



등록특허 10-2748188



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월03일
(11) 등록번호 10-2748188
(24) 등록일자 2024년12월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/20 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) *C07K 14/54* (2024.01)
C07K 14/715 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/2086 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7032255
- (22) 출원일자(국제) 2018년03월30일
심사청구일자 2021년03월09일
- (85) 번역문제출일자 2019년10월30일
- (65) 공개번호 10-2019-0135036
- (43) 공개일자 2019년12월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/025366
- (87) 국제공개번호 WO 2018/183821
국제공개일자 2018년10월04일
- (30) 우선권주장
62/480,339 2017년03월31일 미국(US)
15/937,493 2018년03월27일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US20090148449 A1*
US20140205560 A1*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
알토 바이오사이언스 엘엘씨
미국 캘리포니아 92032 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920
- (72) 발명자
슈레스타 니라즈
미국, 33025 플로리다, 미라마, 노스 커머스 파크 웨이 2810
리우 바이
미국 33024 플로리다, 쿠퍼 씨티, 엔더블유 39번 가 9631
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 신세기

전체 청구항 수 : 총 14 항

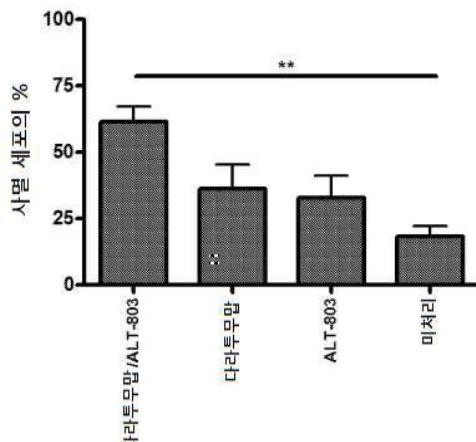
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위해 항-CD38 항체와 조합되는 ALT-803

(57) 요약

본 발명은 암 및 감염성 질병에 걸린 대상체를 효과적으로 치료하기 위해 IL-15-기반 초효능제 복합체와 항체를 사용하는 조합 요법을 특징으로 한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

C07K 14/5443 (2013.01)

C07K 14/7155 (2013.01)

C07K 16/2863 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

로데 피터

미국 33025 플로리다, 미라마, 노스 커머스 파크웨

이 2810

왕 헉 씨.

미국 33332 플로리다, 웨스톤, 웨스트월스 스트리트
2966

명세서

청구범위

청구항 1

신생물증 치료용 약제학적 조성물로서,

- 1) 유효량의 항-CD38 항체 및
- 2) 유효량의 IL-15:IL-15R α 복합체를 포함하고,

상기 항-CD38 항체는 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP)을 매개 할 수 있는 Fc 도메인을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 IL-15:IL-15R α 복합체는 이량체 IL-15R α Su/Fc 분자와 2개의 IL-15N72D 분자 사이의 복합체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

스테로이드를 더 포함하고,

상기 스테로이드는 코르티코스테로이드, 해열제 및 항히스타민제를 포함하는 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 IL-15N72D 분자는 SEQ ID NO: 3을 포함하거나, 또는 상기 IL-15R α Su/Fc는 SEQ ID NO: 6을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 신생물증은 혈액 암, B-세포 신생물, 다발성 골수종(MM), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 원발성 전신 아밀로이드증, 맨틀 세포 림프종, NK 세포 백혈병, NK 또는 T-세포 림프종, 형질 세포 백혈병, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 호지킨 림프종, 및 고형 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 유효량의 IL-15:IL-15R α 복합체는 매일, 주 1회 또는 2회 또는 월 1회 또는 2회 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 IL-15:IL-15R α 복합체의 상기 유효량은 0.1 μ g/kg 내지 100 mg/kg인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항-CD38 항체는 다라투무맙, 이사톡시맙(SAR650984), 또는 MOR202인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

대상체에 상기 항-CD38 항체와 상기 IL-15:IL-15R α 복합체의 투여 후 상기 대상체에서 종양 세포에 대해 상기 항-CD38 항체에 의해 매개되는 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP)은 적어도 5% 증강되는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

대상체에 상기 항-CD38 항체와 상기 IL-15:IL-15R α 복합체의 투여는,

- 혈액 NK세포, T세포, 호중구, 대식세포, 수지상세포 또는 단핵구의 수 또는 활성의 수준을 증가시키고, 또는
- 종양 세포를 사멸시키기 위해 CD4+ 또는 CD8+ T세포를 자극하고, 또는
- 종양 세포를 사멸시키기 위해 NK세포를 자극하고, 또는
- 종양 세포를 사멸시키기 위해 호중구 또는 단핵구 세포를 자극하는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

대상체에 상기 항-CD38 항체와 상기 IL-15:IL-15R α 복합체의 투여는,

- 종양 세포의 수의 감소를 가져오고, 또는
- 신생물증의 질병 진행을 감소시키는 결과를 가져오는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 항CD38 항체와 상기 IL-15:IL-15R α 복합체는 동시에 또는 순차적으로 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

신생물증 치료용 키트로서,

- 1) 유효량의 항-CD38 항체 및
- 2) 유효량의 IL-15:IL-15R α 복합체를 포함하고,

상기 항-CD38 항체는 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP)을 매개 할 수 있는 Fc 도메인을 포함하는, 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 IL-15:IL-15R α 복합체는 이량체 IL-15R α Su/Fc 분자와 2개의 IL-15N72D 분자 사이의 복합체를 포함하는, 키트.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 3월 31일에 출원된 미국 가출원 62/480,339 및 2018년 3월 27일에 출원된 미국 출원 15/937,493의 이익을 주장하며, 이들 출원의 전체 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

발명의 분야

[0004] 본 발명은 전반적으로 암 및 자가면역 및 염증성 질병의 치료를 위한 요법의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 본원에 기재된 발명 이전에, 암에 대한 면역 활성을 증강시키고/증강시키거나 이를 유도하고, 자가면역 및 염증성 질병을 개선하기 위한 새로운 전략을 개발할 필요성이 절실했다.

선행기술문헌

특허문헌

공개특허공보 제10-2018-0126632호 (2018. 11. 27.)

발명의 내용

[0006] 본 발명은 인터류킨-15(IL-15) 초효능체(superagonist) 돌연변이체와 이량체 IL-15 수용체 α /Fc 융합 단백질의 복합체인 ALT-803과 조합된 항-CD38 항체가 신생물증(neoplasia)(예를 들어, 혈액 암, B-세포 신생물, 다발성 골수종(MM), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 원발성 전신 아밀로이드증, 맨틀 세포 림프종, NK 세포 백혈병, NK 또는 T-세포 림프종, 형질 세포 백혈병, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 호지킨 림프종, 및 고형 종양)에 대한 면역 반응을 향상시키거나 항체-관련 자가면역 및 염증성 질병(예를 들어, 전신 성 홍반성 루푸스(SLE), 혈관염, 자가면역 혈구감소증, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 이식 편 대 숙주 질환 및 알레르기 반응)과 관련된 면역 반응을 억제하는 데 유용하다는 놀라운 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0007] 대상체에서 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병을 치료하는 방법은 대상체에게 유효량의 항-CD38 항체(또는 항체-유사 분자)와 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 복합체(ALT-803)를 포함하는 유효량의 약학 조성물을 투여함으

로써 수행되며, 여기서 ALT-803은 이량체 IL-15R α Su/Fc와 2개의 IL-15N72D 분자를 포함한다. 일 양태에서, IL-15N72D 분자는 SEQ ID NO: 3을 포함한다. 예시적인 IL-15R α Su/Fc는 SEQ ID NO: 6을 포함한다.

[0008] 대상체는 바람직하게는 그러한 치료가 필요한 포유 동물, 예를 들어, 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병으로 진단되거나 그에 대한 소인이 있는 것으로 진단된 대상체이다. 포유 동물은 임의의 포유 동물, 예를 들어, 인간, 영장류, 마우스, 랙트, 개, 고양이, 밸뿐만 아니라 식용으로 사육되는 가축 또는 동물, 예를 들어, 소, 양, 돼지, 닭, 및 염소이다. 바람직한 구현예에서, 포유 동물은 인간이다.

[0009] 본원에 기재된 방법으로 치료하기 위한 적합한 신생물증에는 혈액 암, B-세포 신생물, 다발성 골수종(MM), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 원발성 전신 아밀로이드증, 맨틀 세포 림프종, NK 세포 백혈병, NK 또는 T-세포 림프종, 형질 세포 백혈병, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 베켓 림프종, 호지킨 림프종, 및 고형 종양이 있다. 본원에 기재된 방법을 이용하여 치료하기 위한 예시적인 자가면역/염증성 질병에는 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 혈관염, 자가면역 혈구감소증, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 이식편 대 숙주 질환, 중증 알레르기 반응 및 천식이 있다(문헌[van de Donk, et al. 2016. Immunol Rev. 270: 95-112]).

[0010] 바람직하게는, 본원에 기재된 조성물의 투여는 질병의 치료 후 신생물증 또는 자가면역/염증성 질병의 향후 재발을 또한 방지한다. 본원에 기재된 치료적 접근법은 텍사메타손, 보르테조립, 레날리도마이드, 탈리도마이드, 보르테조립/독실, 카르필조립, 포말리도마이드, 파노비노스타트, 엘로투주맙, 의사조립, 및 글리코실화된 멜팔란을 포함하지만 이로 한정되지 않는 MM을 치료하는 데 효과적인 것으로 밝혀진 다른 작용제와 또한 조합될 수 있다. 본 발명의 치료적 접근법은 방사선, 화학요법, 수술, 치료용 항체, 면역 조절제, 프로테아좀 저해제, pan-DAC 저해제, H-DAC 저해제, 체크포인트 저해제, CAR T 및 NK 세포 요법을 포함하는 입양 세포 요법, 및 백신 중 임의의 요법과 또한 조합될 수 있다. 추가로, 이들 요법은 치료무경험(treatment naive) 환자 또는 재발된 또는 불응성 질병이 있는 환자에서 사용될 수 있다.

[0011] 추가로, 스테로이드(즉, 코르티코스테로이드제, 해열제 및 항히스타민제)를 사용한 투약 전 및 투약 후 전략이 전형적으로 ALT-803 + 항-CD38 Ab 요법과 함께 사용된다. 항-CD38 Ab의 투여는 종종 치료를 지연시키거나 종료 시킬 수 있고 환자에게 통증 및 불편을 야기할 수 있는 유의한 주입 반응을 초래한다. 스테로이드는 이러한 효과를 줄이기 위해 사용되지만 치료 이익에 필요한 면역 반응을 또한 억제할 수 있다. 놀랍게도, ALT-803 + 항-CD38 Ab 요법은 스테로이드를 사용한 전처리의 존재 및 부재 하에서 동물 종양 모델에서 동등하게 효과적인 것으로 밝혀졌다.

[0012] ALT-803의 예시적인 유효 용량은 kg 체중당 0.1 μg 내지 100 mg, 예를 들어, kg 체중당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 또는 900 μg이나 kg 체중당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 mg이다.

[0013] 일부 경우에, ALT-803은 매일, 예를 들어, 24시간마다 투여된다. 또는, ALT-803은 연속적으로 투여되거나 1일당 수회, 예를 들어, 1시간마다, 2시간마다, 3시간마다, 4시간마다, 5시간마다, 6시간마다, 7시간마다, 8시간마다, 9시간마다, 10시간마다, 11시간마다, 또는 12시간마다 투여된다.

[0014] ALT-803의 예시적인 유효 일일 용량은 kg 체중당 0.1 μg 내지 100 μg, 예를 들어, kg 체중당 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 99 μg을 포함한다.

[0015] 대안적으로, ALT-803은 주 약 1회, 예를 들어, 7일마다 약 1회 투여된다. 또는, ALT-803은 주 2회, 주 3회, 주 4회, 주 5회, 주 6회, 또는 주 7회 투여된다.

[0016] ALT-803의 예시적인 유효 주당 용량은 kg 체중당 0.0001 mg 내지 4 mg, 예를 들어, kg 체중당 0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 또는 4 mg을 포함한다. 예를 들어, ALT-803의 유효 주당 용량은 0.1 μg/kg 체중 내지 400 μg/kg 체중이다. 대안적으로, ALT-803은 고정 용량으로 또는 신체 표면적을 기준으로(즉, $\frac{2}{3}$ 당) 투여된다.

[0017] 일부 경우에, 대상체는 4주의 ALT-803 정맥내 투여에 이은 2주 휴식 기간으로 이루어진 2회의 6주 사이클을 적용받는다. 궁극적으로, 주치의 또는 수의사가 적절한 양과 투여 요법을 결정한다.

[0018] 본원에 기재된 조성물은 전신, 정맥내, 피하, 근육내, 복강내, 방광내, 또는 점적주입에 의해 투여된다. 항체 및 ALT-803은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0019]

바람직하게는, 본 발명의 항체(Ab)는 CD38 단백질(사이클릭 ADP 리보스 가수분해효소) 상의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 바람직한 항체는, 설치류, 인간, 키메라 및 인간화된 형태를 포함할 수 있는, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린(Ig) 단백질로 구성된다. 추가로, 본원에 기재된 방법은 항체-유사 분자, 예컨대 항원 결합 도메인(예를 들어, 단일 쇄 항체, Fab, Fv, T-세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인 또는 수용체 결합 도메인)을 포함하는 분자를 이용할 수 있다. 일부 경우에, 이들 도메인은 바람직하게는 Fc 도메인에 연결된다. Ig는 임의의 공지된 아이소타입(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG2a, IgG2b, 및 IgM)일 수 있다. 항-CD38 Ab(또는 항체-유사 분자)를 사용하는 본원에 기재된 일부 적용에서, Ab(또는 항체-유사 분자)는 Fc 수용체와 상호 작용하여 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP)을 매개할 수 있는 중쇄 또는 Fc 도메인을 함유한다. 다른 경우에, 이펙터 분자에 접합된 항체가 사용될 수 있다. 다른 적용에서, 바람직한 Ab(또는 항체-유사 분자)는 ADCC 또는 ADCP를 효과적으로 매개할 수 없는 중쇄 또는 Fc 도메인(예를 들어, IgG4 Fc)을 함유한다. 항-CD38 항체는 다라투무맙(daratumumab)(DARZALEX174®), 이사툭시맙(isatuximab)(SAR650984), MOR202, Ab79, AB19, 및 MT-4019를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0020]

일 양태에서, 시험관내 또는 생체내에서의 항-CD38 항체 처리에 대한 ALT-803의 첨가는 질병 세포 또는 질병-관련 세포에 대한 면역 세포의 세포독성을 증가시킨다. 일부 경우에, ALT-803은 CD38-특이적 항체(또는 항체-유사 분자)에 의해 매개되는 종양 또는 자가면역 질병-관련 세포에 대한 ADCC 또는 ADCP 활성을 증강시키기 위해 면역 세포를 자극할 수 있다. 일 구현예에서, ALT-803에 의한 면역 세포의 처리는 항-CD38 항체에 의해 매개되는 질병 세포 또는 질병-관련 세포에 대한 ADCC 또는 ADCP 활성을 적어도 5%, 예를 들어, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 100% 증가시킨다. 바람직한 구현예에서, 면역 세포는 ALT-803으로 처리되어, 항-CD38 항체에 의해 매개되는 ADCC 또는 ADCP를 통해 종양 세포를 사멸시키는 데 사용되며, 여기서 종양 세포 사멸의 수준은 ALT-803으로 처리되지 않은 면역 세포의 경우 관찰되는 수준보다 적어도 5% 높고, 예를 들어, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 100% 높다. 바람직한 구현예에서, 대상체에서의 종양-특이적 ADCC 또는 ADCP는 ALT-803 및 항체 투여 후에 적어도 5%, 예를 들어, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 100% 증강된다. 특정 구현예에서, NK 세포-기반 ADCC 활성을 ALT-803 처리에 의해 증강된다.

[0021]

다른 경우에, ALT-803은 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 자극하여 질병 세포 또는 질병-관련 세포, 예를 들어, 종양 세포 또는 감염된 세포를 사멸시킨다. 바람직하게는, ALT-803 처리는 면역 세포 세포용해 활성을 자극하고, 항-CD38 항체는 질병 세포를 표적화하여, 조합시에 이들 처리가 종양 또는 자가면역-관련 면역 세포에 대해 매우 효과적이고/효과적이거나 지속성있는 활성을 제공하도록 한다. 일부 구현예에서, ALT-803은 인터페론 감마(IFN-γ) 및/또는 IL-6의 혈청 수준을 증가시키고, NK 및 T 세포 증식을 자극하고, CD25, CD69, 퍼포린 및 그랜자임을 포함하는 활성화 마커의 NK 및 T 세포 발현을 상향 조절한다. 이들 마커의 유도는 질병 세포에 대한 면역 세포의 반응성 또는 세포용해 활성을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법은 NK 세포를 자극하여 종양 또는 자가면역-관련 면역 세포를 사멸시킨다.

[0022]

다른 구현예에서, ALT-803은 호중구 또는 단핵구 세포를 포함하는 다른 선천성 면역 세포의 활성을 및/또는 수준을 직접 또는 간접적으로 유도한다. 그러한 세포는 질병 세포, 예를 들어, 종양 세포에 대한 치료용 항체의 ADCC 및 ADCP를 매개하는 것으로 알려져 있다(문헌[Golay, et al. Blood. 2013 122:3482-91], 문헌[Richards, et al, Mol Cancer Ther 2008 7:2517-27]). 바람직하게는, ALT-803와 항-CD38 항체의 조합 요법은 암 또는 자가면역/염증성 질병이 있는 환자에서 적어도 부분적으로 선천성 면역 세포에 의해 매개되는 메커니즘을 통해 개선된 임상 반응을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법은 호중구 또는 단핵구 세포를 자극하여 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포를 사멸시킨다. 일 예에서, ALT-803은 ADCP를 포함하는 대식세포 반응을 활성화시키는 사이토카인 또는 다른 작용제를 생성하는 NK 세포를 자극할 수 있으며, 이에 따라 항-CD38 Ab에 의해 매개되는 더욱 효과적인 종양 세포 사멸을 제공한다.

[0023]

바람직하게는, 본원에 기재된 방법은 본원의 조성물의 투여 전의 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포의 수와 비교하여 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포의 수를 감소시킨다. 대안적으로, 본원에 기재된 방법은

신생물증 또는 자가면역/염증성 질병의 질병 진행 감소를 가져온다. 바람직하게는, 본원에 기재된 방법은 미처리된 대상체와 비교하여 대상체의 생존 연장을 가져온다.

- [0024] 신생물증 치료용 키트가 또한 제공되며, 이 키트는 유효량의 ALT-803, 항체, 및 신생물증 치료용 키트의 사용 지침을 포함한다.
- [0025] 자가면역 또는 염증성 질병 치료용 키트는 유효량의 ALT-803, 항체, 및 자가면역 또는 염증성 질병 치료용 키트의 사용 지침을 포함한다.
- [0026] 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체의 특정 양태에서, IL-15 폴리펩타이드는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 상이한 아미노산 서열을 갖는 IL-15 변이체이다. 인간 IL-15 폴리펩타이드는 본원에서 huIL-15, hIL-15, huIL15, hIL15, IL-15 야생형(wt)으로 지칭되고, 이의 변이체는 천연 아미노산, 성숙 서열에서의 그의 위치 및 변이체 아미노산을 사용하여 지칭된다. 예를 들어, huIL15N72D는 72번 위치에서의 N의 D로의 치환을 포함하는 인간 IL-15를 지칭한다. 일 양태에서, IL-15 변이체는, 예를 들어, 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 IL-15R β γC 수용체에 대한 증가된 결합 활성에 의해 입증된 바와 같이 IL-15 효능제로서 기능한다. 대안적으로, IL-15 변이체는, 예를 들어, 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 IL-15R β γC 수용체에 대한 감소된 결합 활성에 의해 입증된 바와 같이 IL-15 길항제로서 기능한다.
- [0027] 표적 세포를 사멸시키는 방법은, IL-15 도메인에 의해 인식되는 IL-15R 쇄를 보유한 면역 세포, 또는 Fc 도메인에 의해 인식되는 Fc 수용체 쇄를 보유한 면역 세포, 및 항-CD38 항체에 의해 인식되는 CD38 항원을 보유한 표적 세포를 추가로 포함하는 복수의 세포를, 항체 및 ALT-803과 접촉시키고, 표적 세포를 사멸시킴으로써 수행된다. 예를 들어, 표적 세포는 자가면역 또는 염증성 질병과 관련된 종양 세포 또는 면역 세포이다.
- [0028] CD38 항원을 발현하는 질병 세포를 사멸시키는 방법은 면역 세포를 유효량의 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 복합체(ALT-803)로 처리하고, ALT-803-처리 면역 세포를 항-CD38 항체 및 CD38 항원을 발현하는 질병 세포와 혼합하고, ALT-803-처리 면역 세포 및 CD38-특이적 항체에 의해 매개되는 ADCC 또는 ADCP를 통해 질병 세포를 사멸시킴으로써 수행된다. 방법의 일 양태에서, ALT-803-처리 면역 세포(즉, NK 세포)는 대식세포를 활성화시켜 항-CD38 Ab를 통해 종양 세포에 대한 ADCP를 매개할 수 있다. 일 양태에서, 질병 세포 사멸 수준은, ALT-803으로 처리되지 않은 면역 세포에 의해 매개되는 수준과 비교하여 적어도 5%, 예를 들어, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 100% 증가된다.
- [0029] 본 발명은 질병 세포가 CD38 항원을 발현하는 환자에서 질병을 예방하거나 치료하는 방법을 또한 제공하며, 이 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다: 복수의 세포를 항-CD38 항체 및 ALT-803과 접촉시키는 단계, 및 환자에서 질병을 예방하거나 치료하기에 충분하게 질병 세포를 손상시키거나 사멸시키는 단계. 바람직한 구현예에서, ALT-803과 항-CD38 항체의 조합 요법은 질병 진행을 감소시키고/감소시키거나 환자 생존을 연장시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명은 유효량의 항-CD38 항체 및 유효량의 ALT-803을 포유 동물에게 투여함으로써 포유 동물에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.
- [0031] 구체적으로, 대상체에서 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병을 치료하는 방법은 대상체에게 유효량의 항-CD38 항체(또는 항체-유사 분자) 및 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 복합체(ALT-803)를 포함하는 유효량의 약학 조성물을 투여함으로써 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병을 치료함으로써 수행되며, 여기서 ALT-803은 이양체 IL-15R α Su/Fc와 2개의 IL-15N72D 분자를 포함한다. 일부 경우에, 방법은 상기 항체 또는 상기 ALT-803의 투여 전, 투여 동안 또는 투여 후에 스테로이드에 의한 처리를 추가로 포함하며, 여기서 스테로이드는 코르티코스테로이드제, 해열제 및 항히스타민제를 포함하는 군으로부터 선택된다. 일 양태에서, IL-15N72D 분자는 SEQ ID NO: 3을 포함한다. 또 다른 양태에서, IL-15R α Su/Fc는 SEQ ID NO: 6을 포함한다. 예를 들어, 신생물증은 혈액암, B-세포 신생물, 다발성 골수종(MM), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 원발성 전신 아밀로이드증, 맨틀 세포 림프종, NK 세포 백혈병, NK/T-세포 림프종, 형질 세포 백혈병, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 베켓 림프종, 호지킨 림프종, 및 고형 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0032] 바람직하게는, ALT-803의 유효량은 매일 또는 주 1회 또는 2회 투여된다. 선택적으로, 상기 ALT-803의 유효량은 0.1 μ g/kg 내지 100 mg/kg이다. 예를 들어, 약학 조성물은 전신, 정맥내, 피하, 근육내, 복강내, 방광내, 또는 점滴주입에 의해 투여된다. 예시적인 항-CD38 항체는 다라투무맙, 이사툭시맙(SAR650984), 및 MOR202를 포함한

다.

