(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004916
(43) 공개일자 2025년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2025.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
C07K 14/54 (2024.01) *C07K 14/55* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2025.01)
A61K 38/1793 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7040181(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년09월07일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7010150
원출원일자(국제) 2016년09월07일
심사청구일자 2021년09월07일
(85) 번역문제출일자 2024년12월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/050511
(87) 국제공개번호 WO 2017/044464
국제공개일자 2017년03월16일
(30) 우선권주장
62/217,364 2015년09월11일 미국(US)
62/375,089 2016년08월15일 미국(US)

(71) 출원인
더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 쥬니어 유니버시티
미국 캘리포니아 94305-2038 스탠포드 피오박스 20386 메인 쿼드 오피스 오브 더 제너럴 카운셀 빌딩170 3층
유니버시티 오브 워싱톤
미국 워싱턴 98195 시애틀 노쓰이스트 캠퍼스 파크웨이 1100 스위트 200
(72) 발명자
가르시아 케난 크리스토퍼
미국 캘리포니아 94025 멘로 파크 켄우드 드라이브 580
소콜로스키 조나단
미국 캘리포니아 94114 샌프란시스코 그랜드 뷰 애비뉴 669 아파트먼트 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

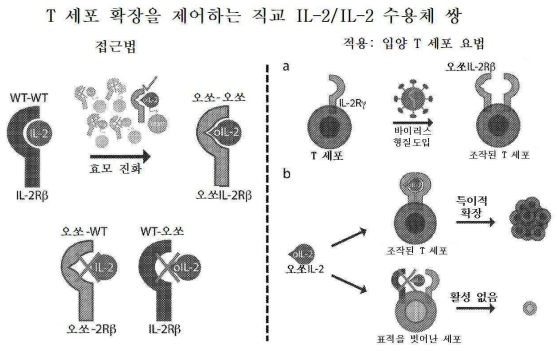
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **생물학적으로 관련된 직교 사이토카인/수용체 쌍**

(57) 요 약

조작된 직교 사이토카인 수용체/리간드 쌍, 및 이의 사용 방법이 제공된다. 구체적으로, 개시내용은 세포에서 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템으로서, 시스템이 (a) 이의 천연 리간드에 결합하지 않는 직교 수용체; 및 (b) (i) 이의 천연 수용체에 결합하지 않고 (ii) 상기 직교 수용체에 결합하고 이를 활성화시키는 직교 사이토카인을 포함하는, 시스템을 제공한다. 치료 질병에 대한 조작된 세포 집단의 사용 방법이 추가로 개시된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/2013 (2013.01)
A61K 38/2086 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 14/55 (2013.01)
C12N 5/0636 (2025.01)
C12N 5/0638 (2025.01)
(72) 발명자
베이커 데이비드
미국 워싱턴 98105 시애틀 스위트 400 루즈벨트 웨이 노쓰이스트 4545 유니버시티 오브 워싱턴 내
킹 크리스
미국 워싱턴 98105 시애틀 스위트 400 루즈벨트 웨이 노쓰이스트 4545 유니버시티 오브 워싱턴 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포에서 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템으로서,

(a) 천연 리간드에 결합하지 않는 직교 수용체; 및

(b) (i) 천연 수용체에 결합하지 않고 (ii) 상기 직교 수용체에 결합하고 이를 활성화시키는 직교 사이토카인을 포함하는, 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 직교 수용체가 포유동물 세포에 의해 발현되는, 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 세포가 면역 세포 또는 줄기 세포인, 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 면역 세포가 T 세포인, 시스템.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 인간 또는 마우스 세포인, 시스템.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 직교 수용체 및 직교 사이토카인이 인간 또는 마우스 단백질로부터 유래되는, 시스템.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 직교 수용체가 IL-2 수용체인, 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 IL-2 수용체가 IL-2Rβ인, 시스템.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 오쏠로그 사이토카인이 IL-2인, 시스템.

청구항 10

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 사이토카인이 IL-15인, 시스템.

청구항 11

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 IL-2 수용체가 R41, R42, Q70, K71, T73, T74, V75, S132, H133, Y134, F135, E136, Q214로부터 선택된 하나 이상의 잔기에서 변형된 인간 CD122인, 시스템.

