、PEG-IL-15で処理するとき、IFN、グランザイムB、パーフォリン及びTNFを分泌する。以下のプロトコルは、例示のアッセイをこれらのサイトカインの産生のスクリーニングに提供するヒト一次末梢血単核細胞(PBMC)は、任意の標準的プロトコルに従い単離することができる(例えばFuss et al.(2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1(John Wiley, Inc., NY)参照)。PBMC 2.5mL(細胞密度1000万細胞/mL)は、RPMI(Life Technologies; Carlsbad, CA)、10mMのHEPES(Life Technologies; Carlsbad, CA)、10%ウシ胎児血清(Hyclone Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA)及びペニシリン/ストレプトマイシンカクテ

40

50

ル (Life Technologies; Carlsbad, CA) を含有する、完全 RPMI により、または AIM-V 無血清培地 (Life Technologies # 12055-083) で、5% CO<sub>2</sub> を含む加湿した 37 °C のインキュベーターにおいて、任意の標準組織培養処理済み 6-ウェルプレート (BD; Franklin Lakes, NJ) で、ウェル毎に培養することができる。CD8<sup>+</sup> 及び CD4<sup>+</sup> T 細胞は、製造業者のプロトコルに従って Miltenyi Biotec の MACS 細胞分離技術を使用して単離できる (Miltenyi Biotec; Auburn, CA)。T 細胞は、24 ウェル組織培養プレート (Costar # 3526, Corning, NY) を抗 CD3 及び抗 CD-28 抗体 (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA) でコーティングして、及び AIM-V 培地 1 ml の 3E6 細胞 / ウェルを添加することによって、活性化できる。細胞を記載したように 3 日間増殖させて、それから回収し、96 ウェル組織培養プレート (Falcon # 353072, コーニング, NY) に小分けした、密度 2E6 細胞 / mL の新鮮な AIM-V 及び 250 µL / ウェルに再懸濁した。ヒト PEG-IL-15 を連続的に希釈して、最終濃度 1 µg / mL ~ 0.01 ng / mL でウェルに加えることができる。細胞を 5% CO<sub>2</sub> を含む加湿した 37 °C の培養器中で 3 日間培養することができる。それから培地を回収し、市販の ELISA キットを用いて製造者のプロトコルに従い (例えば Affymetrix Bioscience; San Diego, CA または R&D Systems, Minneapolis, MN)、IFN $\gamma$ 、グランザイム B、パーフォリン及び / または TNF のアッセイができる。

10

20

#### 【0321】

NK 細胞アッセイ。ヒト NK 細胞は P BMC 細胞から単離することができ (プロトコルは前述のとおり、完全 RPMI で培養)、製造業者のプロトコルに従って Miltenyi Biotec の MACS 細胞分離技術を使用して同じように単離できる (Miltenyi Biotec (Auburn, CA))。細胞は増殖されて培養され (T 細胞で記載したように完全 RPMI 使用)、250 µL の完全 RPMI 中に 5E5 細胞 / ウェルで 96 ウェル組織培養プレート (Falcon # 353072 (Corning, NY)) に植えた。成長の 1 ~ 3 日後、媒体を T 細胞に関して記載されているように分析できる。

#### 【0322】

腫瘍モデル及び腫瘍分析

30

#### 【0323】

任意の当該技術分野で認められた腫瘍モデル、アッセイなどは、種々の腫瘍で、本明細書に記載の IL-15 分子の効果を評価するために使用することができる。下記に記載した腫瘍モデル及び腫瘍分析は、利用可能なものの代表である。

#### 【0324】

同系マウス腫瘍細胞は、腫瘍接種当たり 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup> または 10<sup>6</sup> 細胞で、皮下注射するまたは皮内注射する。EP2 乳癌、CT26 結腸癌、皮膚の PDV6 扁平上皮癌、及び 4T1 乳癌モデルを用いることができる (例えば、Langowski et al. (2006) Nature 442: 461-465 参照)。免疫適格 Balb/C または B 細胞欠損 Balb/C マウスを使用することができる。PEG-mIL-15 を免疫適格マウスに投与することができ、一方、PEG-hIL-15 治療は B 細胞欠損マウスで行うことができる。腫瘍は、治療を開始する前に 100 ~ 250 mm<sup>3</sup> の大きさに到達させる。IL-15、PEG-mIL-15、PEG-hIL-15 または緩衝対照を、腫瘍移植から離れた部位に皮下投与する。腫瘍成長は通常、電子カリパスを用いて週 2 回監視する。