[0033] 대상체에서의 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포에 대한 항체에 의해 매개되는 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP)은 투여 후 적어도 5%, 예를 들어, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 100% 증강된다.

[0034] 바람직하게는, 항체 및 ALT-803은 혈액 NK 세포, T 세포, 호중구, 대식세포, 수지상 세포 또는 단핵구의 수 또는 활성의 수준을 증가시킨다. 일부 경우에, 항체 및 ALT-803은 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포를 자극하여 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포를 사멸시킨다. 또 다른 경우에, 항체 및 ALT-803은 NK 세포를 자극하여 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포를 사멸시킨다. 항체 및 ALT-803은 호중구 또는 단핵구 세포를 자극하여 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포를 사멸시킨다. 항체와 ALT-803의 투여는 종양 또는 자가면역/염증-관련 면역 세포의 수의 감소를 가져온다. 대안적으로, 또는 추가로, 항체와 ALT-803의 투여는 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병의 진행 감소를 가져온다. 항체와 ALT-803의 투여는 미처리된 대상체와 비교하여 대상체의 생존 연장을 가져온다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.

[0035] 일 양태에서, 항체와 ALT-803은 동시에 투여된다. 또 다른 양태에서, 항체와 ALT-803은 순차적으로 투여된다. 바람직하게는, 투여는 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병의 향후 재발을 예방한다.

[0036] 신생물증 치료용 키트가 또한 제공되며, 이 키트는 유효량의 ALT-803, 항-CD38 항체, 및 신생물증 치료용 키트의 사용 지침을 포함한다. 유사하게, 자가면역 또는 염증성 질병 치료용 키트가 제공되며, 이 키트는 유효량의 ALT-803, 항-CD38 항체, 및 자가면역 또는 염증성 질병 치료용 키트의 사용 지침을 포함한다.

[0037] CD38 항원을 발현하는 질병 세포 또는 질병-관련 세포를 사멸시키는 방법은 면역 세포를 유효량의 IL-15N72D: IL-15R α Su/Fc 복합체(ALT-803)로 처리하고, ALT-803-처리 면역 세포를, 항-CD38 항체 및 CD38 항원을 발현하는 질병 세포 또는 질병-관련 세포와 혼합하고, 질병 세포 또는 질병-관련 세포를 사멸시킴으로써 수행된다. 예를 들어, 질병 세포 사멸 수준은 ALT-803으로 처리되지 않은 면역 세포에 의해 매개되는 수준과 비교하여 적어도 5%, 예를 들어, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 증가된다. ALT-803-처리 면역 세포는 다른 면역 세포를 자극하여 질병 세포 또는 질병-관련 세포를 사멸시켰다. 일 양태에서, ALT-803-처리 면역 세포는 다른 면역 세포를 자극하여 질병 세포 또는 질병-관련 세포를 사멸시켰다. 예를 들어, 질병 세포 또는 질병-관련 세포의 사멸은 ALT-803-처리 면역 세포 및 항-CD38 항체를 통해 ADCC 또는 ADCP에 의해 매개된다. 예시적인 질병-관련 세포는 종양 세포를 포함한다. 일부 경우에, 질병-관련 세포는 자가면역 또는 염증성 질병과 관련된다.

[0038] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고 문헌은 당업자에게 본 발명에서 사용된 많은 용어의 일반적인 정의를 제공한다: 문헌[Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994)]; 문헌[The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)]; 문헌[The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)]; 및 문헌[Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에 사용되는 바와 같이, 하기 용어들은 달리 명시되지 않는 한 이하에 부여된 의미를 갖는다.

[0039] "작용제"는 팝타이드, 핵산 분자, 또는 작은 화합물을 의미한다. 예시적인 치료제는 ALT-803이다.

[0040] "ALT-803"은 이량체 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질과 비공유 결합된 IL-15N72D를 포함하며 면역 자극 활성을 갖는 복합체를 의미한다. 일 구현예에서, IL-15N72D 및/또는 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질은 참조 서열에 비해 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과의 아미노산 변이를 포함한다. 예시적인 IL-15N72D 아미노산 서열이 이하에 제공된다.

[0041] "개선"은 질병의 전개 또는 진행을 감소시키거나, 억제하거나, 약화시키거나, 축소시키거나, 정지시키거나, 안정화시키는 것을 의미한다.

[0042] "유사체"는 동일하지 않지만 유사한 기능적 또는 구조적 특징을 갖는 분자를 의미한다. 예를 들어, 폴리펩타이드 유사체는 상응하는 자연 발생적 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 유지하면서 자연 발생적 폴리펩타이드에 비해 유사체의 기능을 향상시키는 특정 생화학적 변형을 갖는다. 그러한 생화학적 변형은, 예를 들어, 리간드 결합을 변경시키지 않으면서 유사체의 프로테아제 저항성, 막 투과성, 또는 반감기를 증가시킬 수 있다. 유사체는

비천연 아미노산을 포함할 수 있다.

- [0043] 본 발명은 항체, 또는 요망되는 생물학적 활성을 나타내는 한, 그러한 항체의 단편을 포함한다. 인간화 항체와 같은 키메라 항체가 본 발명에 또한 포함된다. 일반적으로, 인간화 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 인간화는, 예를 들어, 설치류 상보성-결정 영역의 적어도 일부로 인간 항체의 상응하는 영역을 치환함으로써 당업계에 기술된 방법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0044] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "항체"(Ab)는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체), 및 요망되는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 단편을 포함한다. 용어 "면역글로불린"(Ig)은 본원에서 "항체"와 상호 교환적으로 사용된다.
- [0045] "항체 유사" 문자는 항체와 비교하여 유사한 구조 및/또는 유사한 기능을 갖는 문자를 의미한다. 예시적인 항체-유사 문자는 항원 결합 도메인(예를 들어, 단일 쇄 항체, Fab, Fv, T-세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인 또는 수용체 결합 도메인)을 포함하는 문자를 포함한다.
- [0046] "단리된 항체"는 그의 자연 환경의 성분으로부터 분리되고/분리되거나 회수된 것이다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단적 또는 치료적 사용을 방해하는 물질이며, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항체는 (1) 로우리법에 의해 결정되는 바와 같이 95 중량% 초파, 가장 바람직하게는 99 중량% 초파의 항체로 정제되거나; (2) 스피닝 컵 시퀀네이터(spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 수득하기에 충분한 정도로 정제되거나; (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비-환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 균질하게 정제되었다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내(*in situ*) 항체를 포함하는데, 이는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0047] 기본 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 구성된 이종사량체 당단백질이다. IgM 항체는 J 쇄라고 일컬어지는 추가 폴리펩타이드와 함께 기본 이종사량체 단위 5개로 이루어지며, 이에 따라 10 개의 항원 결합 부위를 함유하는 한편, 분비된 IgA 항체는 중합되어, J 쇄와 함께 기본 4-쇄 단위 2개 내지 5개를 포함하는 다가 어셈블리지(assemblage)를 형성할 수 있다. IgG의 경우, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 쇄는 1개의 이황화물 공유 결합에 의해 H 쇄에 연결되는 한편, 2개의 H 쇄는 H 쇄 아이소타입에 따라 1개 이상의 이황화물 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇄내 이황화물 브릿지를 갖는다. 각각의 H 쇄는 N-말단에서 가변 도메인(V_H)을 가지며, 이어서 α 및 γ 쇄 각각에 대한 3개의 불변 도메인(C_H) 및 μ 및 ϵ 아이소타입에 대한 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각각의 L 쇄는 N-말단에서 가변 도메인(V_L)을 가지며, 이어서 그의 다른 단부에서 불변 도메인(C_L)을 갖는다. V_L 은 V_H 와 정렬되고, C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인(C_H1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기들은 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. V_H 및 V_L 의 쌍형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 다양한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어 문헌[Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994]의 71 페이지 및 챕터 6을 참조한다.
- [0048] 임의의 척추동물 종으로부터의 L 쇄는 불변 도메인(C_L)의 아미노산 서열에 기초하여 카파(κ) 및 람다(λ)라고 일컬어지는 명확하게 별개의 2가지 유형 중 하나로 할당될 수 있다. 중쇄의 불변 도메인(C_H)의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 다양한 클래스 또는 아이소타입으로 할당될 수 있다. 5가지 클래스의 면역글로불린이 존재한다: 각각 알파(α), 델타(δ), 에psilon(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)라고 명명되는 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM. γ 및 α 클래스는 C_H 서열 및 기능의 비교적 작은 차이에 기초하여 서브클래스로 추가로 나뉘며, 예를 들어, 인간은 다음과 같은 서브클래스를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2.
- [0049] 용어 "가변"은 V 도메인의 특정 세그먼트가 항체들 간에 서열이 크게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110 개-아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 대신에, V 영역은 각각 9개 내지 12개의 아미노산 길이인 "초가변 영역"이라고 일컬어지는 극한 가변성의 더 짧은 영역에 의해 분리된 15개 내지 30개의 아미노산의 프레임워크 영역(FR)이라고 일컬어지는 비교적 불변의 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR을 포함하는데, 이들은 주로 β -시트 배위를 채택하고, 3개의 초가변 영역에 의해 연결되며, β -

시트 구조를 연결하고 몇몇 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 쇄 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇄로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 불면 도메인은 항체를 항원에 결합시키는 데 직접 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)에서 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0050] 용어 "초가변 영역"은, 본원에 사용될 때, 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(예를 들어, 카바트(Kabat) 번호매김 체계에 따라 번호가 매겨질 때, V_L 에서의 대략 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 V_H 에서의 대략 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]; 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기(예를 들어, 코티아(Chothia) 번호매김 체계에 따라 번호가 매겨질 때, V_L 에서의 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 V_H 에서의 26-32(H1), 52-56(H2) 및 95-101(H3); 문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]; 및/또는 "초가변 루프"/CDR로부터의 잔기(예를 들어, IMGT 번호매김 체계에 따라 번호가 매겨질 때, V_L 에서의 잔기 27-38(L1), 56-65(L2) 및 105-120(L3), 및 V_H 에서의 27-38(H1), 56-65(H2) 및 105-120(H3); 문헌[Lefranc, M.P. et al. Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999)], 문헌[Ruiz, M. et al. Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)])을 포함한다. 선택적으로, 항체는 하기 지점들 중 하나 이상에서 대칭 삽입을 갖는다: AHo에 따라 번호가 매겨질 때, V_L 에서의 28, 36(L1), 63, 74-75(L2) 및 123(L3), 및 V_H 에서의 28, 36(H1), 63, 74-75(H2) 및 123(H3)(문헌[Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)]).

[0051] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체들은 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 단일 항원 부위에 대해 유도된다. 또한, 다양한 결정인자(에피토프)에 대해 유도된 다양한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제조물과 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 유도된다. 모노클로날 항체는 그의 특이성 이외에 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에서 유용한 모노클로날 항체는 문헌[Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 의해 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 제조한 DNA 방법을 이용하여 만들어질 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조). "모노클로날 항체"는, 예를 들어, 문헌[Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 문헌[Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기술된 기법을 이용하여 과지 항체 라이브러리로부터 또한 단리될 수 있다.

[0052] 모노클로날 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이지만 쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이 "키메라" 항체뿐만 아니라, 요망되는 생물학적 활성을 나타내는 한 그러한 항체의 단편을 포함한다(미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌[Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)] 참조). 인간 항체로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열이 또한 제공된다. 따라서, 본원의 주요 관심 대상 키메라 항체는 하나 이상의 인간 항원 결합 서열(예를 들어, CDR)을 가지며 비-인간 항체로부터 유래된 하나 이상의 서열, 예를 들어, FR 또는 C 영역 서열을 함유하는 항체를 포함한다. 또한, 본원의 주요 관심 대상 키메라 항체는 하나의 항체 클래스 또는 서브 클래스의 인간 가변 도메인 항원 결합 서열 및 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스로부터 유래된 또 다른 서열, 예를 들어, FR 또는 C 영역 서열을 포함하는 키메라 항체를 포함한다. 본원의 관심 대상 키메라 항체는 본원에 기재된 것과 관련되거나 비-인간 영장류(예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)와 같은 상이한 종으로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열을 함유하는 키메라 항체를 또한 포함한다. 키메라 항체는 영장류화 항체 및 인간화 항체를 또한 포함한다.

[0053] 또한, 키메라 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 추가로 개량하기 위해 이루어진다. 추가의 세부사항에 대해서는, 문헌[Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 문헌[Presta, Curr. Op. Struct.

Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0054] "인간화 항체"는 일반적으로 비-인간인 공급원으로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입된 인간 항체인 것으로 간주된다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입(import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 원터(Winter)와 동료들의 방법에 따라(문헌[Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986)]; 문헌[Reichmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988)]; 문헌[Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)]), 유입 초기면 영역 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써, 전통적으로 수행된다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는, 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된, 키메라 항체이다(미국 특허 제4,816,567호).

[0055] "인간 항체"는 인간에 의해 자연적으로 생성된 항체에 존재하는 서열만을 함유하는 항체이다. 그러나, 본원에 사용되는 바와 같이, 인간 항체는, 본원에 기재된 변형 및 변이체 서열을 포함하는 자연 발생적 인간 항체에서 발견되지 않는 잔기 또는 변형을 포함할 수 있다. 이들은 전형적으로 항체 성능을 추가로 개량하거나 향상시키기 위해 이루어진다.

[0056] "무손상" 항체는 항원-결합 부위뿐만 아니라 C_L 및 적어도 중쇄 불변 도메인인 C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.

[0057] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체(미국 특허 제5,641,870호; 문헌[Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중 특이적 항체가 있다.

[0058] 항체의 "기능적 단편 또는 유사체"라는 문구는 전장 항체와 공통된 질적 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들어, 항-IgE 항체의 기능적 단편 또는 유사체는, IgE 면역글로불린에, 그러한 분자가 고친화성 수용체인 Fc_εRI에 결합하는 능력을 갖지 못하게 하거나 그러한 분자의 능력을 실질적으로 감소시키도록 하는 방식으로 결합할 수 있는 것이다.

[0059] 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편이라고 일컬어지는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 잔류 "Fc" 단편을 생성시키며, Fc는 쉽게 결정화되는 능력을 반영하는 명칭이다. Fab 단편은 H 쇄의 가변 영역 도메인(V_H) 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인(C_H1)과 함께 전체 L 쇄로 이루어진다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합에 대하여 1가이다(즉, 단일 항원-결합 부위를 갖는다). 항체의 웨신 처리는 2가 항원-결합 활성을 갖는 2개의 이황화물 연결된 Fab 단편에 대략 상응하고 여전히 항원과 가교할 수 있는 단일 거대 F(ab')₂ 단편을 생성시킨다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 수개의 추가 잔기를 C_H1 도메인의 카르복시 말단에 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유한 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 힌지 시스테인을 사이에 갖는 Fab' 단편들의 쌍으로서 본래 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 알려져 있다.

[0060] "Fc" 단편은 이황화물에 의해 함께 유지되는 두 H 쇄 모두의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체(FcR)에 의해 인식되는 부분이다.

[0061] "Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 단단한 비공유 결합 상태의 1개의 중쇄 가변 영역 도메인과 1개의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다. 이들 2개의 도메인의 폴딩으로부터, 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고 항원 결합 특이성을 항체에 부여하는 6개의 초가변 루프(H 쇄 및 L 쇄 각각으로부터의 3개의 루프)가 나온다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함한 Fv의 절반)조차도 전체 결합 부위보다는 낮은 친화성이지만, 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다.

[0062] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단일-쇄 Fv"는 단일 폴리펩타이드 쇄에 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩타이드는 sFv가 항원 결합을 위한 요망되는 구조를 형성할 수 있게 하는 폴리펩타이드 링커를 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 추가로 포함한다. sFv의 검토에 대해서는, 문헌

[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; 하기 문헌[Borrebaeck 1995]을 참조한다.

[0063] 용어 "디아바디"는 V 도메인들의 쇄내가 아닌 쇄간 쌍형성이 달성되어 2가 단편, 즉, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하도록, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 짧은 링커(약 5개 내지 10개의 잔기)를 갖는 sFv 단편(이전 단락 참조)을 작제함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중 특이적 디아바디는 2개의 항체의 V_H 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩타이드 쇄 상에 존재하는 2개의 "크로스오버(crossover)" sFv 단편의 이종이량체이다. 디아바디는, 예를 들어, EP 404,097호; WO 93/11161호; 및 문헌[Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

[0064] 본원에 사용되는 바와 같이, "내재화되는" 항체는 포유 동물 세포 상의 항원(예를 들어, 세포 표면 폴리펩타이드 또는 수용체)에 결합시에 세포에 의해 흡수되는(즉, 세포로 들어가는) 것이다. 내재화 항체는 물론 항체 단편, 인간 또는 키메라 항체, 및 항체 접합체를 포함할 것이다. 특정 치료적 적용의 경우, 생체내 내재화가 고려된다. 내재화되는 항체 분자의 수는 세포, 특히 감염된 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 저해하기에 충분하거나 적당할 것이다.

[0065] 항체 또는 항체 접합체의 효능에 따라, 일부 경우에, 단일 항체 분자의 세포로의 흡수는 항체가 결합하는 표적 세포를 사멸시키기에 충분하다. 예를 들어, 특정 독소는 항체에 결합된 독소의 한 분자의 내재화가 감염된 세포를 사멸시키기에 충분하도록 사멸에 있어서 매우 강력하다.

[0066] 본원에 사용되는 바와 같이, 항체는 항원과 검출 가능한 수준으로, 바람직하게는 약 $10^4 M^{-1}$ 이상, 약 $10^5 M^{-1}$ 이상, 약 $10^6 M^{-1}$ 이상, 약 $10^7 M^{-1}$ 이상, 또는 $10^8 M^{-1}$ 이상인 친화도 상수 K_a 로 반응하는 경우 항원에 대해 "면역특이적", "특이적"이거나 항원에 "특이적으로 결합"한다고 한다. 동족 항원에 대한 항체의 친화도는 또한 일반적으로 해리 상수 K_D 로 표현되며, 특정 구현예에서, HuM2e 항체는 $10^{-4} M$ 이하, 약 $10^{-5} M$ 이하, 약 $10^{-6} M$ 이하, $10^{-7} M$ 이하, 또는 $10^{-8} M$ 이하의 K_D 로 M2e에 결합하는 경우 이에 특이적으로 결합하는 것이다. 항체의 친화도는 통상적인 기법, 예를 들어, 문헌[Scatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51 :660 (1949))]에 기술된 기법을 이용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0067] 항원, 세포 또는 그의 조직에 대한 항체의 결합 특성은 일반적으로, 예를 들어 면역조직화학(IHC) 및/또는 형광-활성 세포 분류(FACS)와 같은 면역형광-기반 검정을 포함하는, 면역 검출 방법을 이용하여 결정되고 평가될 수 있다.

[0068] 지정된 항체의 "생물학적 특성"을 갖는 항체는 다른 항체와 구별되는 그 항체의 생물학적 특성을 중 하나 이상을 보유하는 항체이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 지정된 항체의 생물학적 특성을 갖는 항체는 지정된 항체에 의해 결합되는 것과 동일한 에피토프에 결합하고/결합하거나 지정된 항체와 공통된 이펙터 기능을 가질 것이다. 용어 "길항체" 항체는 가장 넓은 의미로 사용되며, 이것이 특이적으로 결합하는 에피토프, 폴리펩타이드, 또는 세포의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 저해하거나, 중화시키는 항체를 포함한다. 길항체 항체를 확인하는 방법은 후보 길항체 항체에 의해 특이적으로 결합되는 폴리펩타이드 또는 세포를 후보 길항체 항체와 접촉시키고, 폴리펩타이드 또는 세포와 정상적으로 관련된 하나 이상의 생물학적 활성의 검출 가능한 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0069] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 지칭하며, 항체 아이소타입에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예로는 Clq 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC); 식균 작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화가 있다.

[0070] 분자에 "결합하는"은 그 분자에 대해 물리화학적 친화도를 갖는 것을 의미한다.

[0071] "대조" 또는 "참조"는 비교 표준을 의미한다. 일 양태에서, 본원에 사용되는 바와 같이, "대조 샘플 또는 대상체와 비교하여 변화된"은 정상, 미처리, 또는 대조 샘플로부터의 샘플과 통계적으로 상이한 수준을 갖는 것으로 이해된다.

[0072] 대조 샘플은, 예를 들어, 배양 중인 세포, 하나 이상의 실험실용 시험 동물, 또는 1명 이상의 인간 대상체를 포함한다. 대조 샘플을 선택하고 시험하는 방법은 당업자의 능력 내에 있다. 피분석물은 세포 또는 유기체에 의해

특징적으로 발현되거나 생성되는 자연 발생적 물질(예를 들어, 항체, 단백질) 또는 리포터 작제물에 의해 생성된 물질(예를 들어, β -갈락토시다제 또는 루시페라제)일 수 있다. 검출에 사용된 방법에 따라, 변화의 양과 측정치가 달라질 수 있다.