청구항 12

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 IL-2 수용체가 R42, F67, Q71, S72, T74, S75, V76, S133, H134, Y135, I136, E137, R215로부터 선택된 하나 이상의 잔기에서 변형된 마우스 CD122인, 시스템.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 오쏠로그 IL-2가 Q13, L14, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, G27, 및 N88로부터 선택된 하나 이상의 잔기에서 변형된 인간 IL-2인, 시스템.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 인간 IL-2가 E15, H16, L19, D20, Q22, 및 M23으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에서 변형되는, 시스템.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 오쏠로그 IL-2가 H27, L28, E29, Q30, M33, D34, Q36, E37, R41, 및 N103로부터 선택된 하나 이상의 잔기에서 변형된 마우스 IL-2인, 시스템.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 마우스 IL-2가 E29, Q30, M33, D34, Q36, 및 E37로부터 선택된 하나 이상의 잔기에서 변형되는, 시스템.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 오쏠로그 사이토카인 수용체를 포함하는 조성물.

청구항 18

제17항의 오쏠로그 수용체를 인코딩하는 핵산.

청구항 19

제18항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 20

제19항의 벡터를 포함하도록 유전적으로 조작된 세포.

청구항 21

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 오쏠로그 사이토카인을 포함하는 조성물.

청구항 22

제21항의 오쏠로그 사이토카인을 인코딩하는 핵산.

청구항 23

제22항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 24

제23항의 벡터를 포함하도록 유전적으로 조작된 세포.

청구항 25

개체를 치료하는 방법으로서, 제20항에 따른 세포를 상기 개체에게 도입하는 것, 및 제21항에 따른 오쏠로그 사이토카인과 접촉시킴으로써 상기 오쏠로그 수용체에 따른 상기 세포를 선택적으로 활성화시키는 단계를 포함하는, 개체를 치료하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 세포가 T 세포인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 개체가 암에 대하여 치료되는, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 개체가 자가면역 질환에 대하여 치료되는, 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 개체가 감염에 대하여 치료되는, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 시스템을 포함하는 키트.

청구항 31

제30항에 있어서, 제18항 또는 제19항의 벡터 또는 핵산, 및 제21항에 따른 사이토카인 조성물을 포함하는, 키트.

청구항 32

하기 단계들을 포함하는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 시스템을 수득하는 방법:

천연 사이토카인에 대한 결합을 방해하도록 천연 수용체 내로 아미노산 변화를 조작하는 단계;

수용체 결합을 위한 접촉 잔기에서 천연 사이토카인 내로 아미노산 변화를 조작하는 단계,

상기 오쏠로그 수용체에 결합하는 사이토카인 오쏠로그를 선택하는 단계;

상기 천연 수용체에 결합하는 오쏠로그 사이토카인을 제거하는 단계.

청구항 33

하기 단계들을 포함하는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 시스템을 수득하는 방법:

천연 사이토카인에 대한 결합을 방해하도록 천연 수용체 내로 아미노산 변화를 조작하는 단계;

수용체 결합에 대한 접촉 잔기에서 상기 천연 사이토카인 내로 아미노산 변화를 조작하는 단계,

상기 오쏠로그 사이토카인에 결합하는 수용체 오쏠로그를 선택하는 단계;

상기 천연 사이토카인에 결합하는 오쏠로그 수용체를 제거하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 9월 11일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/217,364호, 및 2016년 8월 15일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/375,089호의 이득을 청구하고, 상기 출원은 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0003] 연방정부 지원 연구 및 개발

[0004] 본 발명은 국립보건원에 의해 수여된 계약 AI513210하의 정부 지원으로 만들어졌다. 정부는 본 발명에 대하여 특정한 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0005] 분화하는 세포, 특히 면역 세포의 조작은 특화된 기능을 개발하고, 수적 증가는 큰 임상적 흥미가 있다. 특정한 사이토카인 및 케모카인을 포함하여 이들 활성에 영향을 미치는 많은 단백질 인자는 당해 분야에 공지되어 있다. 그러나, 이들 신호전달 분자는 또한 조작에 대하여 표적화되지 않은 세포에 다면발현성 효과(pleiotropic effect)를 갖고, 따라서 표적화된 세포 집단에서 신호전달을 선택적으로 활성화하는 방법이 바람직하다. 특히, 제어된 행동을 수행하는 T 세포의 조작이 흥미롭다. 예를 들면, 입양 면역요법에서 T 세포는 혈액으로부터 단리되고, 생체외 가공되며, 환자에게 재주입된다. T 세포는 암 세포, 세포내 병원체 및 자가면역과 연관된 세포의

인식 및 살해와 같은 치료적 응용분야에서 사용을 위하여 조작되어 왔다.