40

#### 【0325】

腫瘍組織及びリンパ器官は、多くの炎症マーカー用の mRNA の発現を測定するために、及びいくつかの炎症細胞マーカー用の免疫組織化学を行うために、様々なエンドポイントで採取した。組織を液体窒素中で急速凍結し、-80 °C で保存する。原発腫瘍の成長は

50





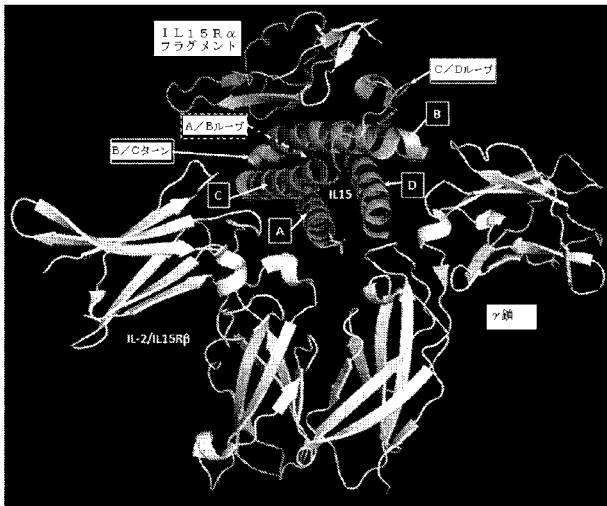
【 図 3 】

構造 モチーフ	ヘリックスA		A/βループ	
アミノ酸 位置	N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L V T E S D	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30		
可能性のある PEG部位	ヘリックスB		B/αターン	
構造 モチーフ	ヘリックスC		C/βループ	
アミノ酸 位置	V H P S C K V T A M K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H	31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60		
可能性のある PEG部位	ヘリックスD		ヘリックスE	
構造 モチーフ	ヘリックスC		ヘリックスD	
アミノ酸 位置	D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E	61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90		
可能性のある PEG部位	ヘリックスD		ヘリックスE	
構造 モチーフ	ヘリックスC		ヘリックスD	
アミノ酸 位置	L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S	91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114		
可能性のある PEG部位	ヘリックスE			

【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 5 】

構造 モチーフ	ヘリックスA		A/βループ	
アミノ酸 位置	N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L V T E S D	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30		
可能性のある PEG部位	ヘリックスB		B/αターン	
構造 モチーフ	ヘリックスC		C/βループ	
アミノ酸 位置	V H P S C K V T A M K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H	31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60		
可能性のある PEG部位	ヘリックスD		ヘリックスE	
構造 モチーフ	ヘリックスC		ヘリックスD	
アミノ酸 位置	D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E	61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90		
可能性のある PEG部位	ヘリックスD		ヘリックスE	
構造 モチーフ	ヘリックスC		ヘリックスD	
アミノ酸 位置	L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S	91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114		
可能性のある PEG部位	ヘリックスE			



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2015/055156

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395 (2016.01) CPC - A61K 39/3955 (2016.02) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/00, 38/20, 39/395, 47/48, 9/00; C07K 14/54, 16/24, 17/08, 19/00; C12N 15/24; C40B 40/10 (2016.01) CPC - A61K 39/3955, 47/48215, 9/0019; C07K 16/244, 2317/92; G01N 33/6869 (2016.02) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/85.2; 530/351 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Orbit, Google Patents, Google Scholar, Google. Search terms used: (tryptophan OR Trp OR W) w5 substit* interleukin 15 mutant tryptophan asparagine substitution ((interleukin "15") OR (L "15")) AND (asn1tyr OR N1Y)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0158938 A1 (BERNARD et al) 30 June 2011 (30.06.2011) entire document	1, 2, 11, 12, 36-47, 50-55, 72-79, 112-125, 129-132
A	US 2014/0235700 A1 GIRARD-GAGNEPAIN et al) 21 August 2014 (21.08.2014) entire document	1, 2, 11, 12, 36-47, 50-55, 72-79, 112-125, 129-132
A	GRABSTEIN et al. "Cloning of a T Cell Growth Factor That Interacts with the 1P Chain of the Interleukin-2 Receptor," Science, 13 May 1994 (13.05.1994), Vol. 264, Pgs. 965-967, entire document	1, 2, 11, 12, 36-47, 50-55, 72-79, 112-125, 129-132
A	US 8,349,311 B2 (WITTRUP et al) 08 January 2013 (08.01.2013) entire document	1, 2, 11, 12, 36-47, 50-55, 72-79, 112-125, 129-132
A	US 2006/0057102 A1 (ZHENG et al) 16 March 2006 (16.03.2006) entire document	1, 2, 11, 12, 36-47, 50-55, 72-79, 112-125, 129-132
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 March 2016		Date of mailing of the international search report 07 APR 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-9300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/055156