- [0073] 통계적 유의성의 결정은 당업자의 능력 내에 있으며, 예를 들어, 양성 결과를 구성하는 평균으로부터의 표준 편차의 수치로 결정된다.
- [0074] "검출"은 검출하려는 피분석물의 존재, 부재 또는 양을 확인하는 것을 지칭한다.
- [0075] "질병"은 세포, 조직, 또는 기관의 정상적인 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 질환 또는 장애를 의미한다. 질병의 예로는 신생물증 및 자가면역 및 염증성 질병이 있다.
- [0076] 제형 또는 제형 성분의 "유효량" 및 "치료적 유효량"이라는 용어는, 단독으로 또는 조합하여, 요망되는 효과를 제공하기에 충분한 양의 제형 또는 성분을 의미한다. 예를 들어, "유효량"은 치료되지 않은 환자에 비해, 단독으로 또는 조합하여, 질병의 증상을 개선시키는 데 필요한 화합물의 양을 의미한다. 질병의 치료적 처리를 위해 본 발명을 실시하는 데 사용되는 활성 화합물(들)의 유효량은 투여 방식, 대상체의 연령, 체중, 및 전반적인 건강 상태에 따라 달라진다. 궁극적으로, 주치의 또는 수의사가 적절한 양 및 투여 요법을 결정할 것이다. 그러한 양이 "유효"량으로 지칭된다.
- [0077] "단편"은 폴리펩타이드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 이 일부는 바람직하게는 참조 핵산 분자 또는 폴리펩타이드의 전장의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 함유한다. 예를 들어, 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 아미노산을 함유할 수 있다. 그러나, 본 발명은 전장 폴리펩타이드 및 핵산 각각의 요망되는 생물학적 활성을 나타내는 한 폴리펩타이드 및 핵산 단편을 또한 포함한다. 거의 모든 길이의 핵산 단편이 사용된다. 예를 들어, 총 길이가 약 10,000, 약 5000, 약 3000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50개의 염기쌍 길이(모든 중간에 있는 길이를 포함함)인 예시적인 폴리뉴클레오티드 세그먼트가 본 발명의 많은 구현예에 포함된다. 유사하게, 거의 모든 길이의 폴리펩타이드 단편이 사용된다. 예를 들어, 총 길이가 약 10,000, 약 5,000, 약 3,000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100 또는 약 50개의 아미노산 길이인 예시적인 폴리펩타이드 세그먼트(모든 중간에 있는 길이를 포함함)가 본 발명의 많은 구현예에 포함된다.
- [0078] "단리된", "정제된", 또는 "생물학적으로 순수한"이라는 용어는 천연 상태에서 발견되는 바와 같은 정상적으로 수반되는 성분들이 다양한 정도로 없는 물질을 지칭한다. "단리"는 본래의 공급원 또는 환경과의 분리 정도를 나타낸다. "정제"는 단리보다 높은 분리 정도를 나타낸다.
- [0079] "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한" 단백질은 임의의 불순물이 단백질의 생물학적 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않거나 다른 유해한 결과를 유발하지 않도록 다른 물질이 충분히 없다. 즉, 본 발명의 핵산 또는 펩타이드는 재조합 DNA 기법에 의해 생성될 때 세포 물질, 바이러스 물질, 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학 전구체 또는 다른 화학 물질이 실질적으로 없는 경우 정제된 것이다. 순도 및 균질성은 전형적으로 분석 화학 기법, 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 결정된다. 용어 "정제된"은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 생성함을 나타낼 수 있다. 변형, 예를 들어, 인산화 또는 글리코실화될 수 있는 단백질의 경우, 다양한 변형이 다양한 단리된 단백질을 생성시킬 수 있으며, 이들은 개별적으로 정제될 수 있다.
- [0080] 유사하게, "실질적으로 순수한"은 자연적으로 수반되는 성분들로부터 분리된 뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 전형적으로, 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드는 이들과 자연적으로 관련된 단백질 및 자연 발생적 유기 분자의 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 90 중량%, 95 중량%, 또는 심지어 99 중량%가 없을 때 실질적으로 순수한 것이다.
- [0081] "단리된 핵산"은 핵산이 유래된 유기체의 자연 발생적 계놈에서 이를 측정하는 유전자가 없는 핵산을 의미한다. 이 용어는 예를 들어 다음을 포함한다: (a) 자연 발생적 계놈 DNA 분자의 일부이지만, 자연 발생하는 유기체의 계놈에서 분자의 그 일부를 측정하는 두 핵산 서열 모두에 의해 측정되지 않는 DNA; (b) 생성된 분자가 임의의 자연 발생적 벡터 또는 계놈 DNA와 동일하지 않게 되는 방식으로 벡터 또는 원핵 생물 또는 진핵 생물의 계놈 DNA 내로 혼입된 핵산; (c) cDNA, 계놈 단편, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 생성된 단편, 또는 제한 단편과 같은 별개의 분자; 및 (d) 하이브리드 유전자, 즉, 융합 단백질을 코딩하는 유전자의 일부인 재조합 뉴클레오티드 서열. 본 발명에 따른 단리된 핵산 분자는 합성적으로 생성된 분자뿐만 아니라 화학적으로 변경되고/변경되

거나 변형된 골격을 갖는 임의의 핵산을 추가로 포함한다. 예를 들어, 단리된 핵산은 정제된 cDNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드이다. 단리된 핵산 분자는 또한 메신저 리보핵산(mRNA) 분자를 포함한다.

[0082] "단리된 폴리펩타이드"는 자연적으로 수반되는 성분들로부터 분리된 본 발명의 폴리펩타이드를 의미한다. 전형적으로, 폴리펩타이드는 이와 자연적으로 관련되는 단백질 및 자연 발생적 유기 분자의 적어도 60 중량%가 없을 때 단리된 것이다. 바람직하게는, 제조물은 적어도 75 중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 중량%, 가장 바람직하게는 적어도 99 중량%의 본 발명의 폴리펩타이드이다. 본 발명의 단리된 폴리펩타이드는, 예를 들어, 천연 공급원으로부터의 추출에 의해, 그러한 폴리펩타이드를 인코딩하는 재조합 핵산의 발현에 의해; 또는 단백질을 화학적으로 합성함으로써 수득될 수 있다. 순도는 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 걸럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0083] "마커"는 질병 또는 장애와 관련된 발현 수준 또는 활성의 변경을 갖는 임의의 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0084] "신생물증"은 과도한 증식 또는 감소된 아폽토시스를 특징으로 하는 질병 또는 장애를 의미한다. 본 발명이 사용될 수 있는 예시적인 신생물증은 백혈병(예를 들어, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 급성 골수단구성 백혈병, 급성 단구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종(호지킨병, 비-호지킨병), 밸텐스트롬 마크로글로불린증, 종쇄 질환, 및 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종(예를 들어, 섭유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 획문근육종, 대장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 위식도암, 두경부암, 직장암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간암종, 담관 암종, 응모막암종, 고환종, 배아 암종, 월름종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송파체종, 혈관모세포종, 정신경종, 회소돌기아교세포종, 슈반세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종)을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 신생물증은 다발성 골수종, 베타-세포 림프종, 요로/방광 암종 또는 흑색종이다. 본원에 사용되는 바와 같이, "작용제를 수득하는"에서와 같은 "수득하는"은 작용제를 합성, 구입, 또는 다른 방식으로 획득하는 것을 포함한다.

[0085] "감소"는 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 100%의 음의 변경을 의미한다.

[0086] "참조 서열"은 서열 비교의 기초로 사용되는 규정된 서열이다. 참조 서열은 특정 서열의 서브세트(subset)이거나 전체일 수 있으며; 예를 들어, 전장 cDNA 또는 유전자 서열의 세그먼트, 또는 완전한 cDNA 또는 유전자 서열일 수 있다. 폴리펩타이드의 경우, 참조 폴리펩타이드 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 16개의 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 20개의 아미노산, 더욱 바람직하게는 적어도 약 25개의 아미노산, 더욱더 바람직하게는 약 35개의 아미노산, 약 50개의 아미노산, 또는 약 100개의 아미노산일 것이다. 핵산의 경우, 참조 핵산 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 50개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 약 60개의 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 75개의 뉴클레오티드, 더욱더 바람직하게는 약 100개의 뉴클레오티드 또는 약 300개의 뉴클레오티드 또는 그 부근 또는 그 사이의 임의의 정수일 것이다.

[0087] "특이적으로 결합하는"은 본 발명의 폴리펩타이드를 인식하고 이에 결합하지만, 본 발명의 폴리펩타이드를 자연적으로 포함하는 샘플, 예를 들어, 생물학적 샘플 중의 다른 분자를 실질적으로 인식하지 않고 이에 결합하지 않는 화합물 또는 항체를 의미한다.

[0088] 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 인코딩하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 그러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 전형적으로 실질적인 동일성을 나타낼 것이다. 내인성 서열에 대해 "실질적인 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 이중 가닥 핵산 분자 중 적어도 하나의 가닥과 하이브리드화할 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 인코딩하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 그러한 핵산 분자는 내인성 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 전형적으로 실질적인 동일성을 나타낼 것이다. 내인성 서열에 대해 "실질적인 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 이중 가닥 핵산 분자 중 적어도 하나의 가닥과 하이브리드화할 수 있다. "하이브리드화"는 다양한 염격성 조건 하에서 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열들(예를 들어, 문헌[Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399]; 문헌[Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol.

152:507] 참조).

[0089] 예를 들어, 업격한 염 농도는 통상적으로 약 750 mM 미만의 NaCl 및 75 mM 미만의 트리소듐 시트레이트, 바람직하게는 약 500 mM 미만의 NaCl 및 50 mM 미만의 트리소듐 시트레이트, 더욱 바람직하게는 약 250 mM 미만의 NaCl 및 25 mM 미만의 트리소듐 시트레이트일 것이다. 낮은 업격성 하이브리드화는 유기 용매, 예를 들어, 포름아미드의 부재 하에서 얻을 수 있는 반면, 높은 업격성 하이브리드화는 적어도 약 35% 포름아미드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50% 포름아미드의 존재 하에서 얻을 수 있다. 업격한 온도 조건은 통상적으로 적어도 약 30°C, 더욱 바람직하게는 적어도 약 37°C, 가장 바람직하게는 적어도 약 42°C의 온도를 포함할 것이다. 하이브리드화 시간, 세정제, 예를 들어, 소듐 도데실 살피아이트(SDS)의 농도, 및 운반 DNA의 포함 또는 배제와 같은 다양한 추가 매개변수는 당업자에게 잘 알려져 있다. 필요에 따라 이러한 다양한 조건을 조합하여 다양한 수준의 업격성이 달성된다. 바람직한 구현예에서, 하이브리드화는 750 mM NaCl, 75 mM 트리소듐 시트레이트, 및 1% SDS 중에서 30°C에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 하이브리드화는 500 mM NaCl, 50 mM 트리소듐 시트레이트, 1% SDS, 35% 포름아미드, 및 100 µg/ml의 변성 엔더 정자 DNA(ssDNA) 중에서 37°C에서 일어날 것이다. 가장 바람직한 구현예에서, 하이브리드화는 250 mM NaCl, 25 mM 트리소듐 시트레이트, 1% SDS, 50% 포름아미드, 및 200 µg/ml의 ssDNA 중에서 42°C에서 일어날 것이다. 이들 조건에 대한 유용한 변형은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0090] 대부분의 적용의 경우, 하이브리드화에 이은 세척 단계는 또한 업격성 면에서 달라질 것이다. 세척 업격성 조건은 염 농도 및 온도에 의해 규정될 수 있다. 상기와 같이, 세척 업격성은 염 농도를 감소시키거나 온도를 증가시킴으로써 증가될 수 있다. 예를 들어, 세척 단계를 위한 업격한 염 농도는 바람직하게는 약 30 mM 미만의 NaCl 및 3 mM 미만의 트리소듐 시트레이트, 가장 바람직하게는 약 15 mM 미만의 NaCl 및 1.5 mM 미만의 트리소듐 시트레이트일 것이다. 세척 단계를 위한 업격한 온도 조건은 통상적으로 적어도 약 25°C, 더욱 바람직하게는 적어도 약 42°C, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 68°C의 온도를 포함할 것이다. 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 30 mM NaCl, 3 mM 트리소듐 시트레이트, 및 0.1% SDS 중에서 25°C에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 트리소듐 시트레이트, 및 0.1% SDS 중에서 42°C에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 트리소듐 시트레이트, 및 0.1% SDS 중에서 68°C에서 일어날 것이다. 이들 조건에 대한 추가 변형은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 하이브리드화 기법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Benton and Davis (Science 196: 180, 1977)]; 문헌[Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975)]; 문헌[Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001)]; 문헌[Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York)]; 및 문헌[Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]에 기재되어 있다.

[0091] "실질적으로 동일한"은 참조 아미노산 서열(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 하나의 아미노산 서열) 또는 핵산서열(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 하나의 핵산 서열)과 적어도 50%의 동일성을 나타내는 폴리펩타이드 또는 핵산 분자를 의미한다. 바람직하게는, 그러한 서열은 아미노산 수준 또는 핵산에서 비교에 사용된 서열과 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 80% 또는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 동일하다.

[0092] 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어(예를 들어, 유니버시티 오브 위스콘신 바이오테크놀로지 센터(University of Wisconsin Biotechnology Center)(1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)의 서열 분석 소프트웨어 패키지(Sequence Analysis Software Package)인 BLAST, BESTFIT, GAP, 또는 PILEUP/Prettybox 프로그램)를 사용하여 측정된다. 그러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실, 및/또는 다른 변형에 상동성 정도를 할당함으로써 동일하거나 유사한 서열을 매칭시킨다. 보존적 치환은 전형적으로 다음과 같은 그룹 내에서의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성 정도를 결정하기 위한 예시적인 접근법에서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있으며, e^{-3} 과 e^{-100} 사이의 확률 스코어는 밀접하게 관련된 서열을 나타낸다.

[0093] "대상체"는 인간 또는 비-인간 포유 동물, 예컨대 소, 말, 개, 양, 또는 고양이를 포함하지만 이로 한정되지 않는 포유 동물을 의미한다. 대상체는 바람직하게는 그러한 치료가 필요한 포유 동물, 예를 들어, B 세포 림프종이 있거나 그에 대한 소인이 있는 것으로 진단된 대상체이다. 포유 동물은 임의의 포유 동물, 예를 들어, 인간, 영장류, 마우스, 랙트, 개, 고양이, 말뿐만 아니라 식용으로 사육되는 가축 또는 동물, 예를 들어, 소, 양, 돼지, 닭, 및 염소이다. 바람직한 구현예에서, 포유 동물은 인간이다.

- [0094] 본원에 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 축약인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50으로 이루어진 균으로부터의 임의의 수, 수들의 조합, 또는 하위 범위를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0095] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "치료하는" 및 "치료"는, 증상의 중증도 및/또는 빈도의 감소를 가져오고/가져 오거나, 증상 및/또는 그 근본 원인을 제거하고/제거하거나, 손상의 개선 또는 복원을 촉진시키기 위한, 유해한 질환, 장애, 또는 질병에 걸린 임상적으로 증상이 있는 개체로의 작용제 또는 제형의 투여를 지칭한다. 배제되는 것은 아니지만, 장애 또는 질환을 치료하는 것은 이와 관련된 장애, 질환 또는 증상이 완전히 제거될 필요가 없다는 것이 이해될 것이다.
- [0096] 신생물증이 있는 환자의 치료는 다음 중 하나를 포함할 수 있다: 초기 요법(예를 들어, 수술)에 의해 알려진 종양이 제거된 후 존재할 수 있는 잔류 종양 세포를 파괴함으로써 가능한 암 재발을 예방하기 위한 애쥬번트 요법(보조 요법 또는 보조적 요법으로도 일컬어짐); 암을 수축시키기 위해 수술 절차 전에 제공되는 네오애쥬번트(neoadjuvant) 요법; 전형적으로 급성 백혈병에 대한, 관해를 유발하기 위한 유도 요법; 일단 관해가 달성되면 관해를 지속시키기 위해 제공되는 공고 요법(강화 요법이라고도 일컬어짐); 관해를 연장시키는 것을 돋기 위해 더 적거나 덜 빈번한 투여로 제공되는 유지 요법; 1차 요법(표준 요법이라고도 일컬어짐); 1차 요법 후에 질병이 반응하지 않거나 재발한 경우에 제공되는 2차(또는 3차, 4차 등의) 요법(구제 요법이라고도 일컬어짐); 및 암을 유의하게 감소시킬 것을 기대하지 않으면서 증상 관리를 다루기 위한 완화 요법(지지 요법이라고도 일컬어짐).
- [0097] 용어 "예방하는" 및 "예방"은 특정의 유해한 질환, 장애, 또는 질병에 걸리기 쉽거나 그러한 소인이 있는 임상적으로 증상이 없는 개체로의 작용제 또는 조성물의 투여를 지칭하며, 이에 따라 증상 및/또는 그 근본 원인의 발생의 예방에 관한 것이다.
- [0098] 구체적으로 명시되지 않거나 문맥상 명백하지 않은 한, 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "또는"은 포함적인 것으로 이해된다. 구체적으로 명시되지 않거나 문맥상 명백하지 않은 한, 본원에 사용되는 바와 같이, 단수 형태의 용어는 단수 또는 복수인 것으로 이해된다.
- [0099] 구체적으로 명시되지 않거나 문맥상 명백하지 않은 한, 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 당업계의 정상 허용 범위 이내, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 이내로 이해된다. "약"은 명시된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내로 이해될 수 있다. 문맥상 달리 명확하지 않은 한, 본원에 제공된 모든 수치는 용어 "약"에 의해 수식된다.
- [0100] 본원에서 변수의 임의의 정의에서 화학 기의 목록의 언급은 임의의 단일 기 또는 열거된 기들의 조합으로서의 그 변수의 정의를 포함한다. 본원에서 변수 또는 양태에 대한 구현예의 언급은 임의의 단일 구현예로서 또는 임의의 다른 구현예들 또는 이의 부분들과 조합하여 그 구현예를 포함한다.
- [0101] 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 방법은 본원에 제공된 임의의 다른 조성물 및 방법 중 하나 이상과 조합될 수 있다.
- [0102] "포함하는(including)", "함유하는", 또는 "특징으로 하는"과 동의어인 연결형(transitional) 용어 "포함하는(comprising)"은 포함적이거나 개방형이며, 언급되지 않은 추가 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 대조적으로, 연결형 문구 "~로 이루어진"은 청구항에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 구성 성분을 배제한다. 연결형 문구 "본질적으로 ~로 이루어진"은 청구항의 범위를 특정된 재료 또는 단계 "및 특허청구된 발명의 기본 및 신규 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것"으로 제한한다.
- [0103] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음과 같은 바람직한 구현예의 설명 및 청구범위로부터 명백해질 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법들 및 재료들이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법들 및 재료들이 이하에 설명된다. 본원에 인용된 모든 공개된 외국 특허 및 특허 출원은 본원에 참고로 포함된다. 본원에 인용된 수탁 번호로 표시된 젠뱅크(Genbank) 및 NCBI 제출물은 본원에 참고로 포함된다. 본원에 인용된 다른 모든 공개된 참고 문헌, 문서, 원고 및 학술 문헌은 본원에 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 재료들, 방법들, 및 실시예들은 단지 예시적인 것이며 제한하고자 하는 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0104]

도 1은 혈액 종양 세포에 대한 항-CD38 Ab 유도된 인간 말초혈 단핵 세포(PBMC) 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)에 미치는 ALT-803의 효과를 나타내는 막대 그래프이다. 인간 PBMC를 이펙터 세포로 사용하였고, 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet) 표지된 Daudi 세포가 표적이었으며(5:1의 E:T 비), 무자극(미처리), ALT-803(10nM), 항-CD38 Ab(10nM) 또는 ALT-803(10 nM) + 항-CD38 Ab(10 nM)가 존재하였다. 2일 후, Daudi 세포 사멸(프로파디움 요오다이드에 의한 양성 염색)을 유세포 분석에 의해 결정하였다. 막대는 4명의 독립적인 공여자로부터의 PMBC에 대한 평균 ± SEM을 나타낸다.

도 2a는 혈액 종양 세포에 대한 항-CD38 Ab 유도된 인간 PBMC ADCC에 미치는 ALT-803의 농도 의존적 효과를 나타내는 막대 그래프이다. 새로 단리된 PBMC를, 10 nM 항-CD38 Ab의 존재 및 부재 하에서 다양한 농도의 ALT-803과 함께 인큐베이션하였다. 2일 후, Daudi 종양 표적 세포(2:1의 E:T 비)에 대한 ADCC 활성을 도 1에서 기술한 바와 같이 결정하였다. 막대는 4명의 독립적인 공여자로부터의 PMBC에 대한 평균 ± SEM을 나타낸다. 도 2b는 도 2a에서 기술한 방법을 이용하여 Daudi 세포에 대해 유도된 인간 PBMC ADCC에 미치는 10 nM ALT-803의 존재 또는 부재 하의 항-CD38 Ab의 농도 의존적 효과를 나타내는 선 그래프를 도시한다. 2명의 상이한 공여자로부터의 결과가 도시되어 있다. 도 2c는 혈액 종양 세포에 대한 항-CD38 Ab 유도된 인간 자연 살해(NK) 세포 ADCC에 미치는 ALT-803의 농도 의존적 효과를 나타내는 막대 그래프이다. 새로 정제된 인간 NK 세포(90% 초과 CD56⁺CD3⁻)를, 10 nM 항-CD38 Ab의 존재 및 부재 하에서 다양한 농도의 ALT-803과 함께 인큐베이션하였다. 2일 후, Daudi 종양 표적 세포(2:1의 E:T 비)에 대한 ADCC 활성을 도 1에서 기술한 바와 같이 결정하였다. 막대는 4명의 독립적인 공여자로부터의 NK 세포에 대한 평균 ± SEM을 나타낸다.

도 3은 Daudi 세포 종양을 보유한 마우스의 골수에서 종양 부담을 경감시키는 데 있어서 ALT-803 + 항-CD38 Ab 처리의 효능을 나타내는 막대 그래프이다. 중증 복합 면역결핍증(SCID) 마우스에 0일째에 1×10^7 Daudi 세포를 (i.v.) 주사하였다. 종양 보유 마우스(각 그룹의 6마리 마우스)를 PBS(비허클, i.v.), 항-CD38 Ab(10 mg/kg, i.v.), ALT-803(0.2 mg/kg, 피하), 또는 항-CD38 Ab(10 mg/kg) + ALT-803(0.2 mg/kg, 피하)로 i.v. 처리하였다. 항-CD38 Ab(Dara)는 종양 세포 접종 후 5일째에 투여하였고, ALT-803은 종양 세포 접종 후 17일째에 투여하였다. 일부 마우스는 또한 지시된 바와 같이 15일째에 스테로이드(0.2 μg 하이드로코르티손/투여 i.p.)로 처리하였다. 주사 후 22일째의 골수(BM) 중의 Daudi 세포(인간 HLA-DR⁺)의 백분율을 유세포 분석기로 정량하였다. *, P < 0.05; **** P < 0.0001.

도 4는 ALT-803 및 항-CD38 Ab의 조합이 Daudi 세포 종양을 보유한 마우스의 생존을 연장시킬 수 있음을 나타내는 선 그래프이다. SCID 마우스에 0일째에 1×10^7 Daudi 세포를 (i.v.) 주사하였다. 종양 보유 마우스(각 그룹의 6마리 마우스)를 인산염 완충 식염수(PBS)(비허클, i.v.), 항-CD38 Ab(10 mg/kg, i.v.), ALT-803(0.2 mg/kg, 피하), 또는 항-CD38 Ab(10 mg/kg) + ALT-803(0.2 mg/kg, 피하)로 i.v. 처리하였다. PBS 그룹 마우스를 제외한 모든 그룹의 마우스에 스테로이드(0.2 mg/마우스, 복강내)를 투여하여 주입전 반응을 감소시켰다. 항-CD38 Ab(DARA)는 종양 세포 접종 후 5일째에 투여하였고, ALT-803은 종양 세포 접종 후 17일째에 투여하였다. 22일째에, 그룹들에 PBS(비허클, i.v.), 항-CD38 Ab(10 mg/kg, i.v.), ALT-803(0.2 mg/kg, 피하), 또는 항-CD38 Ab(10 mg/kg) + ALT-803(0.2 mg/kg, 피하)의 2차 처리를 받게 하였다. 마우스는 22일째에는 스테로이드로 처리하지 않았다. 마우스 생존을 모니터링하였고, 카플란-마이어 분석이 도시된다. **** P < 0.0001.