[0006] 세포 기반 요법의 임상적 도전은 입양으로 도입된 세포 내로 목적하는 행동, 예를 들면, 활성화, 확장 등을 조작하는 것이고, 이는 내인성 신호전달 경로로부터 보호되고, 비표적화 내인성 세포에 영향을 미치지 않으며, 환자에게 일단 투여된 후 제어될 수 있다. 이는 T 세포 운명, 기능, 및 국소화를 결정하는데 역할을 하는 환경적 인자에 대한 개발 가소성 및 엄청난 영향 때문에 특히 T 세포 조작과 관련이 있다.

[0007] 단백질을 변형된 리간드에, 천연 단백질(native protein) 또는 리간드의 영향으로부터, 독립적이거나 또는 직교인 방식으로 결합하고 반응하도록 조작하는 능력은 단백질 조작의 유의미한 도전을 구성한다. 이제까지, 다수의 합성 리간드-오쏠로그(ortholog) 수용체 쌍은 유사한 자연적인 상호작용에 직교로 생성되었다. 이러한 작업에 사용된 단백질 중에, 핵 호르몬 수용체 및 G-단백질 커플링된 수용체가 포함된다. 합성 소분자 리간드에 의해 활성화되는 수용체를 조작하는 광범위한 작업이 수행되었음에도 불구하고, 생물학적 관련 단백질 쌍의 조작은 유의미한 도전으로 남아 있다.

발명의 내용

[0008] 조작된 직교 사이토카인 수용체/리간드 쌍, 및 이의 사용 방법이 제공된다. 조작된(직교) 사이토카인은 대응물 조작된(직교) 수용체에 특이적으로 결합한다. 결합 하에서, 직교 수용체는 천연 세포 요소를 통해 형질도입되어 천연 반응을 모사하는 생물학적 활성을 제공하지만 직교 수용체를 발현하는 조작된 세포에 특이적인 신호전달을 활성화시킨다. 직교 수용체는 직교 사이토카인의 천연 대응물을 포함하는 내인성 대응물 사이토카인에 결합하지 않고, 직교 사이토카인은 직교 수용체의 천연 대응물을 포함하는 임의의 내인성 수용체에 결합하지 않는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 직교 수용체에 대한 직교 사이토카인의 친화력은 천연 수용체에 대한 천연 사이토카인의 친화력과 비슷하다.

[0009] 직교 사이토카인 수용체 쌍의 조작 방법은 (a) 천연 수용체 내의 아미노산 변화를 조작하여 천연 사이토카인에의 결합을 방해하는 단계; (b) 수용체 결합을 위한 접촉 잔기에서 천연 사이토카인 내의 아미노산 변화를 조작하는 단계, (c) 오쏠로그 수용체에 결합하는 사이토카인 오쏠로그를 선택하는 단계; (d) 천연 수용체에 결합하는 오쏠로그 사이토카인을 제거하는 단계, 또는 대안적으로 단계 (c) 및 (d); (e) 오쏠로그 사이토카인에 결합하는 수용체 오쏠로그를 선택하는 단계; (f) 천연 사이토카인에 결합하는 오쏠로그 수용체를 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 사이토카인/수용체 복합체의 구조의 지식은 부위-지정 또는 오류 유발 돌연변이 생성을 위하여 아미노산 위치를 선택하는데 사용된다. 다른 디스플레이 및 선택 방법이 또한 유용하지만, 통상적으로 효모 디스플레이 시스템을 선택 공정을 위하여 사용할 수 있다.