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
 on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:  
SEQ ID NOs: 1-20 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/055156

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

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

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

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

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

see Extra Sheet.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 2, 11, 12, 36-47, 50-55, 72-79, 112-125, and 129-132 to the extent that they read on the peptide with a helix A, encoded by SEQ ID NO: 3, with amino acid substitution Asn1Tyr.

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/055156

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-132 are drawn to a peptide.

The first invention of Group I+ is restricted to a peptide, wherein the peptide is selected to be SEQ ID NO: 3 comprising the amino acid substitution Asn1Tyr. It is believed that claims 1, 2, 11, 12, 36-47, 50-55, 72-79, 112-125, and 129-132 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the peptide with a helix A, encoded by SEQ ID NO: 3, with amino acid substitution Asn1Tyr.

Applicant is invited to elect additional polypeptides with specified SEQ ID NO to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a peptide, wherein the peptide is selected to be SEQ ID NO: 3 comprising the amino acid substitution Val3Tyr. Additional peptides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for the peptide amino acid sequence, where "the peptide comprises at least one amino acid substitution at one of the following positions: 1, 3, 13-15, 17-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, or 114."

The Groups I+ share the technical features of a peptide comprising: a) a Helix A, b) an A/B Inter-helix Junction, c) a Helix B, d) a B/C Inter-helix Junction, e) a Helix C, f) a C/D Inter-helix Junction and g) a Helix D; and wherein the peptide further comprises at least one amino acid substitution, addition or deletion to one or more of a) - g) and a peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, "Cloning of a T Cell Growth Factor That Interacts with the  $\beta$  Chain of the Interleukin-2 Receptor" to Grabstein et al. discloses a peptide comprising a substitution of at least one amino acid residue of Helix B other than amino acid residues 32 (H), 35 (C), 40 (M), 42-44 (CFL), 47 (L) or 50 (I); a substitution of at least one amino acid residue of Helix C other than amino acid residues 59 (I), 61-66 (DTVENL; SEQ ID NO:38), or 68-70 (LA); and a substitution of at least one amino acid residue of the C/D Inter-helix Junction other than amino acid residues 85 (C) or 88 (C) (the sequence of simian IL-15 has been submitted to GenBank-EMBL (accession number U03099), Pg. 966, left-hand column;

MRISKPHLRISISIQCYLCLLLKSHFLTEAGIHVIFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISHESGDTDIHDTVENLILANNILSSNGNITESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFINTS, GenBank Accession Number U03099), wherein this peptide inherently comprises a Helix A, an A/B Inter-helix Junction, a Helix B, a B/C Inter-helix Junction, a Helix C, a C/D Inter-helix Junction, and a Helix D.

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 17/00 (2006.01)	C 0 7 K 17/00	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
	A 6 1 P 31/22	

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

- (74)代理人 100137213  
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100151448  
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483  
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100203035  
弁理士 五味淵 琢也
- (74)代理人 100185959  
弁理士 今藤 敏和



(74)代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255  
弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267  
弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812  
弁理士 城山 康文

(72)発明者 マコーリー, スコット  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 1 2 7、サン・フランシスコ、テレシータ・ブールバード  
・ 6 6 0

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA95 BB11 CC04 CC07 CC35 DD69A EE23A EE41A EE59  
FF31  
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA21 BA22 BA42 CA26 DA12 MA66  
NA14 ZB071 ZB072 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB331 ZB332  
4C085 AA14 BB17 CC23 EE01 GG04  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA05 BA10 BA32 BA40 BA41 BA53  
BA55 BA57 CA40 DA02 DA70 DA76 EA20 FA74 FA80