도 5는 생체내에서 Daudi 종양 세포의 대식세포-매개 식균 작용에 미치는 항-CD38 Ab와 조합된 ALT-803의 효과를 나타내는 일련의 유세포 분석 플롯을 도시한다. PKH67-표지 인간 THP-1 대식세포 및 셀트레이스 바이올렛-표지 Daudi 세포를, NK-92 세포(aNK 세포)의 존재 또는 부재 하에서, PBS(US), 10 nM 항-CD38 Ab 및/또는 10 nM ALT-803과 함께 공동 배양하였다(1:1의 E:T 비). 24시간 후, 식균 작용을 받은 Daudi 종양 세포의 백분율(우측 상단 사분면에서 PKH67⁺ 셀트레이스 바이올렛⁺ THP-1 세포로 나타냄)을 유세포 분석에 의해 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105]

본 발명은 인터류킨-15(IL-15) 초효능체 돌연변이체와 이량체 IL-15 수용체 α/Fc 융합 단백질의 복합체인 ALT-803과 조합된 항체가 신생물증(예를 들어, 고모세포종, 전립선암, 혈액 암, B-세포 신생물, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 호지킨 림프종, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 피부 T-세포 림프종, T-세포 림프종, 고형 종양, 요로/방광 암종, 흑색종, 폐암, 신장 세포 암종, 유방암, 두경부암, 결장직장암, 및 난소암) 또는

자가면역 또는 염증성 질병에 대한 면역 반응을 향상시키는 데 유용하다는 놀라운 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0106] ALT-803

[0107] ALT-803은 IL-2R $\beta\gamma$ 에 결합하는 능력이 증가하고 생물학적 활성이 향상된 IL-15 돌연변이체를 포함한다(본원에 참고로 포함된 미국 특허 제8,507,222호). IL-15의 이 초효능제 돌연변이체는 간행물(J Immunol 2009 183:3598)에 기재되었고, 초효능제에 관한 특허가 미국 특허상표청에 의해 허여되었으며 몇몇 특허 출원이 계류 중이다(예를 들어, 미국 출원 제12/151,980호 및 제13/238,925호). 가용성 IL-15 α 수용체 융합 단백질(IL-15R α Su/Fc)과 조합된 이 IL-15 초효능제는 시험관내 및 생체내에서 매우 강력한 IL-15 활성을 갖는 단백질 복합체를 생성한다(문헌[Han et al., 2011, Cytokine, 56: 804-810]; 문헌[Xu, et al., 2013 Cancer Res. 73:3075-86], 문헌[Wong, et al., 2013, OncoImmunology 2:e26442]). 이 IL-15 초효능제 복합체(IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc)는 ALT-803으로 지칭된다. 약동학적 분석은 복합체가 i.v. 투여 후 마우스에서 25시간의 반감기를 가짐을 나타냈다. ALT-803은 면역억제 마우스에서 공격적인 고형 및 혈액 종양 모델에 대해 인상적인 항-종양 활성을 나타낸다. 이는 주 2회 또는 주 1회 i.v. 투여 요법을 이용하는 단일요법 또는 항체와의 조합 요법으로서 투여 될 수 있다. ALT-803 항-종양 반응은 또한 지속성이 있다. ALT-803 처리 후 치유된 종양-보유 마우스는 동일한 종양 세포에 의한 재공격에 대해 또한 높은 내성을 보였으며, 이는 ALT-803이 재도입된 종양 세포에 대해 효과적인 면역학적 기억 반응을 유도한다는 것을 나타낸다.

[0108] 인터류킨-15

[0109] 인터류킨-15(IL-15)는 이펙터 NK 세포 및 CD8 $^+$ 기억 T 세포의 발달, 증식 및 활성화에 중요한 사이토카인이다. IL-15는 IL-15 수용체 α (IL-15R α)에 결합하고, 이펙터 세포 상의 IL-2/IL-15 수용체 β -공통 γ 쇄(IL-15R $\beta\gamma_c$) 복합체에 트랜스(*trans*)로 제공된다. IL-15 및 IL-2는 IL-15R $\beta\gamma_c$ 에 대한 결합을 공유하고, STAT3 및 STAT5 경로를 통해 신호를 전달한다. 그러나, IL-2는 또한 CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$ 조절 T(Treg) 세포의 유지를 지지하고, 활성화된 CD8 $^+$ T 세포의 세포 사멸을 유도한다. 이를 효과는 종양에 대한 IL-2의 치료 활성을 제한할 수 있다. IL-15는 이러한 면역억제 활성을 IL-2와 공유하지 않는다. 추가로, IL-15는 이펙터 CD8 $^+$ T 세포에 항-아폽토시스 신호전달을 제공하는 것으로 알려진 유일한 사이토카인이다. 단독으로 또는 IL-15R α 와의 복합체로 투여된 IL-15는 실험 동물 모델에서 잘 확립된 고형 종양에 대해 강력한 항-종양 활성을 나타내며, 이에 따라 잠재적으로 암을 치유할 수 있는 가장 유망한 면역치료용 약물 중 하나로 확인되었다.

[0110] IL-15-기반 암 치료제의 임상 개발을 용이하게 하기 위해, IL-15에 비해 생물학적 활성이 증가된 IL-15 돌연변이체(IL-15N72D)가 확인되었다(문헌[Zhu et al., J Immunol, 183: 3598-3607, 2009]). 이 IL-15 초효능제(IL-15N72D)의 약동학 및 생물학적 활성은 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 융합 복합체(ALT-803)의 생성에 의해 추가로 개선되었으며, 이로써 초효능제 복합체는 생체내에서 천연 사이토카인의 활성의 적어도 25배를 갖는다(문헌[Han et al., Cytokine, 56:804-810, 2011]).

[0111] IL-15:IL-15R α 단백질 복합체

[0112] 상기 기재된 바와 같이, IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체는 천연 IL-15R α 의 가용성 IL-15R α 도메인에 비공유 결합된 IL-15를 갖는 복합체를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, 가용성 IL-15R α 는 생물학적 활성 폴리펩타이드 및/또는 IgG Fc 도메인에 공유 결합된다. IL-15는 IL-15 또는 제2 생물학적 활성 폴리펩타이드에 공유 결합된 IL-15일 수 있다. IL-15:IL-15R α 단백질 복합체의 결정 구조는 본원에 참고로 포함된 문헌[Chirifu et al., 2007 Nat Immunol 8, 1001-1007]에 제시되어 있다.

[0113] 본원에 기재된 본 발명의 상기 양태 또는 임의의 다른 양태의 다양한 구현예에서, IL-15R α 융합 단백질은 가용성 IL-15R α , 예를 들어, 생물학적 활성 폴리펩타이드(예를 들어, IgG의 중쇄 불변 도메인, IgG의 중쇄 불변 도메인의 Fc 도메인, 또는 사이토카인)에 공유 결합된 IL-15R α 를 포함한다. 상기 양태의 본 발명의 다른 구현예에서, IL-15는 IL-15, 예를 들어, 제2 생물학적 활성 폴리펩타이드, 예를 들어, 사이토카인에 공유 결합된 IL-15를 포함한다. 다른 구현예에서, 숙주 세포 또는 배지로부터 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체를 정제하는 것은 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체에 특이적으로 결합하는 친화도 시약 상에서 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체를 포획하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, IL-15R α 융합 단백질은 IL-15R α /Fc 융합 단백질을 함유하고, 친화도 시약은 Fc 도메인에 특이적으로 결합한다. 다른 구현예에서, 친화도 시약은 단백질 A 또는 단백질 G이다. 다른 구현예에서, 친화도 시약은 항체이다. 다른 구현예에서, 숙주 세포 또는 배지로부터 IL-15:IL-

15R α 융합 단백질 복합체를 정제하는 것은 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 다른 구현예에서, 숙주 세포 또는 배지로부터 IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체를 정제하는 것은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한다.

[0114] 다른 구현예에서, IL-15R α 는 IL-15R α 스시(Sushi)(IL-15R α Su)를 포함한다. 다른 구현예에서, IL-15는 변이체 IL-15(예를 들어, IL-15N72D)이다. 다른 구현예에서, IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체의 IL-15 결합 부위가 완전히 점유된다. 다른 구현예에서, IL-15:IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체의 두 IL-15 결합 부위 모두가 완전히 점유된다. 다른 구현예에서, IL-15:IL-15R α 융합 단백질 복합체는 융합 단백질 복합체 전하 또는 크기 특성에 기초하여 정제된다. 다른 구현예에서, 완전히 점유된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체는 융합 단백질 복합체 전하 특성에 기초하여 정제된다. 다른 구현예에서, 완전히 점유된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체는 낮은 이온 강도의 중성 pH 완충제를 사용하는 결합 조건 및 증가하는 이온 강도의 완충제를 사용하는 용리 조건과 함께 4차 아민계 수지를 사용하여 정제된다.

[0115] 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체의 특정 구현예에서, IL-15 폴리펩타이드는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 상이한 아미노산 서열을 갖는 IL-15 변이체이다. 인간 IL-15 폴리펩타이드는 본원에서 huIL-15, hIL-15, huIL15, hIL15, IL-15 야생형(wt)으로 지칭되고, 이의 변이체는 천연 아미노산, 성숙 서열에서의 그의 위치 및 변이체 아미노산을 사용하여 지칭된다. 예를 들어, huIL15N72D는 72번 위치에서의 N의 D로의 치환을 포함하는 인간 IL-15를 지칭한다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체는, 예를 들어, 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 IL-15R β γ C 수용체에 대한 증가된 결합 활성에 의해 입증된 바와 같이 IL-15 효능제로서 기능한다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체는, 예를 들어, 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 IL-15R β γ C 수용체에 대한 감소된 결합 활성에 의해 입증된 바와 같이 IL-15 길항제로서 기능한다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체는 천연 IL-15 폴리펩타이드와 비교하여 IL-15R β γ C 수용체에 대해 증가된 결합 친화도 또는 감소된 결합 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, IL-15 변이체의 서열은 천연 IL-15 서열과 비교하여 적어도 하나(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 아미노산 변화를 갖는다. 아미노산 변화는 IL-15R β 및/또는 IL-15R γ C와 상호 작용하는 IL-15의 도메인에서의 하나 이상의 아미노산 치환 또는 결실을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 아미노산 변화는 성숙 인간 IL-15 서열의 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, 또는 111번 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환 또는 결실이다. 예를 들어, 아미노산 변화는 성숙 인간 IL-15 서열의 8번 위치에서 D의 N 또는 A로의 치환, 61번 위치에서 D의 A로의 치환, 65번 위치에서 N의 A로의 치환, 72번 위치를 N의 R로의 치환 또는 108번 위치에서 Q의 A로의 치환, 또는 이를 치환의 임의의 조합이다. 특정 구현예에서, 아미노산 변화는 성숙 인간 IL-15 서열의 72번 위치에서 N의 D로의 치환이다.

Fc 도메인

[0117] ALT-803은 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 융합 복합체를 포함한다. IgG의 Fc 영역을 또 다른 단백질의 도메인, 예컨대 다양한 사이토카인 및 가용성 수용체와 결합시킨 융합 단백질이 보고되었다(예를 들어, 문헌[Capon et al., Nature, 337:525-531, 1989]; 문헌[Chamow et al., Trends Biotechnol., 14:52-60, 1996]); 미국 특허 제5,116,964호 및 제5,541,087호 참조). 프로토타입 융합 단백질은 IgG Fc의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기를 통해 연결된 동종이량체 단백질로서, 중쇄 가변 도메인 및 C_{H1} 도메인 및 경쇄가 없는 IgG 분자와 유사한 분자를 생성한다. Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질의 이량체 특성은 다른 분자와의 고차 상호 작용(즉, 2가 또는 이중 특이적 결합)을 제공하는 데 유리할 수 있다. 구조적 상동성으로 인해, Fc 융합 단백질은 유사한 아이소타입을 갖는 인간 IgG에 필적하는 생체내 약동학적 프로파일을 나타낸다. IgG 클래스의 면역글로불린은 인간 혈액에서 가장 풍부한 단백질 중 하나이며, 그의 순환 반감기는 21일에 이를 수 있다. IL-15 또는 IL-15 융합 단백질의 순환 반감기를 연장시키고/연장시키거나 그의 생물학적 활성을 증가시키기 위해, 인간 중쇄 IgG 단백질의 Fc 부분에 공유 결합된 IL-15R α Su에 비공유 결합된 IL-15 도메인을 함유하는 융합 단백질 복합체가 제조되었다(예를 들어, ALT-803).

[0118] 용어 "Fc"는 항체의 비-항원-결합 단편을 지칭한다. 그러한 "Fc"는 단량체 또는 다량체 형태일 수 있다. 천연 Fc의 본래의 면역글로불린 공급원은 바람직하게는 인간 기원이며, 임의의 면역글로불린일 수 있지만, IgG1 및 IgG2가 바람직하다. 천연 Fc는 공유 결합(즉, 이황화물 결합) 및 비공유 결합에 의해 이량체 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩타이드들로 구성된다. 천연 Fc 분자의 단량체 서브유닛들 사이의 분자간 이황화물 결합의 수는 클래스(예를 들어, IgG, IgA, IgE) 또는 서브클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgG4)에 따라 1 내지 4의 범위이다. 천연 Fc의 일 예는 IgG의 파파인 분해로부터 생성된 이황화물-결합 이량체이다(문헌[Ellison et al. (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9] 참조). 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "천연 Fc"는 단량체, 이량체, 및 다량체 형태를 총칭한다. Fc 도메인은 단백질 A, 단백질 G, 다양한 Fc 수용체

및 보체 단백질에 대한 결합 부위를 함유한다.

[0119] 일부 구현예에서, 용어 "Fc 변이체"는 천연 Fc로부터 변형된 분자 또는 서열을 지칭하지만, 여전히 구제 수용체인 FcRn에 대한 결합 부위를 포함한다. 국제 출원 WO 97/34631호(1997년 9월 25일 공개) 및 WO 96/32478호는 예시적인 Fc 변이체뿐만 아니라 구제 수용체와의 상호 작용을 기술하며, 이들은 본원에 참고로 포함된다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비-인간 천연 Fc로부터 인간화된 분자 또는 서열을 포함한다. 또한, 천연 Fc는 제거될 수 있는 부위를 포함하는데, 이는 이러한 부위가 본 발명의 융합 분자에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문이다. 따라서, 특정 구현예에서, 용어 "Fc 변이체"는 (1) 이황화물 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 부적합 (3) 선택된 숙주 세포에서 발현시의 N-말단 불균일성, (4) 글리코실화, (5) 보체와의 상호 작용, (6) 구제 수용체 이외의 Fc 수용체로의 결합, (7) 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 또는 (8) 항체 의존성 세포성 식균 작용(ADCP)에 영향을 주거나 관여하는 하나 이상의 천연 Fc 부위 또는 잔기를 결여하는 분자 또는 서열을 포함한다. Fc 변이체는 이하에 추가로 상세하게 설명된다.

[0120] 용어 "Fc 도메인"은 상기 정의된 바와 같은 천연 Fc 및 Fc 변이체 분자 및 서열을 포함한다. Fc 변이체 및 천연 Fc와 같이, 용어 "Fc 도메인"은, 전체 항체로부터 분해되든지 또는 재조합 유전자 발현에 의해 또는 다른 수단에 의해 생성되든지 간에, 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함한다.

링커

[0122] 일부 경우에, 본 발명의 융합 단백질 복합체는 IL-15 또는 IL-15R α 도메인들 사이에 개재된 유연한 링커 서열을 또한 포함한다. 링커 서열은 IL-15 또는 IL-15R α 도메인에 대한 폴리펩타이드의 효과적인 위치 설정을 허용하여 두 도메인 모두의 기능적 활성을 가능하게 할 것이다.

[0123] 특정 경우에, 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지며, 여기서 제1 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 링커 서열에 의해 IL-15(또는 이의 기능적 단편)에 공유 결합된다. 다른 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지며, 여기서 제2 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 링커 서열에 의해 IL-15R α 폴리펩타이드(또는 이의 기능적 단편)에 공유 결합된다.

[0124] 링커 서열은 바람직하게는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되어, 제공 항원의 인식을 위한 TCR 분자의 결합 홈 또는 항원의 인식을 위한 항체 분자의 결합 도메인을 효과적으로 위치시킬 수 있는 웨بت아이드를 생성한다. 본원에 사용되는 바와 같이, "IL-15 또는 IL-15R α 도메인에 대한 생물학적 활성 폴리펩타이드의 효과적인 위치 설정"이라는 문구 또는 다른 유사한 문구는, IL-15 또는 IL-15R α 도메인이 서로 상호 작용하여 단백질 복합체를 형성할 수 있도록, IL-15 또는 IL-15R α 도메인에 연결된 생물학적 활성 폴리펩타이드가 위치 설정됨을 의미하고자 한다. 예를 들어, IL-15 또는 IL-15R α 도메인은 면역 세포와의 상호 작용이 면역 반응을 개시 또는 저해하거나, 세포 발달을 저해 또는 자극하도록 효과적으로 위치 설정된다.

[0125] 본 발명의 융합 단백질 복합체는 바람직하게는 IL-15 또는 IL-15 R α 도메인과 면역글로불린 Fc 도메인 사이에 개재된 유연한 링커 서열을 또한 포함한다. 링커 서열은 Fc 도메인, 생물학적 활성 폴리펩타이드 및 IL-15 또는 IL-15R α 도메인의 효과적인 위치 설정을 허용하여 각 도메인의 기능적 활성을 가능하게 할 것이다. 예를 들어, Fc 도메인은, 적절한 융합 단백질 복합체 형성 및/또는 옵소닌화, 세포 용해, 비만 세포, 호염기구, 및 호산구의 탈파립, 및 다른 Fc 수용체-의존성 작용을 포함하는 Fc-매개 효과를 자극하기 위한 면역 세포 상의 Fc 수용체 또는 보체 시스템의 단백질과의 상호 작용; 보체 경로의 활성화; 및 융합 단백질 복합체의 생체내 반감기 향상을 허용하도록 효과적으로 위치 설정된다.

[0126] 링커 서열은 요망되는 기능적 활성을 갖는 단일-쇄 분자를 생성하기 위해 생물학적 활성 폴리펩타이드의 둘 이상의 폴리펩타이드를 연결하는 데 또한 사용될 수 있다.

[0127] 바람직하게는, 링커 서열은 약 7개 내지 20개의 아미노산, 더욱 바람직하게는 약 10개 내지 20개의 아미노산을 포함한다. 링커 서열은 단일의 요망되지 않는 형태로 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이펙터 분자를 유지하지 않도록 바람직하게는 유연하다. 링커 서열은, 예를 들어, 융합된 분자로부터 인식 부위를 이격시키는 데 사용될 수 있다. 구체적으로, 웨بت아이드 링커 서열은 생물학적 활성 폴리펩타이드와 이펙터 분자 사이에 위치하여, 예를 들어, 이들을 화학적으로 가교시켜 분자 유연성을 제공할 수 있다. 링커는 유연성을 제공하기 위해 바람직하게는 글리신, 알라닌 및 세린과 같은 작은 측쇄를 갖는 아미노산을 주로 포함한다. 바람직하게는, 링커 서열의 약 80% 또는 90% 이상이 글리신, 알라닌 또는 세린 잔기, 특히 글리신 및 세린 잔기를 포함한다.

[0128] 항체 가변 영역들을 함께 결합시키는 데 성공적으로 사용된 다수의 유연한 링커 설계 중 임의의 것을 포함하는 다양한 링커 서열이 사용될 수 있다(문헌[Whitlow, M. et al., (1991) Methods: A Companion to Methods in

Enzymology, 2:97-105] 참조).

[0129] 융합 단백질 복합체

본 발명은 IL-15N72D와 IL-15R α Su/Fc 사이의 단백질 복합체인 ALT-803을 제공한다. 특정 구현예에서, ALT-803 폴리펩타이드는 다른 단백질 도메인과의 융합을 위한 스캐폴드로서 작용할 수 있다. 그러한 융합 단백질 복합체에서, 제1 융합 단백질은 인터류킨-15(IL-15) 또는 이의 기능적 단편에 공유 결합된 제1 생물학적 활성 폴리펩타이드를 포함하고; 제2 융합 단백질은 가용성 인터류킨-15 수용체 알파(IL-15R α) 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 단편에 공유 결합된 제2 생물학적 활성 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인은 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인에 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 제1 및 제2 융합 단백질 중 하나 또는 둘 모두에 연결된 면역글로불린 Fc 도메인 또는 이의 기능적 단편을 또한 포함한다. 바람직하게는, 제1 및 제2 융합 단백질에 연결된 Fc 도메인은 상호 작용하여 융합 단백질 복합체를 형성한다. 그러한 복합체는 면역글로불린 Fc 도메인들 사이의 이황화물 결합 형성에 의해 안정화될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체는 IL-15 폴리펩타이드, IL-15 변이체 또는 이의 기능적 단편 및 가용성 IL-15R α 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 단편을 포함하며, 여기서 IL-15 및 IL-15R α 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두는 면역글로불린 Fc 도메인 또는 이의 기능적 단편을 추가로 포함한다.

[0131] 추가의 구현예에서, 제1 및 제2 생물학적 활성 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두는 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함한다.

[0132] 또 다른 구현예에서, 항체 도메인에 대한 항원은 세포 표면 수용체 또는 리간드를 포함한다.

[0133] 추가의 구현예에서, 항원은 CD 항원, 사이토카인 또는 케모카인 수용체 또는 리간드, 성장 인자 수용체 또는 리간드, 조직 인자, 세포 접착 분자, MHC/MHC-유사 분자, Fc 수용체, 틀-유사 수용체, NK 수용체, TCR, BCR, 양성/음성 보조-자극 수용체 또는 리간드, 사멸 수용체 또는 리간드, 종양 관련 항원, 또는 바이러스 인코딩된 항원을 포함한다.

[0134] 본원에 사용되는 바와 같이, "생물학적 활성 폴리펩타이드" 또는 "이펙터 분자"라는 용어는, 본원에 논의된 바와 같은 요망되는 효과를 생성할 수 있는, 아미노산 서열, 예컨대 단백질, 폴리펩타이드 또는 웨이프타이드; 당 또는 다당류; 지질 또는 당지질, 당단백질, 또는 지단백질을 의미한다. 이펙터 분자는 또한 화학 작용제를 포함한다. 생물학적 활성 또는 이펙터 단백질, 폴리펩타이드, 또는 웨이프타이드를 인코딩하는 이펙터 분자 핵산이 또한 고려된다. 따라서, 적합한 분자는 조절 인자, 효소, 항체, 또는 약물뿐만 아니라 DNA, RNA, 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이펙터 분자는 자연 발생적일 수 있거나 알려진 성분들로부터, 예를 들어, 재조합적 또는 화학적 합성에 의해 합성될 수 있고, 이종성 성분을 포함할 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이펙터 분자는, 원심분리 또는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 같은 표준 분자 사이징 기법에 의해 판단되는 바와 같이, 일반적으로 약 0.1 KD 내지 100 KD 이상이고 약 1000 KD 이하이며, 바람직하게는 약 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 내지 50 KD이다. 본 발명의 요망되는 효과는, 예를 들어, 결합 활성이 증가된 본 발명의 융합 단백질 복합체의 형성, 예를 들어 세포 증식 또는 세포 사멸을 유도하기 위한 표적 세포의 사멸, 면역 반응의 개시, 질병의 예방 또는 치료, 또는 진단 목적을 위한 검출 분자로서의 작용을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 그러한 검출을 위해, 검정, 예를 들어 세포를 증식시키기 위해 세포를 배양하는 순차적 단계들을 포함하는 검정이 이용될 수 있다.

[0135] 본 발명에 따라 이펙터 분자를 본 발명의 융합 단백질 복합체에 공유 결합시키는 것은 다수의 유의한 이점을 제공한다. 알려진 구조의 그러한 웨이프타이드를 포함하는, 단일 이펙터 분자를 함유하는 본 발명의 융합 단백질 복합체가 생성될 수 있다. 추가로, 매우 다양한 이펙터 분자가 유사한 DNA 벡터에서 생성될 수 있다. 즉, 다양한 이펙터 분자의 라이브러리는 감염 또는 질병 세포의 인식을 위해 융합 단백질 복합체에 연결될 수 있다. 또한, 치료적 적용을 위해, 본 발명의 융합 단백질 복합체의 대상체로의 투여보다는 융합 단백질 복합체를 코딩하는 DNA 발현 벡터가 융합 단백질 복합체의 생체내 발현을 위해 투여될 수 있다. 그러한 접근법은 전형적으로 재조합 단백질의 제조와 관련된 고가의 정제 단계를 회피하고, 통상적인 접근법과 관련된 항원 흡수 및 처리의 복잡성을 회피한다.

[0136] 언급된 바와 같이, 본원에 개시된 융합 단백질 및 항체의 성분들, 예를 들어, 이펙터 분자 접합체, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 다른 생물 활성 분자 및 임의의 웨이프타이드 링커는, 융합 단백질 또는 항체가 그것이 의도된 기능을 갖는다면, 거의 모든 방식으로 조직화될 수 있다.

특히, 융합 단백질의 각 성분은 요망되는 경우 적어도 하나의 적합한 웹타이드 링커 서열에 의해 또 다른 성분으로부터 이격될 수 있다.

[0137] 추가로, 융합 단백질은, 예를 들어 융합 단백질의 변형, 확인 및/또는 정체를 용이하게 하기 위해, 태그를 포함할 수 있다.

약학 치료제

[0139] 본 발명은 치료제로서 사용하기 위한 ALT-803을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일 양태에서, ALT-803은 전신 투여되며, 예를 들어, 생리 식염수와 같은 약학적으로 허용되는 완충액에서 제형화된다. 바람직한 투여 경로는, 예를 들어, 환자에서 조성물의 연속적이고 지속적인 수준을 제공하는 방광 내로의 점적주입, 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 또는 피내 주사를 포함한다. 인간 환자 또는 다른 동물의 치료는 생리학적으로 허용되는 담체 중의 본원에서 확인된 치료적 유효량의 치료제를 사용하여 수행된다. 적합한 담체들 및 이들의 제형은, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin]에 기재되어 있다. 투여되는 치료제의 양은 투여 방식, 환자의 연령 및 체중, 및 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병의 임상 증상에 따라 달라진다. 일반적으로, 양은 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병과 관련된 다른 질병의 치료에 사용되는 다른 작용제를 위해 사용되는 양의 범위에 있을 것이지만, 특정한 경우 화합물의 특이성 증가로 인해 더 적은 양이 필요할 것이다. 화합물은 대상체의 면역 반응을 향상시키거나, 당업자에게 알려진 방법에 의해 결정되는 바와 같은 신생물 세포의 종식, 생존, 또는 침습성을 감소시키는 투여량으로 투여된다. 대안적으로, 화합물은 질병-관련 면역 반응에 의해 야기되는 자가면역 또는 염증성 질병을 감소시키는 투여량으로 투여된다.

약학 조성물의 제형

[0141] 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병의 치료를 위한 ALT-803의 투여는 다른 성분들과 조합되어 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병을 개선하거나, 경감시키거나, 안정화시키는 데 효과적인 치료제의 농도를 가져오는 임의의 적합한 수단에 의해 이루어질 수 있다. ALT-803은 임의의 적합한 담체 물질 중에 임의의 적절한 양으로 함유될 수 있으며, 일반적으로 조성물의 총 중량의 1 중량% 내지 95 중량%의 양으로 존재한다. 조성물은 비경구(예를 들어, 피하, 정맥내, 근육내, 소포내 또는 복강내) 투여 경로에 적합한 투여 형태로 제공될 수 있다. 약학 조성물은 통상적인 약학 실무에 따라 제형화될 수 있다(예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000] 및 문헌[Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York] 참조).

[0142] 인간 투여량은 마우스 또는 비인간 영장류에 사용된 화합물의 양으로부터 외삽함으로써 초기에 결정될 수 있는데, 이는 당업자가 동물 모델과 비교하여 인간을 위한 투여량을 변경하는 것은 당업계에서 일상적인 것으로 인식하기 때문이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 0.1 μg 화합물/kg 체중 내지 약 5000 μg 화합물/kg 체중; 또는 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 내지 약 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 또는 약 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 내지 약 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중으로 달라질 수 있는 것으로 생각된다. 다른 구현예에서, 이 용량은 약 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 또는 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중일 수 있다. 다른 구현예에서, 용량은 약 0.5 μg 화합물/kg 체중 내지 약 20 μg 화합물/kg 체중의 범위일 수 있는 것으로 생각된다. 다른 구현예에서, 용량은 약 0.5, 1, 3, 6, 10, 또는 20 mg/kg 체중일 수 있다. 물론, 이 투여량은, 초기 임상 시험의 결과 및 특정 환자의 필요에 따라 그러한 치료 프로토콜에서 일상적으로 수행되는 바와 같이, 상향 또는 하향 조정될 수 있다.

[0143] 특정 구현예에서, ALT-803은 비경구 투여에 적합한 부형제로 제형화된다. 특정 구현예에서, ALT-803은 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (예를 들어, 0.5, 1, 3, 5, 10 또는 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$)로 투여된다.

[0144] 방광암의 치료를 위해, ALT-803은 방광 내로의 점적주입에 의해 투여된다. 점적주입의 방법은 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Lawrencia, et al., Gene Ther 8, 760-8 (2001)]; 문헌[Nogawa, et al, J Clin Invest 115, 978-85 (2005)]; 문헌[Ng, et al., Methods Enzymol 391, 304-13 2005]; 문헌[Tyagi, et al, J Urol 171, 483-9 (2004)]; 문헌[Trevisani, et al., J Pharmacol Exp Ther 309, 1167-73 (2004)]; 문헌[Trevisani, et al., Nat Neurosci 5, 546-51 (2002)]; 문헌[Segal, et al, 1975]; 문헌[Dyson, et al., 2005]; 문헌[Batista, et al., 2005]; 문헌[Dyson, et al., 2005]을 참조한다. 특정 구현예에서, 점적주입을 위한 ALT-803 투여량은 약 5 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 으로 달라질 수 있는 것으로 생각된다.

- [0145] 약학 조성물은, 적절한 부형제와 함께, 투여시에 제어되는 방식으로 치료제를 방출하는 약학 조성물로 제형화된다. 예로는 단일 또는 다중 단위 정제 또는 캡슐 조성물, 오일 용액, 혼탁액, 에멀젼, 마이크로캡슐, 마이크로스피어, 분자 복합체, 나노입자, 패치, 및 리포좀이 있다.
- [0146] 비경구 조성물
- [0147] ALT-803을 포함하는 약학 조성물은 투여 형태, 제형으로, 또는 통상적인 비-독성의 약학적으로 허용되는 담체 및 애쥬번트를 함유하는 적합한 전달 장치 또는 이식물을 통해 주사, 주입 또는 이식(피하, 정맥내, 근육내, 소포내, 복강내 등)에 의해 비경구 투여될 수 있다. 그러한 조성물의 제형 및 제조물은 약학 제형의 당업자에게 잘 알려져 있다. 제형은 상기 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy]에서 찾을 수 있다.
- [0148] ALT-803을 포함하는 비경구용 조성물은 단위 투여 형태(예를 들어, 단일-용량 앰플, 주사기 또는 백)로 제공될 수 있거나, 여러 용량을 함유하고 적합한 보존제가 첨가될 수 있는 바이알로 제공될 수 있다(아래 참조). 조성물은 용액, 혼탁액, 에멀젼, 주입 장치, 또는 이식용 전달 장치의 형태일 수 있거나, 사용 전에 물 또는 또 다른 적합한 비허클로 재구성되는 건조 분말로서 제공될 수 있다. 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병을 경감시키거나 개선시키는 활성 작용제 이외에, 조성물은 적합한 비경구적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 활성 치료제(들)는 제어된 방출을 위해 마이크로스피어, 마이크로캡슐, 나노입자, 리포좀 등 내로 흡입될 수 있다. 또한, 조성물은 혼탁제, 가용화제, 안정화제, pH 조정제, 긴장성 조정제, 및/또는 분산제를 포함할 수 있다.
- [0149] 상기 나타낸 바와 같이, ALT-803을 포함하는 약학 조성물은 멸균 주사에 적합한 형태일 수 있다. 그러한 조성물을 제조하기 위해, 적합한 활성 항신생물/항-감염 치료제(들)가 비경구적으로 허용되는 액체 비허클에 용해되거나 혼탁된다. 사용될 수 있는 허용되는 비허클 및 용매로는 물, 적절한 양의 염산, 수산화나트륨 또는 적합한 완충제의 첨가에 의해 적합한 pH로 조정된 물, 1,3-부탄디올, 릴거액, 및 등장성 염화나트륨 용액 및 텍스트로스 용액이 있다. 수성 제형은 하나 이상의 보존제(예를 들어, 메틸, 에틸 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트)를 또한 함유할 수 있다. 화합물 중 하나가 물에 거의 용해되지 않거나 약간 용해될뿐인 경우, 용해 향상제 또는 가용화제가 첨가될 수 있거나, 용매는 10% w/w 내지 60% w/w의 프로필렌 글리콜 등을 포함할 수 있다.
- [0150] 본 발명은 치료적 유효량의 본원의 화학식의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 대상체(예를 들어, 인간과 같은 포유 동물)에게 투여하는 단계를 포함하는, 신생물성 또는 감염성 질병 및/또는 장애 또는 그 증상을 치료하는 방법을 제공한다. 따라서, 일 구현예는 신생물성 또는 감염성 질병 또는 장애 또는 그 증상을 앓고 있거나 그에 걸리기 쉬운 대상체를 치료하는 방법이다. 방법은 질병 또는 장애가 치료되는 조건 하에서 질병 또는 장애 또는 그 증상을 치료하기에 충분한 치료적 양의 본원의 화합물을 포유 동물에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0151] 본원의 방법은 대상체(그러한 치료가 필요한 것으로 확인된 대상체를 포함함)에게 유효량의 본원에 기재된 화합물 또는 본원에 기재된 조성물을 투여하여 그러한 효과를 생성시키는 단계를 포함한다. 그러한 치료가 필요한 대상체를 확인하는 것은 대상체 또는 건강 관리 전문가의 판단에 속할 수 있고, 주관적(예를 들어, 의견) 또는 객관적(예를 들어, 시험 또는 진단 방법에 의해 측정 가능함)일 수 있다.
- [0152] 본 발명의 치료 방법(예방적 처리를 포함함)은 일반적으로 치료적 유효량의 본원의 화합물, 예컨대 포유 동물, 특히 인간을 포함하는 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 동물, 인간)로의 본원의 화학식의 화합물의 투여를 포함한다. 그러한 치료는 신생물성 또는 감염성 질병, 장애 또는 그 증상을 앓고 있거나, 갖고 있거나, 그에 걸리기 쉽거나, 그에 걸릴 위험이 있는 대상체, 특히 인간에게 적합하게 적용될 것이다. "위험이 있는" 대상체의 결정은 진단 시험 또는 대상체 또는 건강 관리 제공자의 의견(예를 들어, 유전자 시험, 효소 또는 단백질 마커, (본원에 정의된 바와 같은) Marker, 가족력 등)에 의한 임의의 객관적 또는 주관적 결정에 의해 이루어질 수 있다. ALT-803은 면역 반응의 증가가 요망되는 임의의 다른 장애의 치료에 사용될 수 있다.
- [0153] 일 구현예에서, 본 발명은 치료 진행을 모니터링하는 방법을 제공한다. 방법은 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병과 관련된 장애 또는 그 증상을 앓고 있거나 그에 걸리기 쉬운 대상체에서 진단 마커(Marker)(예를 들어, 본원의 화합물에 의해 조절되는 본원에 기재된 임의의 표적, 그의 단백질 또는 지표 등)의 수준 또는 진단 측정(예를 들어, 스크린, 검정)을 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 대상체에게는 질병 또는 그 증상을 치료하기에 충분한 치료적 양의 본원의 화합물이 투여되었다. 방법에서 결정된 Marker의 수준은, 대상체의 질병 상태를 확립하기 위해 건강한 정상 대조군 또는 다른 질병이 있는 환자에서의 알려진 수준의 Marker와 비교될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 대상체에서의 Marker의 제2 수준은 제1 수준의 결정보다 늦은 시점에서 결정되고, 2개의 수준은 질병의 과정 또는 요법의 효능을 모니터링하기 위해 비교된다. 특정 바람직한 구현예에서, 대상체

에서의 Marker의 치료 전 수준은 본 발명에 따른 치료를 시작하기 전에 결정되며; 이어서 Marker의 이 치료 전 수준은, 치료의 효능을 결정하기 위해 치료가 시작된 후의 대상체에서의 Marker의 수준과 비교될 수 있다.

[0154] 조합 요법

바람직하게는, ALT-803은 항-신생물증 또는 항염증 치료제, 예컨대 항체, 예를 들어, 종양-특이적 항체 또는 면역-체크 포인트 저해제와 조합하여 투여된다. 항체 및 ALT-803은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 치료는 질병 적응증에 대한 확립된 요법이고, 항체 요법에 대한 ALT-803 처리의 부가는 환자에 대한 치료 이익을 개선시킨다. 그러한 개선은 개별 환자 기준의 증가된 반응 또는 환자 집단에서의 증가된 반응으로 측정될 수 있다.

[0156] 조합 요법은 항체의 더 적은 용량 또는 덜 빈번한 투여로 개선된 반응을 또한 제공하여 더 우수한 내성 치료 요법을 가져올 수 있다. 언급된 바와 같이, ALT-803와 항체의 조합 요법은 증강된 ADCC, ADCP 및/또는 NK 세포, T-세포, 호중구 또는 단핵구 세포 수준 또는 면역 반응을 비롯한 다양한 메커니즘을 통해 임상 활성의 향상을 제공할 수 있다.

[0157] 요망되는 경우, ALT-803은 수술, 방사선 요법, 화학요법, 단백질-기반 요법 또는 생물학적 요법을 포함하지만 이로 한정되지 않는 임의의 통상적인 요법과 조합하여 투여된다. 화학요법 약물은 알킬화제(예를 들어, 백금-기반 약물, 테트라진, 아지리딘, 니트로소우레아, 질소 머스타드), 항-대사물질(예를 들어, 항-폴레이트, 플루오로피리미딘, 테옥시뉴클레오사이드 유사체, 티오피린), 항-마이크로튜불 작용제(예를 들어, 빈카 알칼로이드, 탁산), 토포이소머라제 저해제(예를 들어, 토포이소머라제 I 및 II 저해제), 세포독성 항생제(예를 들어, 안트라사이클린) 및 면역조절 약물(예를 들어, 탈리도마이드 및 유사체)를 포함한다.

[0158] 키트 또는 약학 시스템

[0159] ALT-803을 포함하는 약학 조성물은 신생물증 또는 자가면역 또는 염증성 질병을 치료하는 데 사용하기 위한 키트 또는 약학 시스템으로 조립될 수 있다. 본 발명의 이 양태에 따른 키트 또는 약학 시스템은 상자, 카톤, 튜브와 같은 운반 수단을 포함하며, 그 안의 폐쇄 구획에 하나 이상의 용기 수단, 예컨대 바이알, 튜브, 앰풀, 병, 주사기, 또는 백을 갖는다. 본 발명의 키트 또는 약학 시스템은 ALT-803을 사용하기 위한 관련 설명서를 또한 포함할 수 있다.

[0160] 재조합 단백질 발현

[0161] 일반적으로, 본 발명의 융합 단백질 복합체(예를 들어, ALT-803의 성분)의 제조는 본원에 개시된 절차 및 인식되는 재조합 DNA 기법에 의해 달성될 수 있다.

[0162] 일반적으로, 재조합 폴리펩타이드는 적합한 발현 비히클 중의 폴리펩타이드-인코딩 핵산 분자 또는 이의 단편의 전부 또는 일부에 의한 적합한 숙주 세포의 형질전환에 의해 생성된다. 분자 생물학 분야의 당업자는 매우 다양한 발현 시스템 중 임의의 것이 재조합 단백질을 제공하는 데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 사용된 정확한 숙주 세포는 본 발명에 중요하지 않다. 재조합 폴리펩타이드는 실질적으로 진핵 숙주(예를 들어, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 예를 들어, Sf21 세포, 또는 포유 동물 세포, 예를 들어, NIH 3T3, HeLa, COS 또는 바람직하게는 CHO 세포)에서 생성될 수 있다. 그러한 세포는 광범위한 공급원으로부터 입수 가능하다(예를 들어, 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection, Rockland, Md.); 또한, 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., *Current Protocol in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons, 1997] 참조). 트랜스펙션의 방법 및 발현 비히클의 선택은 선택된 숙주 시스템에 좌우될 것이다. 형질전환 방법은, 예를 들어, 상기 문헌[Ausubel et al.]에 기재되어 있고; 발현 비히클은, 예를 들어, 문헌[*Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (P. H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987)]에 제공된 것들로부터 선택될 수 있다.

[0163] 재조합 폴리펩타이드의 생성을 위한 다양한 발현 시스템이 존재한다. 그러한 폴리펩타이드를 생성하기에 유용한 발현 벡터는 제한없이 염색체, 에피솜, 및 바이러스-유래 벡터, 예를 들어, 박테리아 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포손, 효모 에피솜, 삽입 요소, 효모 염색체 요소, 바이러스, 예컨대 바콜로바이러스, 파포바 바이러스, 예컨대 SV40, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 조류 폭스 바이러스, 슈도레이비스(pseudorabies) 바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 벡터, 및 이들의 조합으로부터 유래된 벡터를 포함한다.

[0164] 일단 재조합 폴리펩타이드가 발현되면, 이는, 예를 들어, 친화도 크로마토그래피를 이용하여 단리된다. 일 예에

서, 폴리펩타이드에 대해 생성된(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 생성된) 항체는 컬럼에 부착되어 재조합 폴리펩타이드를 단리하는 데 사용될 수 있다. 친화도 크로마토그래피 이전의 폴리펩타이드-보유 세포의 용해 및 분별은 표준 방법에 의해 수행될 수 있다(예를 들어, 상기 문헌[Ausubel et al.] 참조). 일단 단리되면, 재조합 단백질은, 요망되는 경우, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다(예를 들어, 문헌[Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980] 참조).

[0165] 본원에 사용되는 바와 같이, 본 발명의 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이펙터 분자는 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 다른 생물 활성 단백질, 예컨대 효소와 같은 인자를 포함할 수 있다. 또한, 생물학적 활성 폴리펩타이드는 다른 화합물, 예컨대 비-단백질 독소, 세포독성제, 화학요법제, 검출 가능한 표지, 방사성 물질 등에 대한 접합체를 포함할 수 있다.

[0166] 본 발명의 사이토카인은 다른 세포에 영향을 미치고 세포 면역의 다수의 다중 효과 중 임의의 것을 담당하는 세포에 의해 생성된 임의의 인자로 정의된다. 사이토카인의 예는 IL-2 패밀리, 인터페론(IFN), IL-10, IL-1, IL-17, TGF 및 TNF 사이토카인 패밀리, 및 IL-1 내지 IL-35, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , TNF- α , 및 TNF- β 를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0167] 본 발명의 양태에서, 제1 융합 단백질은 인터류킨-15(IL-15) 도메인 또는 이의 기능적 단편에 공유 결합된 제1 생물학적 활성 폴리펩타이드를 포함한다. IL-15는 T-세포 활성화 및 증식에 영향을 미치는 사이토카인이다. 면역 세포 활성화 및 증식에 영향을 미치는 데 있어서 IL-15 활성은 일부 측면에서 IL-2와 유사하지만, 근본적인 차이는 잘 특성화되어 있다(문헌[Waldmann, TA, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601]).

[0168] 본 발명의 또 다른 양태에서, 제1 융합 단백질은 IL-15 변이체(본원에서 IL-15 돌연변이체라고도 지칭됨)인 인터류킨-15(IL-15) 도메인을 포함한다. IL-15 변이체는 바람직하게는 천연(또는 야생형) IL-15 단백질과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. IL-15 변이체는 바람직하게는 IL-15R α 폴리펩타이드에 결합하고 IL-15 효능제 또는 길항제로서 기능한다. 바람직하게는, 효능제 활성을 갖는 IL-15 변이체는 초효능제 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, IL-15 변이체는 IL-15R α 와의 결합과 무관하게 IL-15 효능제 또는 길항제로서 기능할 수 있다. IL-15 효능제는 야생형 IL-15와 비교하여 그에 필적하거나 증가된 생물학적 활성에 의해 예시된다. IL-15 길항제는 야생형 IL-15와 비교하여 감소된 생물학적 활성 또는 IL-15-매개 반응을 저해하는 능력에 의해 예시된다. 일부 예에서, IL-15 변이체는 증가하거나 감소된 활성으로 IL-15R β - γ C 수용체에 결합한다. 일부 구현예에서, IL-15 변이체의 서열은 천연 IL-15 서열과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변화, 예를 들어 치환 또는 결실을 가지며, 그러한 변화는 IL-15 효능제 또는 길항제 활성을 가져온다. 바람직하게는 아미노산 치환/결실은 IL-15R β 및/또는 γ C와 상호 작용하는 IL-15의 도메인에 존재한다. 더욱 바람직하게는, 아미노산 치환/결실은 IL-15R α 폴리펩타이드에 대한 결합 또는 IL-15 변이체를 생성하는 능력에 영향을 미치지 않는다. IL-15 변이체를 생성하기 위한 적합한 아미노산 치환/결실은 추정 또는 공지된 IL-15 구조, IL-15와 알려진 구조를 갖는 IL-2와 같은 상동성 분자의 비교에 기초하여, 본원에 제공된 바와 같은 합리적 또는 무작위 돌연변이유발 및 기능 검정, 또는 다른 경험적 방법을 통해 확인될 수 있다. 추가로 적합한 아미노산 치환은 추가의 아미노산의 보존적 또는 비-보존적 변화 및 삽입일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 IL-15 변이체는 성숙 인간 IL-15 서열의 6, 8, 10, 61, 65, 72, 92, 101, 104, 105, 108, 109, 111, 또는 112번 위치에서 하나 또는 하나 초과의 아미노산 치환/결실을 함유하며; 특히, D8N("D8"은 천연 성숙 인간 IL-15 서열에서의 아미노산 및 잔기 위치를 지칭하고, "N"은 IL-15 변이체의 그 위치에서의 치환된 아미노산 잔기를 지칭함), I6S, D8A, D61A, N65A, N72R, V104P 또는 Q108A 치환은 길항제 활성을 갖는 IL-15 변이체를 생성시키고, N72D 치환은 효능제 활성을 갖는 IL-15 변이체를 생성시킨다.

[0169] 사이토카인과 유사한 케모카인은 다른 세포에 노출될 때 세포 면역의 다수의 다중 효과 중 임의의 것을 담당하는 임의의 화학적 인자 또는 분자로 정의된다. 적합한 케모카인은 CXC, CC, C, 및 CX.sub.3C 케모카인 패밀리 및 CCL-1 내지 CCL-28, CXC-1 내지 CXC-17, XCL-1, XCL-2, CX3CL1, MIP-1 β , IL-8, MCP-1, 및 Rantes를 포함할 수 있지만 이로 한정되지 않는다.

[0170] 성장 인자는 특정 세포에 노출될 때 영향을 받은 세포의 증식 및/또는 분화를 유도하는 임의의 분자를 포함한다. 성장 인자는 단백질 및 화학 분자를 포함하며, 이들 중 일부는 GM-CSF, G-CSF, 인간 성장 인자 및 줄기 세포 성장 인자를 포함한다. 추가의 성장 인자가 또한 본원에 기재된 용도에 적합할 수 있다.

[0171] 독소 또는 세포독성제는 세포에 노출될 때 성장에 대해 치명적인 효과 또는 저해 효과를 갖는 임의의 물질을 포함한다. 더욱 구체적으로, 이펙터 분자는, 예를 들어 디프테리아 독소(DT), 시가(shiga) 독소, 아브린(abrin),

콜레라 독소, 리신, 사포린, 슈도모나스 외독소(PE), 포크위드(pokeweed) 항바이러스 단백질, 또는 젤로닌(gelonin)과 같은 식물 또는 박테리아 기원의 세포 독소일 수 있다. 그러한 독소의 생물학적 활성 단편은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, DT A 쇄 및 리신 A 쇄를 포함한다. 추가로, 독소는, 예를 들어 포스포리파제 효소(예를 들어, 포스포리파제 C)와 같은 세포 표면에서 활성인 작용체일 수 있다.

[0172] 또한, 이펙터 분자는, 예를 들어 빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 블레오마이신, 또는 시스플라틴과 같은 화학요법 약물일 수 있다.

[0173] 추가로, 이펙터 분자는 진단 또는 영상화 연구에 적합한 검출 가능하게 표지된 분자일 수 있다. 그러한 표지는 바이오틴 또는 스트렙타비딘/아비딘, 검출 가능한 나노입자 또는 결정, 효소 또는 이의 촉매 활성 단편, 형광 표지, 예컨대 녹색 형광 단백질, FITC, 피코에리트린, 사이콤(cychome), 텍사스 레드 또는 양자점; 방사성 핵종, 예를 들어, 요오드-131, 이트륨-90, 레늄-188 또는 비스무트-212; 인광 또는 화학발광 분자 또는 PET, 초음파 또는 MRI에 의해 검출 가능한 표지, 예컨대 Gd- 또는 상자성 금속 이온-기반 조영제를 포함한다. 이펙터 또는 태그를 포함하는 단백질을 제조하고 사용하는 것에 관한 개시에 대해서는, 예를 들어, 문헌[Moskaug, et al. J. Biol. Chem. 264, 15709 (1989)]; 문헌[Pastan, I. et al. Cell 47, 641, 1986]; 문헌[Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem. 61, 331, (1992)]; 문헌["Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, Pharmac. Ther., 25, 355 (1982)]; 공개 PCT 출원 WO 94/29350호; 공개 PCT 출원 WO 94/04689호; 공개 PCT 출원 WO2005046449호 및 미국 특허 제5,620,939호를 참조한다.

[0174] 공유 결합된 IL-15와 IL-15R α 도메인을 포함하는 단백질 융합 또는 접합 복합체는 몇 가지 중요한 용도를 갖는다. 손상되거나 사멸되기 쉬운 세포 또는 조직은 본원에 개시된 방법에 의해 쉽게 검정될 수 있다.

[0175] 본 발명의 IL-15 및 IL-15R α 폴리펩타이드는 아미노산 서열 면에서 자연 발생적 IL-15 및 IL-15R α 분자, 예를 들어 인간, 마우스 또는 다른 설치류, 또는 다른 포유 동물의 IL-15 및 IL-15R α 분자에 적합하게 상응한다. 인간 인터류킨 15(IL15) mRNA--젠뱅크: U14407.1, 무스 무스쿨루스(Mus musculus) 인터류킨 15(IL15) mRNA--젠뱅크: U14332.1, 인간 인터류킨-15 수용체 알파 쇄 전구체(IL15RA) mRNA--젠팽크: U31628.1, 무스 무스쿨루스 인터류킨 15 수용체, 알파 쇄--젠팽크: BC095982.1를 포함하는, 이들 폴리펩타이드 및 인코딩 핵산의 서열은 문헌에 공지되어 있다.

[0176] 일부 환경에서, 예를 들어, sc-TCR 또는 sc-항체의 결합가를 증가시키기 위해, 본 발명의 단백질 융합 또는 접합 복합체를 다가로 만드는 것이 유용할 수 있다. 특히, 융합 단백질 복합체의 IL-15 및 IL-15R α 도메인 사이의 상호 작용은 다가 복합체를 생성하는 수단을 제공한다. 또한, 다가 융합 단백질은, 예를 들어, 표준 바이오틴-스트렙타비딘 표지 기법을 사용한 1개 또는 4개의 단백질(동일하거나 상이함) 사이의 서로에 대한 공유 결합 또는 비공유 결합에 의해, 또는 라텍스 비드와 같은 적합한 고체 지지체로의 접합에 의해 제조될 수 있다.

[0177] 화학적으로 가교된 단백질(예를 들어, 나노입자에 가교됨)은 또한 적합한 다가 종이다. 예를 들어, 단백질은, 바이오틴화 BirA 태그와 같은 변형될 수 있는 태그 서열을 인코딩하는 서열 또는 Cys 또는 His와 같은 화학 반응성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기를 포함시킴으로써 변형될 수 있다. 그러한 아미노산 태그 또는 화학 반응성 아미노산은 융합 단백질 또는 항체 내의 다양한 위치에, 바람직하게는 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 이펙터 분자의 활성 부위에 대해 원위에 위치할 수 있다. 예를 들어, 가용성 융합 단백질의 C-말단은 그러한 반응성 아미노산(들)을 포함하는 태그 또는 다른 융합된 단백질에 공유 결합될 수 있다. 2개 이상의 융합 단백질을 적합한 나노입자에 화학적으로 연결하여 다가 분자를 제공하기 위해 적합한 측쇄가 포함될 수 있다. 예시적인 나노입자는 덴드리머, 리포좀, 코어-쉘 입자 또는 PLGA-기반 입자를 포함한다.

[0178] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 융합 단백질 복합체의 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두는 면역글로불린 도메인을 포함한다. 대안적으로, 단백질 결합 도메인-IL-15 융합 단백질은 면역글로불린 도메인에 추가로 연결될 수 있다. 바람직한 면역글로불린 도메인은 다른 면역글로불린 도메인과의 상호 작용을 허용하여 상기 제공된 바와 같은 다중쇄 단백질을 형성하는 영역을 포함한다. 예를 들어, IgG1 C_{H2}-C_{H3}과 같은 면역글로불린 중쇄 영역은 Fc 영역을 생성하기 위해 안정적으로 상호 작용할 수 있다. Fc 도메인을 포함하는 바람직한 면역글로불린 도메인은 Fc 수용체 또는 보체 단백질 결합 활성을 포함하는 이펙터 기능, 및/또는 글리코실화 부위를 갖는 영역을 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질 복합체의 면역글로불린 도메인은 Fc 수용체 또는 보체 결합 활성 또는 글리코실화를 감소시키거나 증강시키는 돌연변이를 함유함으로써, 생성된 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미친다. 예를 들어, Fc 수용체-보유 세포에 대한 결합 활성이 낮은 본 발명의 융합 단백질 복합체를 생성하기 위해 Fc 수용체에 대한 결합을 감소시키는 돌연변이를 함유하는 면역글로불린 도메인이 사용될 수 있으며, 이는

특정 항원을 인식하거나 검출하도록 설계된 시약에 유리할 수 있다.

[0179] 핵산 및 백터

본 발명은 본 단백질(예를 들어, ALT-803의 성분)을 인코딩하는 핵산 서열 및 특히 DNA 서열을 추가로 제공한다. 바람직하게는, DNA 서열은 파지, 바이러스, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, YAC, 또는 에피솜과 같은 염색체외 복제에 적합한 백터에 의해 운반된다. 특히, 본원에 기재된 제조 방법을 용이하게 하고 상당한 양의 융합 단백질을 수득하기 위해 요망되는 융합 단백질을 인코딩하는 DNA 백터가 사용될 수 있다. DNA 서열은 적절한 발현 백터, 즉, 삽입된 단백질-코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 백터 내로 삽입될 수 있다. 단백질-코딩 서열을 발현시키기 위해 다양한 숙주-백터 시스템이 이용될 수 있다. 이들은 바이러스(예를 들어, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스 등)에 감염된 포유 동물 세포 시스템; 바이러스(예를 들어, 바콜로바이러스)에 감염된 곤충 세포 시스템; 미생물, 예컨대 효모 백터를 함유하는 효모, 또는 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질전환된 박테리아를 포함한다. 이용된 숙주-백터 시스템에 따라, 다수의 적합한 전사 및 번역 요소 중 어느 하나가 사용될 수 있다. 상기 문헌[Sambrook et al.] 및 상기 문헌[Ausubel et al.]을 참조한다.

[0181] 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하는 방법이 본 발명에 포함되며, 이 방법은 제1 및 제2 융합 단백질을 인코딩하는 본원에 기재된 바와 같은 DNA 백터를 숙주 세포 내로 도입하는 단계, 세포 또는 배지에서 융합 단백질을 발현시키고 제1 융합 단백질의 IL-15 도메인과 제2 융합 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 사이의 결합을 가능하게 하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 숙주 세포를 배지에서 배양하는 단계, 숙주 세포 또는 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계를 포함한다.

[0182] 일반적으로, 본 발명에 따른 바람직한 DNA 백터는, 이백터 분자를 인코딩하는 서열에 작동적으로 연결된, 생물학적 활성 폴리펩타이드를 인코딩하는 제1 뉴클레오티드 서열의 도입을 위한 제1 클로닝 부위를 5'에서 3' 방향으로 포함하는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0183] DNA 백터에 의해 인코딩되는 융합 단백질 성분은 카세트 형식으로 제공될 수 있다. 용어 "카세트"는 표준 재조합 방법에 의해 각각의 성분이 또 다른 성분으로 쉽게 치환될 수 있음을 의미한다. 특히, 카세트 형식으로 구성된 DNA 백터는 인코딩된 융합 복합체가 혈청형을 발생시키는 능력을 가질 수 있거나 가지는 병원체에 대해 사용될 때 특히 바람직하다.

[0184] 융합 단백질 복합체를 코딩하는 백터를 만들기 위해, 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 적합한 리가제의 사용에 의해 이백터 웨타이드를 코딩하는 서열에 연결된다. 제공 웨타이드를 코딩하는 DNA는 천연 공급원, 예컨대 적합한 세포주로부터 DNA를 단리함으로써 또는 공지된 합성 방법, 예를 들어 포스페이트 트리에스테르 방법에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984)]을 참조한다. 합성 올리고뉴클레오티드는 또한 시판되는 자동화된 올리고뉴클레오티드 합성을 사용하여 제조될 수 있다. 일단 단리되면, 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 당업계에 공지된 다른 수단에 의해 증폭될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩타이드 유전자를 증폭시키기에 적합한 PCR 프라이머는 PCR 생성물에 제한 부위를 추가할 수 있다. PCR 생성물은 바람직하게는 생물학적 활성 폴리펩타이드-이백터 융합 복합체의 적절한 발현 및 분비에 필요한 이백터 웨타이드 및 리더 서열에 대한 스플라이스 부위를 포함한다. PCR 생성물은 또한 바람직하게는 링커 서열을 코딩하는 서열, 또는 그러한 서열의 리게이션을 위한 제한 효소 부위를 포함한다.

[0185] 본원에 기재된 융합 단백질은 바람직하게는 표준 재조합 DNA 기법에 의해 생성된다. 예를 들어, 일단 생물학적 활성 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 분자가 단리되면, 이백터 폴리펩타이드를 인코딩하는 또 다른 DNA 분자에서 서열이 리게이션될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 이백터 웨타이드를 코딩하는 DNA 서열에 직접 연결될 수 있거나, 더욱 전형적으로, 본원에 논의된 바와 같은 링커 서열을 코딩하는 DNA 서열은 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열과 이백터 웨타이드를 코딩하는 서열 사이에 개재되고 적합한 리가제를 사용하여 연결될 수 있다. 생성된 하이브리드 DNA 분자는 융합 단백질 복합체를 생성하기 위해 적합한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. DNA 분자들은, 리게이션 후, 인코딩된 폴리펩타이드의 번역 프레임이 변경되지 않도록 5'에서 3' 방향으로 서로 리게이션된다(즉, DNA 분자들은 서로 인-프레임(in-frame) 리게이션됨). 생성된 DNA 분자는 인-프레임 융합 단백질을 인코딩한다.

[0186] 다른 뉴클레오티드 서열도 유전자 작제물에 포함될 수 있다. 예를 들어, 이백터 웨타이드에 융합된 생물학적 활성 폴리펩타이드를 코딩하는 서열의 발현을 제어하는 프로모터 서열, 또는 융합 단백질을 세포 표면 또는 배양

배지로 유도하는 리더 서열이 작제물에 포함되거나 작제물이 삽입되는 발현 벡터에 존재할 수 있다. 면역글로불린 또는 CMV 프로모터가 특히 바람직하다.

[0187] 변이체 생물학적 활성 폴리펩타이드, IL-15, IL-15R α 또는 Fc 도메인 코딩 서열을 수득함에 있어서, 당업자는 폴리펩타이드가, 생물학적 활성의 손실 또는 감소없이, 특정 아미노산 치환, 첨가, 결실, 및 번역후 변형에 의해 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 특히, 보존적 아미노산 치환, 즉, 하나의 아미노산의 유사한 크기, 전하, 극성 및 입체 형태의 또 다른 아미노산으로의 치환은 단백질 기능을 유의하게 변경시킬 가능성이 별로 없다는 것이 잘 알려져 있다. 단백질의 구성성분인 20개의 표준 아미노산은 다음과 같이 크게 4가지 보존적 아미노산 그룹으로 분류될 수 있다: 비극성(소수성) 그룹은 알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판 및 발린을 포함하고; 극성(비하전된, 중성) 그룹은 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함하고; 양으로 하전된(염기성) 그룹은 아르기닌, 히스티딘 및 리신을 함유하고; 음으로 하전된(산성) 그룹은 아스파르트산 및 글루탐산을 함유한다. 단백질에서 하나의 아미노산의 동일한 그룹 내의 또 다른 아미노산으로의 치환은 단백질의 생물학적 활성에 악영향을 미칠 가능성이 없다. 다른 경우에, 단백질의 생물학적 활성을 감소시키거나 향상시키기 위해 아미노산 위치에 대한 변경이 이루어질 수 있다. 그러한 변화는 무작위로 도입되거나 표적화된 잔기(들)의 공지되거나 추정된 구조적 또는 기능적 특성에 기초하여 부위-특이적 돌연변이를 통해 도입될 수 있다. 변이체 단백질의 발현 후, 변경으로 인한 생물학적 활성의 변화는 결합 또는 기능 검정을 이용하여 쉽게 평가될 수 있다.

[0188] 뉴클레오티드 서열들 사이의 상동성은 DNA 하이브리드화 분석에 의해 결정될 수 있으며, 여기서 이중-가닥 DNA 하이브리드의 안정성은 발생하는 염기 쌍형성의 정도에 좌우된다. 고온 및/또는 낮은 염 함량의 조건은 하이브리드의 안정성을 감소시키며, 선택된 상동성 정도 미만을 갖는 서열의 어닐링을 방지하도록 변경될 수 있다. 예를 들어, 약 55% G-C 함량을 갖는 서열의 경우, 40°C 내지 50°C, 6 x SSC(염화나트륨/시트르산나트륨 완충액) 및 0.1% SDS(소듐 도데실 세라믹아이트)의 하이브리드화 및 세척 조건은 약 60% 내지 70% 상동성을 나타내고, 50°C 내지 65°C, 1 x SSC 및 0.1% SDS의 하이브리드화 및 세척 조건은 약 82% 내지 97% 상동성을 나타내고, 52°C, 0.1 x SSC 및 0.1% SDS의 하이브리드화 및 세척 조건은 약 99% 내지 100% 상동성을 나타낸다. 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 비교하기 위한(그리고 상동성 정도를 측정하기 위한) 광범위한 컴퓨터 프로그램이 또한 이용 가능하고, 시판 소프트웨어와 무료 소프트웨어 모두의 공급원을 제공하는 목록은 문헌[Ausubel et al. (1999)]에 있다. 쉽게 이용 가능한 서열 비교 및 다중 서열 정렬 알고리즘은 각각 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(문헌[Altschul et al., 1997]) 및 ClustalW 프로그램이다. BLAST는 월드 와이드 웹 상의 ncbi.nlm.nih.gov에서 이용 가능하며, ClustalW의 버전은 2.ebi.ac.uk에서 이용 가능하다.

[0189] 융합 단백질의 성분은 각각이 그의 의도된 기능을 수행할 수 있는 한 거의 모든 순서로 조직화될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 생물학적 활성 폴리펩타이드는 이펙터 분자의 C 또는 N 말단부에 위치한다.

[0190] 본 발명의 바람직한 이펙터 분자는 이를 도메인이 의도된 기능에 도움이 되는 크기를 가질 것이다. 본 발명의 이펙터 분자는 제조되어 잘 알려진 화학적 가교 방법을 포함하는 다양한 방법에 의해 생물학적 활성 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Means, G. E. and Feeney, R. E. (1974) in *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day]을 참조한다. 또한, 문헌[S. S. Wong (1991) in *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press]을 참조한다. 그러나, 인-프레임 융합 단백질을 제조하기 위해 재조합 조작을 이용하는 것이 일반적으로 바람직하다.

[0191] 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 융합 분자 또는 접합 분자는 여러 방식으로 조직화될 수 있다. 예시적인 구성에서, 생물학적 활성 폴리펩타이드의 C-말단은 이펙터 분자의 N-말단에 작동적으로 연결된다. 그 연결은 요망되는 경우 재조합 방법에 의해 달성될 수 있다. 그러나, 또 다른 구성에서, 생물학적 활성 폴리펩타이드의 N-말단이 이펙터 분자의 C-말단에 연결된다.

[0192] 대안적으로, 또는 추가로, 하나 이상의 추가의 이펙터 분자가 필요에 따라 생물학적 활성 폴리펩타이드 또는 접합 복합체 내로 삽입될 수 있다.

벡터 및 발현

[0194] ALT-803을 발현시키기 위해 다수의 전략이 이용될 수 있다. 예를 들어, ALT-803을 인코딩하는 작제물은, 작제물의 삽입을 위해 벡터를 절단하는 제한 효소에 이은 리게이션을 사용하여 적합한 벡터 내로 통합될 수 있다. 이어서, 유전자 작제물을 함유하는 벡터는 융합 단백질의 발현을 위해 적합한 숙주 내로 도입된다. 상기 문헌 [Sambrook et al.]을 전반적으로 참조한다. 적합한 벡터의 선택은 클로닝 프로토콜과 관련된 인자에 기초하여

경험적으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 벡터는 사용중인 숙주와 양립 가능하고 그에 대한 적절한 레플리콘을 가져야 한다. 벡터는 발현시키고자 하는 융합 단백질 복합체를 코딩하는 DNA 서열을 수용할 수 있어야 한다. 적합한 숙주 세포는 진핵 세포 및 원핵 세포, 바람직하게는 쉽게 형질전환되고 배양 배지에서 빠른 성장을 나타낼 수 있는 세포를 포함한다. 구체적으로, 바람직한 숙주 세포는 대장균, 바실러스 서브틸러스(*Bacillus subtilis*) 등과 같은 원핵 생물 및 동물 세포 및 효모 균주와 같은 진핵 생물, 예를 들어, 사카로마이세스 세레비시애를 포함한다.

[0195] 포유 동물 세포, 특히 J558, NS0, SP2-0 또는 CHO가 일반적으로 바람직하다. 다른 적합한 숙주는, 예를 들어, 곤충 세포, 예컨대 Sf9를 포함한다. 통상적인 배양 조건이 사용된다. 상기 문헌[Sambrook]을 참조한다. 이어서 형질전환되거나 트랜스펙션된 안정한 세포주가 선택될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체를 발현하는 세포는 공지된 절차에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린에 연결된 융합 단백질 복합체의 발현은 연결된 면역글로불린에 특이적인 ELISA에 의해 및/또는 면역블로킹에 의해 결정될 수 있다. IL-15 또는 IL-15R α 도메인에 연결된 생물학적 활성 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질의 발현을 검출하는 다른 방법이 실시예에 개시되어 있다.

[0196] 상기 개괄적으로 언급된 바와 같이, 숙주 세포는 요망되는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산을 전파하기 위한 준비 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 숙주 세포는 융합 단백질의 생산이 구체적으로 의도된 원핵 또는 진핵 세포를 포함할 수 있다. 따라서 숙주 세포는 구체적으로 융합체를 인코딩하는 핵산을 전파할 수 있는 효모, 파리, 벌레, 식물, 개구리, 포유 동물 세포 및 기관을 포함한다. 사용될 수 있는 포유 동물 세포주의 비-제한적 예로는 CHO dhfr-세포(문헌[Urlaub and Chasman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)]), 293 세포(문헌[Graham et al., *J Gen. Virol.*, 36:59 (1977)]) 또는 SP2 또는 NS0와 같은 골수종 세포(문헌[Galfre and Milstein, *Meth. Enzymol.*, 73(B):3 (1981)])가 있다.

[0197] 요망되는 융합 단백질 복합체를 인코딩하는 핵산을 전파할 수 있는 숙주 세포는 곤충(예를 들어, 스포도프테라 프루기페르다(*Sp. frugiperda*)), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비시애, 스키조사카로마이세스 품베(*S. pombe*), 피키아 파스토리스(*P. pastoris*)), 클루아베로마이세스 락티스(*K. lactis*), 한세눌라 폴리모르파(*H. polymorpha*); 문헌[Fleer, R., *Current Opinion in Biotechnology*, 3(5):486496 (1992)]에서 전반적으로 검토된 바와 같음), 진균 및 식물 세포를 포함하는 비-포유 동물 진핵 세포를 또한 포함한다. 대장균 및 바실러스와 같은 특정 원핵 생물이 또한 고려된다.

[0198] 요망되는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산은 세포를 트랜스펙션시키기 위한 표준 기법에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. "트랜스펙션시키는" 또는 "트랜스펙션"이라는 용어는, 칼슘 포스페이트 공침, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션, 리포펙션, 전기천공, 미세주입, 바이러스 형질도입 및/또는 통합을 비롯한, 숙주 세포 내로 핵산을 도입하기 위한 모든 통상적인 기법을 포함하고자 한다. 숙주 세포를 트랜스펙션시키는 적합한 방법은 상기 문헌[Sambrook et al.] 및 다른 실험실용 교재에서 찾을 수 있다.

[0199] 다양한 프로모터(전사 개시 조절 영역)가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 적절한 프로모터의 선택은 제안된 발현 숙주에 좌우된다. 이종 공급원으로부터의 프로모터는, 이들이 선택된 숙주에서 가능한 한 사용될 수 있다.

[0200] 프로모터 선택은 웨პ타이드 또는 단백질 생산의 요망되는 효율 및 수준에 또한 좌우된다. 대장균에서 단백질 발현 수준을 극적으로 증가시키기 위해 tac와 같은 유도성 프로모터가 종종 사용된다. 단백질의 과발현은 숙주 세포에 유해할 수 있다. 결과적으로, 숙주 세포 성장이 제한될 수 있다. 유도성 프로모터 시스템의 사용은 유전자 발현의 유도 전에 숙주 세포가 허용 가능한 밀도로 배양될 수 있게 함으로써 더 높은 생성물 수율을 촉진한다.

[0201] 다양한 신호 서열이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩타이드 코딩 서열과 상동성인 신호 서열이 사용될 수 있다. 대안적으로, 발현 숙주에서의 효율적인 분비 및 처리를 위해 선택되거나 설계된 신호 서열이 사용될 수도 있다. 예를 들어, 적합한 신호 서열/숙주 세포 쌍은 바실러스 서브틸러스에서의 분비를 위한 바실러스 서브틸러스 *sacB* 신호 서열, 및 피키아 파스토리스 분비를 위한 피키아 파스토리스 산 포스파타제 *phoI* 신호 서열 또는 사카로마이세스 세레비시애 α -교배 인자를 포함한다. 신호 서열은, 신호 웨პ티다제 절단 부위를 인코딩하는 서열을 통해 단백질 코딩 서열에 직접 연결되거나, 일반적으로 10개 미만의 코돈으로 이루어진 짧은 뉴클레오티드 브릿지를 통해 연결될 수 있으며, 여기서 브릿지는 다운스트림 단백질 서열의 정확한 판독 프레임을 보장한다.

[0202] 전사 및 번역을 향상시키는 요소가 진핵 생물 단백질 발현 시스템에 대해 확인되었다. 예를 들어, 이종성 프로모터의 양쪽에 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 프로모터 1000 bp를 위치시키는 것은 식물 세포에서 전사

수준을 10배 내지 400배 상승시킬 수 있다. 발현 작제물은 적절한 번역 개시 서열을 또한 포함해야 한다. 적절한 번역 개시를 위해 코작(Kozak) 컨센서스 서열을 포함하도록 하는 발현 작제물의 변형은 번역 수준을 10배 증가시킬 수 있다.

[0203] 마커가 관심 대상 유전자와 다른 부위에 통합될 수 있도록, 발현 작제물의 일부이거나 발현 작제물과 별개일 수 있는(예를 들어, 발현 벡터에 의해 운반되는) 선택성 마커가 종종 사용된다. 예로는 항생제에 대한 내성을 부여하는 마커(예를 들어, b1a는 대장균 숙주 세포의 경우 암페실린에 대한 내성을 부여하고, nptII는 매우 다양한 원핵 및 진핵 세포에 대해 카나마이신 내성을 부여함) 또는 숙주가 최소 배지 상에서 성장할 수 있게 하는 마커(예를 들어, HIS4는 피키아 파스토리스 또는 His⁻ 사카로마이세스 세레비시애가 히스티딘의 부재 하에서 성장할 수 있게 함)가 있다. 선택 가능 마커는 마커의 독립적인 발현을 허용하기 위해 그 자체의 전사 및 번역 개시 및 종결 조절 영역을 갖는다. 항생제 내성이 마커로 사용되는 경우, 선택을 위한 항생제의 농도는 항생제에 따라 다를 것이며, 일반적으로 배지 mL당 항생제 10 μg 내지 600 μg의 범위이다.

[0204] 발현 작제물은 공지된 재조합 DNA 기법(문헌[Sambrook et al., 1989]; 문헌[Ausubel et al., 1999])을 이용하여 조립된다. 제한 효소 분해 및 리게이션은 2개의 DNA 단편을 연결시키는 데 사용되는 기본 단계들이다. DNA 단편의 단부는 리게이션 전에 변형을 필요로 할 수 있으며, 이는 오버hang(overhang)을 채우거나, 단편(들)의 말단 부분을 뉴클레아제(예를 들어, ExoIII)로 결실시키거나, 부위 지정 돌연변이유발에 의해, 또는 PCR에 의해 새로운 염기쌍을 첨가함으로써 달성될 수 있다. 선택된 단편들의 연결을 용이하게 하기 위해 폴리링커 및 어댑터가 사용될 수 있다. 발현 작제물은 전형적으로 대장균의 제한, 리게이션, 및 형질전환의 라운드를 사용하는 단계로 조립된다. 발현 작제물의 작제에 적합한 다수의 클로닝 벡터가 당업계에 공지되어 있으며(문헌[Ausubel et al., 1999]에 인용된 λZAP 및 pBLUESCRIPT SK-1(캘리포니아주 라호이아 소재의 Stratagene), pET(워스콘신주 매디슨 소재의 Novagen Inc.)), 특정 선택은 본 발명에 중요하지 않다. 클로닝 벡터의 선택은 숙주 세포 내로의 발현 작제물의 도입을 위해 선택된 유전자 전달 시스템에 의해 영향을 받을 것이다. 각 단계의 종료 시에, 생성된 작제물은 제한, DNA 서열, 하이브리드화 및 PCR 분석에 의해 분석될 수 있다.

[0205] 발현 작제물은 선형 또는 원형의 클로닝 벡터 작제물로서 숙주 내로 형질전환될 수 있거나, 클로닝 벡터로부터 분리되어 그대로 사용되거나 전달 벡터 상으로 도입될 수 있다. 전달 벡터는 선택된 숙주 세포 유형에서의 발현 작제물의 도입 및 유지를 용이하게 한다. 발현 작제물은 다수의 공지된 유전자 전달 시스템(예를 들어, 자연 적격(natural competence), 화학적으로 매개된 형질전환, 원형질체 형질전환, 전기천공, 바이오리스틱(biolistic) 형질전환, 트랜스펙션, 또는 접합) 중 임의의 것에 의해 숙주 세포 내로 도입된다(문헌[Ausubel et al., 1999]; 문헌[Sambrook et al., 1989]). 선택된 유전자 전달 시스템은 사용된 숙주 세포 및 벡터 시스템에 좌우된다.

[0206] 예를 들어, 발현 작제물은 원형질체 형질전환 또는 전기천공에 의해 사카로마이세스 세레비시애 세포 내로 도입될 수 있다. 사카로마이세스 세레비시애의 전기천공은 쉽게 달성되며, 스페로플라스트(spheroplast) 형질전환에 필적하는 형질전환 효율을 가져온다.

[0207] 본 발명은 추가로 관심 대상 융합 단백질을 단리하기 위한 생산 공정을 제공한다. 공정에서, 조절 서열에 작동적으로 연결된 관심 대상 단백질을 인코딩하는 핵산이 도입된 숙주 세포(예를 들어, 효모, 진균, 곤충, 박테리아 또는 동물 세포)는, 관심 대상 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 전사를 자극하기 위해 배양 배지에서 생산 규모로 성장된다. 후속하여, 관심 대상 융합 단백질이 수거된 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 단리된다. 배지 또는 수거된 세포로부터 관심 대상 단백질을 단리하기 위해 표준 단백질 정제 기법이 이용될 수 있다. 특히, 정제 기법은, 롤러 병, 스피너 플라스크, 조직 배양 플레이트, 생물 반응기, 또는 발효기를 포함하는 다양한 구현물로부터 요망되는 융합 단백질을 대규모로(즉, 적어도 밀리그램 양으로)로 발현시키고 정제하기 위해 이용될 수 있다.

[0208] 발현된 단백질 융합 복합체는 공지된 방법에 의해 단리되고 정제될 수 있다. 전형적으로 배양 배지가 원심분리되거나 여과되고, 이어서 상층액이 친화도 또는 면역친화도 크로마토그래피, 예를 들어 단백질-A 또는 단백질-G 친화도 크로마토그래피 또는 발현된 융합 복합체에 결합하는 모노클로날 항체의 사용을 포함하는 면역친화도 프로토콜에 의해 정제된다. 본 발명의 융합 단백질은 공지된 기법들의 적절한 조합에 의해 분리되고 정제될 수 있다. 이를 방법으로는, 예를 들어, 염 침전 및 용매 침전과 같은 용해도를 이용하는 방법, 투석, 한외 여과, 겔-여과, 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동과 같은 분자량의 차이를 이용하는 방법, 이온-교환 컬럼 크로마토그래피와 같은 전기 전하의 차이를 이용하는 방법, 친화도 크로마토그래피와 같은 특이적 친화도를 이용하는 방법, 역상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 소수성의 차이를 이용하는 방법 및 등전 집중 전기영동과 같은 등전점의 차이를 이용하는 방법, 금속 친화도 컬럼, 예컨대 Ni-NTA가 있다. 이를 방법에 관한 개시에 대해서는,

상기 문헌[Sambrook et al.] 및 문헌[Ausubel et al.]을 전반적으로 참조한다.

- [0209] 본 발명의 융합 단백질은 실질적으로 순수한 것이 바람직하다. 즉, 융합 단백질은, 융합 단백질이 바람직하게는 적어도 80% 또는 90% 내지 95%의 균질성(w/w)으로 존재하도록 그를 자연적으로 수반하는 세포 치환기로부터 단리된 것이다. 적어도 98% 내지 99%의 균질성(w/w)을 갖는 융합 단백질이 많은 약학, 임상 및 연구 적용에 가장 바람직하다. 일단 실질적으로 정제되면, 융합 단백질은 치료적 적용을 위해 실질적으로 오염 물질이 없을 것이다. 일단 부분적으로 또는 실질적인 순도로 정제되면, 가용성 융합 단백질은 치료적으로, 또는 본원에 개시된 바와 같은 시험관내 또는 생체내 검정을 수행하는 데 사용될 수 있다. 실질적인 순도는 크로마토그래피 및 젤 전기영동과 같은 다양한 표준 기법에 의해 결정될 수 있다.
- [0210] 본 융합 단백질 복합체는 암성이거나 감염된, 또는 하나 이상의 질병에 감염될 수 있는 다양한 세포와의 시험관내 또는 생체내 사용에 적합하다.
- [0211] 인간 인터류킨-15(hIL-15)는 항원 제공 세포 상에서 발현된 인간 IL-15 수용체 α 쇄(hIL-15R α)에 의해 면역 이펙터 세포에 트랜스로 제공된다. IL-15R α는 주로 세포외 스시 도메인(IL-15R α Su)을 통해 고친화도(38 pM)로 hIL-15에 결합한다. 본원에 기재된 바와 같이, IL-15 및 IL-15R α Su 도메인은 가용성 복합체(예를 들어, ALT-803)를 생성하기 위해 또는 다중-도메인 융합 복합체를 작제하기 위한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.
- [0212] IgG 도메인, 특히 Fc 단편은 승인된 생물학적 약물을 포함하는 다수의 치료용 분자에 대한 이량체 스캐폴드로서 성공적으로 사용되었다. 예를 들어, 에타너셉트(etanercept)는 인간 IgG1의 Fc 도메인에 연결된 가용성 인간 p75 종양 괴사 인자-α(TNF-α) 수용체(sTNFR)의 이량체이다. 이 이량체화는 에타너셉트가 TNF-α 활성을 저해하는 데 있어서 단량체 sTNFR보다 최대 1,000배 더 강력해지도록 하고, 단량체 형태보다 5배 더 긴 혈청 반감기를 갖는 융합체를 제공한다. 결과적으로, 에타너셉트는 생체내 TNF-α의 전염증 활성의 중화에 그리고 다수의 상이한 자가면역 적응증에 대한 환자 결과를 개선시키는 데 효과적이다.
- [0213] 이량체화 활성에 더하여, Fc 단편은 보체 활성화 및 자연 살해(NK) 세포, 호중구, 단핵구 세포, 식세포 및 수지상 세포 상에 디스플레이된 Fc γ 수용체와의 상호 작용을 통해 세포독성 이펙터 기능을 또한 제공한다. 항암 치료용 항체 및 다른 항체 도메인-Fc 융합 단백질과 관련하여, 이를 활성은 동물 종양 모델 및 암 환자에서 관찰된 효능에서 중요한 역할을 할 가능성이 있다. 그러나, 이러한 세포독성 이펙터 반응은 다수의 치료적 적용에서 충분하지 않을 수 있다. 따라서, Fc 도메인의 이펙터 활성을 개선 및 확장시키고, 면역치료용 분자를 통해 질병 부위에서의 NK 세포 및 T 세포를 포함하는 세포용해성 면역 반응의 활성 또는 동원을 증가시키는 다른 수단을 개발하는 데 상당한 관심이 있었다.
- [0214] 인간-유래 면역자극 치료제를 개발하기 위해, 인간 IL-15(hIL-15) 및 IL-15 수용체 도메인이 사용되었다. hIL-15는 높은 결합 친화도(약 10^{-11} M의 평형 해리 상수(KD))로 hIL-15 수용체 α-쇄(hIL-15R α)와 결합하는 사이토카인의 작은 4개의 α-나선 다발 패밀리의 구성원이다. 이어서, 생성된 복합체는 T 세포 및 NK 세포의 표면 상에 디스플레이된 인간 IL-2/15 수용체 β/공통 γ 쇄(hIL-15R β γ C) 복합체에 트랜스로 제공된다. 이 사이토카인/수용체 상호 작용은 바이러스 감염된 세포 및 악성 세포를 근절하는 데 중요한 역할을 하는 이펙터 T 세포 및 NK 세포의 확장 및 활성화를 가져온다. 통상적으로, hIL-15 및 hIL-15R α는 수지상 세포에서 공동 생성되어 세포 내에서 복합체를 형성하며, 이는 후속하여 분비되어 세포 표면 상에 이종이량체 분자로서 디스플레이된다. 따라서, hIL-15와 hIL-15R α 상호 작용의 특성은 이를 쇄간 결합 도메인이 인간-유래 면역자극 복합체 및 스캐폴드로서 작용하여 표적-특이적 결합을 할 수 있는 가용성 이량체 분자를 만들어낼 수 있음을 시사한다.
- [0215] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한 통상의 기술자의 지식 범위 내에 있는 분자 생물학(재조합 기법을 포함함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기법을 이용한다. 그러한 기법은 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989)]; 문헌["Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984)]; 문헌["Animal Cell Culture" (Freshney, 1987)]; 문헌["Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996)]; 문헌["Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987)]; 문헌["Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987)]; 문헌["PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994)]; 문헌["Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)]과 같은 문헌에 상세히 설명되어 있다. 이들 기법은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드의 생성에 적용 가능하며, 이에 따라 본 발명을 구성하고 실시하는 데 있어서 고려될 수 있다. 특정 구현예를 위한 특히 유용한 기법은 이어지는 섹션에서 논의될 것이다.
- [0216] 시험관내 및 실험 동물 종양 모델에서의 IL-15 초효능제인 ALT-803을 사용한 항-CD38 항체의 항-종양 활성의 향

상이 본원에 기재되어 있다. 다라투무맙은 재발된 또는 불응성 다발성 골수종 환자의 치료를 위해 FDA에 의해 최근 승인된 항-CD38 항체이다. 다라투무맙은 CD38 발현 종양 세포를 표적화함으로써 종양 부담을 경감시키는 것으로 밝혀졌다.

- [0217] 유사하게, 이사톡시맙(SAR650984), MOR202, Ab79, AB19, 및 MT-4019와 같은 다른 항-CD38 Ab는 CD38-발현 종양 세포에 대해 항종양 활성이 있고/있거나 혈액 종양 환자에서 임상 활성이 있는 것으로 밝혀졌다. 아래에서 실시 예에 기재된 바와 같이, 조합 요법에서 다라투무맙의 항-CD38 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 향상시키기 위한 신규한 IL-15 초효능제-복합체인 ALT-803의 시험관내 능력뿐만 아니라 생체내 능력이 조사되었다. 새로 단리된 PBMC를 사용하여, ALT-803이 인간 B 림프종인 Daudi 세포에 대한 다라투무맙의 ADCC 활성을 유의하게 향상시켰음이 입증되었다. 아래에서 실시예에 기재된 바와 같이, ALT-803에 의해 활성화된 정제된 인간 NK 세포는 원발성 인간 B-림프종 세포에 대한 다라투무맙-매개 ADCC 활성을 향상시켰다. Daudi 세포에 대한 다라투무맙-매개 항종양 활성에 미치는 ALT-803의 생체내 효과가 SCID 이종이식 모델에서 또한 조사되었다. ALT-803과 다라투무맙 모두는 단독으로 종양-보유 마우스에서 Daudi 종양 부담을 경감시킬 수 있는 것으로 관찰되었다. 그러나, ALT-803과 다라투무맙의 조합은 항종양 활성을 증가시켜 골수에서 Daudi 세포를 유의하게 감소시켰다. 이들 관찰은 다라투무맙 처리에 대한 ALT-803의 첨가가 다라투무맙 단독과 비교하여 다라투무맙의 항종양 효능을 향상시킨다는 것을 나타낸다. 또한, 본원에 기재된 바와 같이, ALT-803은 종양 세포에 대한 다라투무맙의 식균 작용의 항체 의존성 세포독성을 또한 증강시킨다. 현재의 임상 연구에서, 상관 연구는 ALT-803이 Daudi 세포에 대한 다라투무맙의 ADCC 활성을 증강시킨다는 것을 또한 보여준다. 이는 또한 ALT-803이 생체내에서 종양-특이적 항체와의 상승적 항종양 활성을 보유함을 입증한다.

- [0218] 하기 실시예는 당업자에게 본 발명의 검정, 스크리닝, 및 치료 방법을 구성하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하도록 제시되며, 본 발명자들이 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

실시예 1: 항-CD38 항체와 조합된 ALT-803에 의한 세포-매개 세포독성의 유도

- [0220] 본 실시예에서, "ALT-803"은 이량체 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질과 비공유 결합된 IL-15N72D를 포함하는 복합체를 의미하며, 상기 복합체는 면역 자극 활성을 나타낸다. 선택적으로, IL-15N72D 및/또는 IL-15R α Su/Fc 융합 단백질은 참조 서열에 비해 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과의 아미노산 변이를 포함한다. 예시적인 IL-15N72D 아미노산 서열이 아래에 제공된다. (예를 들어, 본원에 참고로 포함된 U.S.S.N. 13/769,179호 참조).

- [0221] 예시적인 IL-15N72D 혼산 서열이 (리더 웹타이드와 함께) 아래에 제공된다(SEQ ID NO: 1):

- ## [0222] (리더 펩타이드)

atggagacagacacactctgttagggtaactgtcttgtttccagggtccaccgggt-

- [0224] (U-15N72D)

- [0225]

- (전지 쿠도)

taa

- [0228] 예시점인 H-15NZD2D 아미노산 성분인 (리더 페타이드와 함께) 아래에 제공된다(SEO_ID_NO: 2).

- [0229] (리더 페타이드)

METDTL11WVLLWVPGSTG

- [0221] (U-1ENZD)

ANALISIS DE LA MIGRACIÓN EN EL MUNICIPIO DE TAPACHO, CHIAPAS

JHDITMENLHLI ANDGLSCGNCGNNTESOCKEGEEL EFKNIKEELOSEVNHHVOMEPNTS

[0233] 일부 경우에, 리더 웹타이드는 성숙 IL-15N72D 폴리웹타이드(SEQ ID NO: 3)로부터 결단된다:

[0234] (*IL-15N72D*)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLLELQVISLESGDAS

IHDITVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0235] 예시적인 IL-15R α Su/Fc 핵산 서열이 (리더 웹타이드와 함께) 아래에 제공된다(SEQ ID NO: 4):

[0236] (리더 웹타이드)

atggacagacttactttcattccgtctgattgtccctgcgtacgtttgtcc-

[0237] (*IL-15R α Su*)

atcacggtccccccccatgtccgtggAACACGcAGACATCgggtcaAGAGCTACAGCTGtaCTCCAGGGAGCGGTACATTGtaA

CTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCTGAGGTGCGTGTGAACAAGGCCACGAATGCGCCACTGGACAACCCCC

cagtctcaaATGtattaga-

[0238] (*IgG1 CH2-CH3(Fc 도메인)*)

gagccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacatgtgggtcaagAGCTACAGCTGtaCTCCCTGGGGACCGTCAGTCTCCCTGGGG

aaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgagggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgagggtc

aagtcaactggtagcggacggcgiggagggtcaataatgccaAGACAAAGCCGGGGAGGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG

tggtagcgtccctaccgtctgcaccaggactggctgaaGGCAAGGGTACAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCC

ccatcgagaaaaccatctcaaAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGAGTACACCCTGCCCATCCGGGATGAGCTGAC

caAGAACCCAGGGTCAAGCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCGACGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGG

AGAACAAACTACAAGGACACGCGCTCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCCCTCACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT

GGCAGCAGGGGAACGTCTCTGATGCAAGGGCTGAGCACAACCAACTACACGCGAGAGCCTCTCCGTCTCCGGG

taaa-

[0239] (정지 코돈)

[0240] taa

[0241] 예시적인 IL-15R α Su/Fc 아미노산 서열이 (리더 웹타이드와 함께) 아래에 제공된다(SEQ ID NO: 5):

[0242] (리더 웹타이드)

[0243] MDRLTSSFLLLIVPAYVLS-

[0244] (*IL-15R α Su*)

ITCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT

[0245] TPSLKCI-

[0246] (*IgG1 CH2-CH3(Fc 도메인)*)

EPKSCDKTHTCPGPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

KFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA

LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL

[0247] SLSPGK

[0248] 일부 경우에, 성숙 IL-15R α Su/Fc 단백질은 리더 서열(SEQ ID NO: 6)을 결여한다:

[0249] (*IL-15R α Su*)

ITCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT

[0250] TPSLKCI-

[0255]

(IgG1 CH2-CH3(Fc 도메인))

EPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEPVE
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCVMHEALHNHYTQKSL

SLSPGK

[0256]

[0257]

항-CD38 Ab와 조합된 ALT-803이 암 세포에 대한 세포-매개 세포독성에 영향을 줄 수 있는지를 평가하기 위해, 혈액 버피 코트(buffy coat)로부터 단리된 인간 PBMC를 이펙터 세포로서 사용하였다. Daudi 인간 B-세포 림프종 세포를 표적 세포로 사용하고, 이를 제조업체에 의해 설명된 바와 같이 RPMI-10(RPMI-1640, 2-미캡토에탄올, 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 비필수 아미노산, 피루브산나트륨, 및 10% 소 태아 혈청) 중의 5 μ M의 셀트레이스 바이올렛으로 37°C에서 20분 동안 표지하였다. 이펙터 세포를 5:1의 비로 바이올렛-표지 표적 종양 세포와 혼합하고, ALT-803의 존재 또는 부재 하에서 또는 항-CD38 Ab(다라투무맙)와 함께 RPMI-10 중에서 5% CO₂로 37°C에서 2일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 혼합물을 원심 분리에 의해 수거하고, 2 mg/ml의 프로피디움 요오다이드를 함유하는 RPMI-10에 재현탁시켰다. 표적 세포에 대한 이펙터 세포의 세포독성은 프로피디움 요오다이드 염색 후 사멸된 바이올렛-표지 표적 세포의 백분율을 결정함으로써 유세포 분석에 의해 평가하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 새로운 인간 PBMC는 ALT-803의 존재 하에서 Daudi 세포에 대해 약한 세포독성을 가졌다. 대조적으로, PBMC는 10 nM의 ALT-803의 존재 하에서 Daudi 종양 표적 세포에 대해 강한 세포독성을 가졌다. Daudi 종양 세포는 CD38 분자를 발현하며, 이는 항-CD38 Ab(다라투무맙)에 의해 인식될 수 있다. 인간 PBMC는 항-CD38 Ab 단독에 의해 매개된 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)에 의해 Daudi 세포를 용해시킬 수 있다(도 1). 중요하게도, ALT-803의 첨가는 Daudi 종양 세포에 대한 인간 PBMC의 항-CD38 Ab 매개된 ADCC 활성을 유의하게 증강시킬 수 있었다.

[0258]

Daudi 세포에 대한 인간 PBMC 세포독성의 ALT-803 농도 의존성 유도를 조사하였다. 새로운 인간 PBMC를 다양한 농도(1 nM 내지 25 nM)의 ALT-803 및 고정된 농도의 항-CD38 Ab(10 nM)를 갖는 RPMI-10 배지에서 셀트레이스 바이올렛 표지된 Daudi 세포와 혼합한 후, 2일 동안 인큐베이션하였다. 표적 세포에 대한 인간 PBMC의 세포독성은 상기 기재된 바와 같이 유세포 분석에 의해 평가하였다. 도 1의 결과와 일치하게, ALT-803은 1 nM의 낮은 농도에서 Daudi 세포에 대한 인간 PBMC의 항-CD38 Ab-매개 세포독성을 증강시킬 수 있었다(도 2a). 다양한 농도의 항-CD38 Ab(0.1 nM 내지 50 nM) 및 고정된 10 mM ALT-803을 사용하여 이 ADCC 검정에서 용량 반응 연구를 또한 수행하였다(도 2b). 증가된 Daudi 세포 사멸은 0.1 nM의 적은 항-CD38 Ab로 관찰되었고, 모든 Ab 농도에서, ALT-803의 첨가에 의해 종양 세포 사멸이 추가로 향상되었다.

[0259]

관찰된 표적 종양 세포 사멸을 담당하는 면역 이펙터 세포를 확인하기 위해, NK 세포를 MACS에 의해 인간 PBMC로부터 단리하고, 이를 상기 기재된 ADCC 검정에서 이펙터 세포로 사용하였다. 총 인간 PBMC를 사용한 결과와 유사하게, NK 세포는 ALT-803의 첨가에 의해 향상된 항-CD38 Ab-매개 ADCC 활성을 통해 Daudi 종양 세포를 사멸시킬 수 있었다(도 2c). 총 PBMC와 비교하여, ALT-803 + 항-CD38 Ab와 함께 인큐베이션된 NK 세포의 경우 종양 표적에 대한 더 큰 세포독성이 관찰되었다.

[0260]

실시예 2: 혈액 종양을 보유한 마우스에서의 ALT-803 + 항-CD38 Ab 처리의 항종양 활성

[0261]

항-CD38 Ab의 항종양 효능을 증강시키는 ALT-803의 능력은 Daudi 종양을 보유한 SCID 마우스에서 추가로 평가하였다. 또한, ALT-803 + 항-CD38 Ab의 조합의 효과는 스테로이드에 의한 전처리 후에 종양 보유 마우스에서 평가하였다. 스테로이드는 주입 반응을 감소시키기 위해 항-CD38 Ab 요법과 함께 항염증제로서 일반적으로 사용된다. 그러나, 이들 스테로이드의 면역억제 효과가 또한 항-CD38 Ab 요법의 면역-매개 효능을 제한할 수 있다는 우려가 또한 존재한다. 이 연구를 위해, 폭스 채이스(Fox Chase) SCID 암컷 마우스(Harlan, C.B-17/IcrHsd-Prkdc-scid: 6주령)에 Daudi 세포(마우스당 10 \times 10⁶)를 정맥내(i.v.) 접종하였다(6마리 마우스/그룹). 이들 마우스는 종양에 대한 ADCC 반응을 매개할 가능성이 있는 기능성 NK 세포를 갖는다. 일부 그룹에서, 종양-보유 마우스는 PBS 또는 항-CD38 Ab(0.2 mg/kg)로 i.v. 처리하기 1시간 전에 스테로이드(하이드로코르티손, 0.2 mg/마우스, 복강내)로 (종양 접종 후) 15일째에 또한 처리하였다. PBS 또는 항-CD38 Ab 처리 2 일 후인 17일째에, 처리 그룹에 따라 마우스를 ALT-803(0.2 mg/kg, 피하)으로 추가로 처리하였다. 항-CD38 Ab 처리 7일 후, 마우스를 회생시키고, 골수에서의 Daudi 세포의 수준을 결정하였다. 대퇴골 골수 세포 중의 Daudi 세포의 백분율은 PE-접합 항-인간 HLA-DR 항체(BioLegend)로 염색한 후 유세포 분석을 수행하여 평가하였다. 도

3에 도시된 바와 같이, ALT-803 및 항-CD38 Ab 단일요법은 종양-보유 마우스의 골수 중의 Daudi 세포의 백분율을 감소시킬 수 있다. 그러나, ALT-803 + 항-CD38 Ab의 조합은 대조 마우스에서의 62%로부터 ALT-803 + 항-CD38 Ab 처리된 마우스에서의 10%로 골수 Daudi 세포를 감소시키는 가장 큰 항종양 활성을 제공하였다. 이 향상 효능은 ALT-803 + 항-CD38 Ab 요법 전에 스테로이드로 처리된 종양-보유 마우스에서 또한 관찰되었다. 실제로, 스테로이드로 전처리하거나 전처리하지 않은 ALT-803 + 항-CD38 Ab 처리된 마우스에서 유사한 항종양 활성이 관찰되었다.

[0262] 실시예 3. 항-CD38 Ab와 조합된 ALT-803은 혈액 종양을 보유한 마우스의 생존을 연장시킨다

Daudi 종양을 보유한 마우스의 생존을 연장시키는 ALT-803 + 항-CD38 Ab의 능력을 또한 평가하였다. 이 연구를 위해, 폭스 체이스 SCID 암컷 마우스에 Daudi 세포(마우스 당 10×10^6)를 정맥내(i.v.) 접종하였다. 15일 후, 종양-보유 마우스를 PBS 또는 및 항-CD38 Ab(10 mg/kg , i.v.)로 처리하였다. PBS 처리된 마우스를 제외한 모든 마우스를 스테로이드(하이드로코르티손, $0.2 \text{ mg}/\text{마우스}$, 복강내)로 전처리하여 주입 반응을 감소시켰다. 17일째에, ALT-803 그룹과 항-CD38 Ab와 조합된 ALT-803 그룹의 마우스를 ALT-803(0.2 mg/kg , 피하)으로 처리하였다. 22일째에, ALT-803 그룹, 항-CD38 Ab 그룹 및 항-CD38 Ab와 조합된 ALT-803 그룹을 15일째 및 17일째 와 유사하게 처리하였다. 마우스의 생존(뒷다리 마비에 기초한 이환율 포함함)을 모니터링하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, PBS, ALT-803 및 항-CD38 Ab 단일요법으로 처리된 종양 보유 마우스 그룹들은 31일 내지 41일의 생존 중앙값을 보인 반면, 항-CD38 Ab로 처리된 모든 종양-보유 마우스는 45일이 넘게 생존하였으며, 이는 조합 요법이 B 세포 럼프종을 보유하는 마우스의 생존을 유의하게 연장시킴을 나타낸다. 종합해 보면, 이를 결과는 생체내에서의 항-CD38 Ab와 조합된 ALT-803의 상승적 항종양 효과를 확인시켜 준다. 이들 결과는 스테로이드 전처리의 존재 하에서 관찰되었다.

[0264] 실시예 4. ALT-803-자극 NK 세포는 종양 세포에 대한 항-CD38 매개된 대식세포 활성을 향상시킨다

치료용 항체는 부분적으로 종양 세포에 대한 대식세포의 항체-의존성 세포성 식균(ADCP) 활성을 통해 항종양 활성을 매개할 수 있다.

대식세포 활성을 결과적으로 사이토카인 및 다른 면역 이팩터 세포에 의해 방출되는 다른 작용제에 의해 자극될 수 있다. 대식세포의 항종양 활성에 영향을 미치는 ALT-803의 능력에 접근하기 위해, 본 발명자들은 인간 대식 세포 세포주 THP-1을 1차 이팩터 세포로, 인간 NK-92 세포주(NK 세포주)를 2차 이팩터 세포로, 그리고 Daudi 세포를 표적 종양 세포로 사용하여 유세포 분석 기반 식균 작용 검정을 마련하였다. 이 연구에서, 트랜스웰(Transwell™) 시스템을 사용하여 THP-1 및 Daudi 세포로부터 NK-92 세포(aNK 세포)를 분리했다. NK-92 세포(1×10^5)는 트랜스웰 삽입물(Corning)의 상단 웰에서 배양한 반면, THP-1 세포(1×10^5)(제작된 프로토콜에 따라 PKH67로 표지됨-Sigma) 및 Daudi 세포(1×10^5)(제작된 프로토콜에 따라 셀트레이스 바이올렛으로 표지됨-Molecular Probes)는 24 웰 플레이트의 바닥 웰에서 배양하였다. 각각의 웰에서 1 ml 의 총 부피로 배지 단독 또는 10 nM ALT-803, 10 nM 항-CD38 Ab, 또는 10 nM ALT-803 + 10 nM 항-CD38 Ab를 함유하는 배지로 세포를 처리하였다. 24시간 후, THP-1 및 Daudi 세포를 원심분리에 의해 수거하고, PKH67 및 셀트레이스 바이올렛으로 표지된 세포의 백분율을 결정함으로써 식균 작용을 평가하기 위해 유세포-분석기용 완충액에 재현탁시켰다(대표적인 유세포 분석 플롯은 도 5에 도시됨). 그러한 이중 양성 세포는 셀트레이스 바이올렛-표지 Daudi 세포를 식균한 PKH67-표지 THP-1 대식세포를 나타낸다. ALT-803 + 항-CD38 Ab의 조합은, ALT-803 또는 항-CD38 Ab 단독과 함께 인큐베이션된 세포와 비교할 때, PKH67⁺ 셀트레이스 바이올렛⁺ 세포의 백분율 증가에 의해 나타난 바와 같이 (도 5), 종양 세포의 대식세포-매개 식균 작용을 증가시켰다. 이 향상된 활성은 NK 세포 및 ALT-803의 존재에 좌우되었으며, 이는 NK 세포의 ALT-803-의존성 활성화가 질병 세포, 예를 들어 종양 세포의 Ab-유도 대식세포 식균 작용의 자극을 가져온다는 것을 시사한다.

[0267] 다른 구현예

본 발명은 그의 상세한 설명과 함께 기술되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위의 범주에 의해 규정되는 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 것이며 이를 제한하고자 하는 것이 아니다. 다른 양태, 이점, 및 변형은 하기 청구범위의 범주에 속한다.

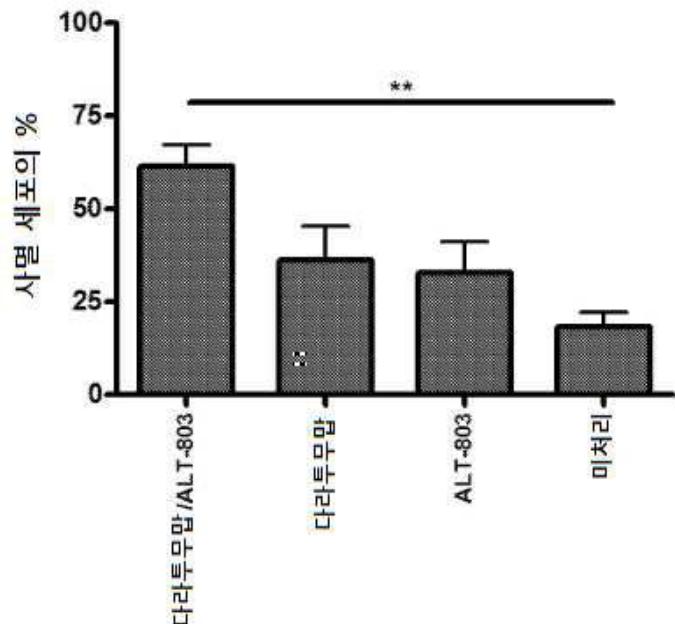
본원에 언급된 특허 및 학술 문헌은 당업자에게 이용 가능한 지식을 확립한다. 본원에 인용된 모든 미국 특허 및 공개 또는 미공개 미국 특허 출원은 참고로 포함된다. 본원에 인용된 모든 공개 외국 특허 및 특허 출원은 본원에 참고로 포함된다. 본원에 인용된 수탁 번호로 표시된 젠뱅크 및 NCBI 제출물은 본원에 참고로 포함된다.

본원에 인용된 다른 모든 공개된 참고 문헌, 문서, 원고 및 학술 문헌은 본원에 참고로 포함된다.

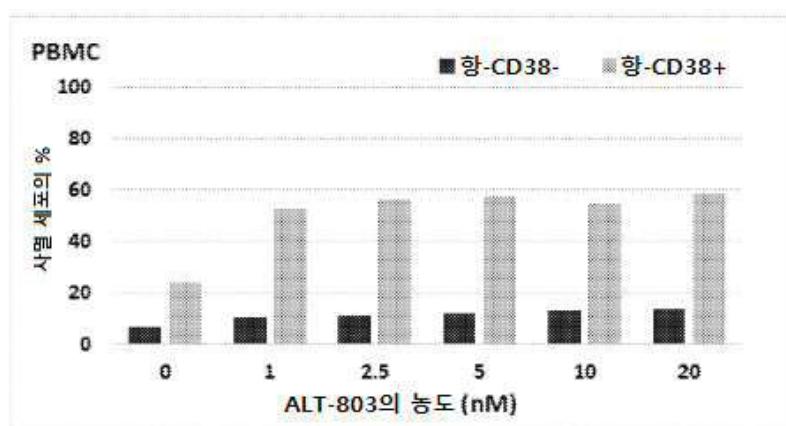
[0270] 본 발명이 그의 바람직한 구현예를 참조로 특별히 제시되고 설명되었지만, 당업자는 첨부된 청구범위에 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부 사항의 다양한 변화가 그 안에서 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

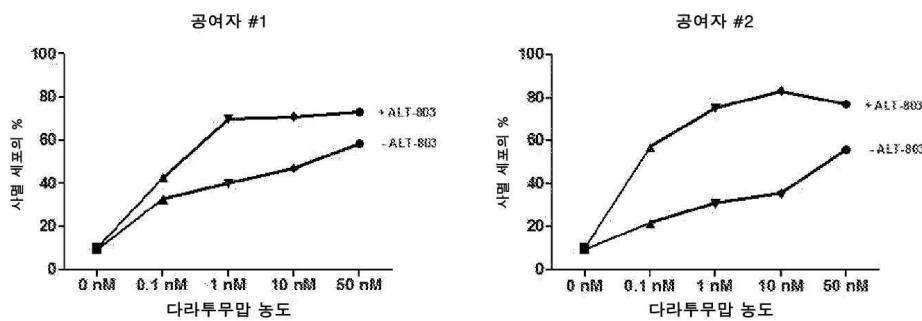
도면1



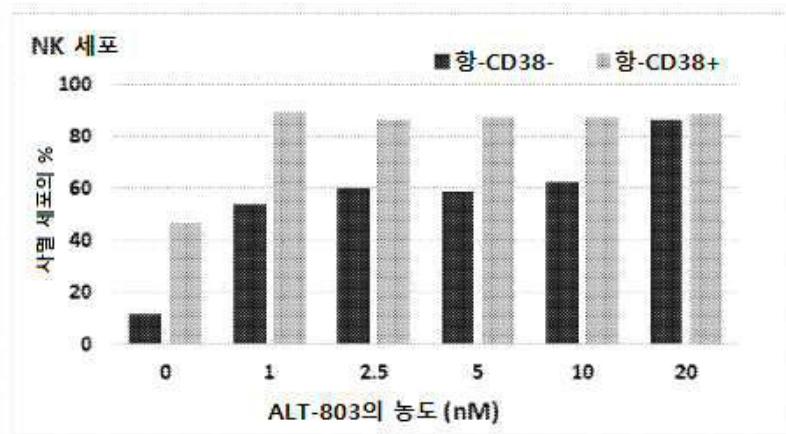
도면2a



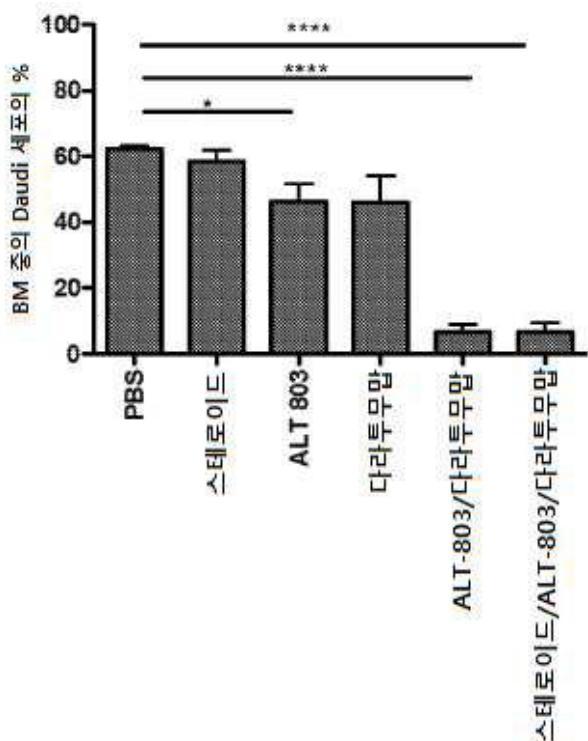
도면2b



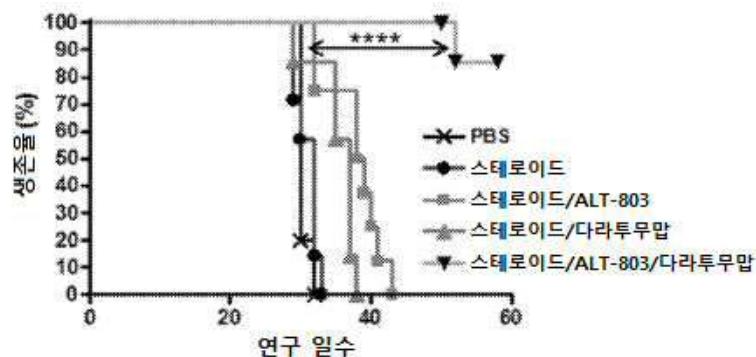
도면2c



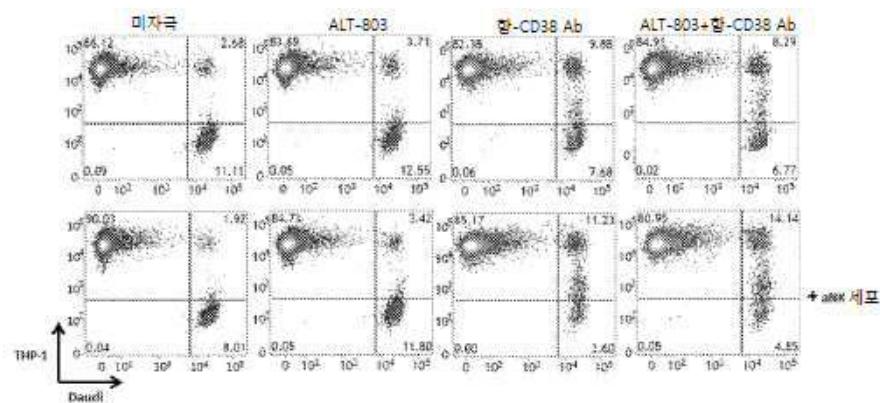
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION

<120> ALT-803 IN COMBINATION WITH ANTI-CD38 ANTIBODY FOR CANCER

THERAPIES

<130> 048277-531001WO

<140> PCT/US2018/025366

<141> 2018-03-30

<150> 15/937,493

<151> 2018-03-27

<150> 62/480,339

<151> 2017-03-31

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

atggagacag acacactcct gttatggta ctgctgctct gggttcagg ttccaccggt	60
aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat	120
attgatgcta ctttatatac ggaaagtgtat gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg	180
aagtgcattc tcttggagtt acaagttatt tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat	240
gatacagtag aaaatctgtat catcctagca aacgacagtt tgtcttctaa tggaatgtat	300
acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg	360
cagagtttg tacatattgt ccaaatttttc atcaacactt cttaa	405

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 2

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

50	55	60	
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His			
65	70	75	80
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser			
85	90	95	
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Leu Glu			

100 105 110

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln

115 120 125

Met Phe Ile Asn Thr Ser

130

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His

20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val

65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Asn Ile

85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

100 105 110

Thr Ser

<210> 4

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

atggacagac ttacttcttc attccctgctc ctgatgtcc ctgcgtacgt cttgtccatc	60
acgtgccctc cccccatgtc cgtggAACAC gcagacatct gggtaAGAG ctacagcttg	120
tactccaggg agcggtacat ttgttaactct gtttcaagc gtaaAGCCGG cacgtccagc	180

ctgacggagt gcgtgtgaa caaggccacg aatgtcgccc actggacaac ccccgagtctc	240
aaatgtatta gagagccaa atcttgtac aaaactcaca catgccacc gtgccagca	300
cctgaactcc tgggggacc gtcagtcttc ctctcccccaaaaacccaa ggacaccctc	360
atgatctccc ggacctctga ggtcacatgc gtgggtgg acgtgagcca cgaagaccct	420
gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtgc ataatgcca gacaaagccg	480
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag	540
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggcttcca acaaagccct cccagcccc	600

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg	660
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc	720
ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	780
aagaccacgc ctccctgtct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc	840
gtggacaaga gcagggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	900
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cggtaataa a	951

<210> 5

<211> 316

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Leu Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp

20	25	30
----	----	----

Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys

35	40	45
----	----	----

Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys

50	55	60
Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu		
65	70	75
Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
85	90	95
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
100	105	110
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
115	120	125
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
130	135	140
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
145	150	155
160		
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
165	170	175
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
180	185	190
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
195	200	205
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
210	215	220
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
225	230	235
240		
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
245	250	255
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
260	265	270
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
275	280	285
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		

290	295	300
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
305	310	315
<210> 6		
<211> 297		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide		
<400> 6		
Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val		
1	5	10
Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly		
20	25	30
Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn		
35	40	45
Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile		
50	55	60
Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
65	70	75
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
85	90	95
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
100	105	110
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Phe Asn Trp Tyr		
115	120	125
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
130	135	140
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
145	150	155
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		

165	170	175	
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
180	185	190	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu			
195	200	205	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
210	215	220	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
225	230	235	240
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
245	250	255	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
260	265	270	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
275	280	285	
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
290	295		