[0010] 몇몇 실시형태에 있어서, 세포가 본 발명의 오쏠로그 수용체의 도입에 의해 변형된, 조작된 세포가 제공된다. 이러한 목적을 위하여 임의의 세포가 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 세포는, 제한 없이, 미경험(naive) $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들면, T_H1, T_H2, T_H9, T_H11, T_H22, T_{FH}; 조절 T 세포, 예를 들면, T_R1, 천연 T_{Reg}, 유도 T_{Reg}; 기억 T 세포, 예를 들면, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포, NKT 세포, γδ T 세포 등을 포함하는 T 세포이다. 다른 실시형태에 있어서, 조작된 세포는 줄기 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포, NK 세포, 대식세포, 또는 수지상 세포이다. 몇몇 실시형태에 있어서 세포는 대상체에게 도입되기 전에 생체외 절차로 유전적으로 변형된다. 조작된 세포는 요법을 위한 단위 용량으로 제공될 수 있고, 의도된 수용자에 관하여 동종이계, 자가유래 등일 수 있다.

[0011] 몇몇 실시형태에 있어서 직교 수용체를 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 벡터가 제공되고, 여기서 코딩 서열은 목적하는 세포에서 프로모터 활성에 작동적으로 연결된다. 다양한 벡터, 예를 들면, 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 미니서클 벡터가 당해 분야에 공지되어 있으며 이러한 목적을 위하여 사용될 수 있고, 이러한 벡터는 표적 세포 게놈 내로 통합될 수 있거나, 에피솜적으로 유지될 수 있다. 수용체 인코딩 벡터는 수용체에 결합하고 이를 활성화시키는 오쏠로그 사이토카인을 인코딩하는 벡터와 조합되어 키트로 제공될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 오쏠로그 사이토카인에 대한 코딩 서열은 고발현 프로모터에 작동적으로 연결되고, 생산을 위하여 최적화될 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 키트는 환자에게 투여를 위하여 포장된, 오쏠로그 수용체를 인코딩하는 벡터가 오쏠로그 사이토카인의 정제된 조성물로, 예를 들면, 단위 용량으로, 제공되도록 제공된다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, 키트는 오쏠로그 수용체를 인코딩하는 벡터가 동일한 세포가 자가분비 직교 사이토카인-수용체 신호전달을 가능하게 함으로써, 세포에서 오쏠로그 수용체의 발현 및 또한 분비를 위하여 의도된 오쏠로그 사이토카인의 발현을 가능하게 하도록 제공된다.

[0012] 몇몇 실시형태에 있어서 치료 방법이 제공되고, 방법은 이를 필요로 하는 수용자에게 조작된 세포 집단을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 세포 집단은 본 발명의 오쏠로그 수용체를 인코딩하는 서열의 도입에 의해 변형되었다. 세포 집단은 생체외 조작될 수 있고, 일반적으로 수용체에 관하여 자가유래 또는 동종이계이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 조작된 세포의 투여 후, 도입된 세포 집단은 동족 오쏠로그 사이토카인과 생체내 접촉한다. 본 발명의 이점은 오쏠로그 사이토카인과 천연 수용체 사이의 교차-반응성이 없다는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 본 발명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 하기 상세한 설명으로부터 가장 잘 이해된다. 일반적인 실시에 따라, 도면의 다양한 특징부는 일정한 비율이 아닌 것이 강조된다. 그와는 반대로, 다양한 특징부의 치수는 명확성을 위하여 임의적으로 확대되거나 감소된다. 도면에 포함된 것은 하기 도면이다.

도 1. T 세포 확장을 제어하는 직교 IL-2/IL-2 수용체 쌍.

도 2. 직교 IL-2/IL-2Rβ 쌍을 조작하기 위한 작업 흐름도.

도 3. 직교 마우스 IL-2Rβ 변이체의 서열.

도 4. mIL-2Rβ H134D Y135F 돌연변이는 wt mIL-2 결합을 폐기한다.

도 5. 직교 IL-2/IL-2Rβ 쌍을 조작하는 작업 흐름도.

도 6. 특성화된 직교 마우스 IL-2 변이체의 서열.

도 7. 오쏘IL-2 변이체는 야생형 IL-2와 IL-2Rβ의 상호작용과 유사하거나 그보다 큰 친화력으로 오쏘IL-2Rβ에 결합한다.

도 8. 오쏘IL-2 변이체는 야생형 CD25 양성 및 CD25 음성 비장세포에 대하여 약화된 활성(포스포STAT5)을 나타낸다.

도 9. 오쏘IL-2R 발현 마우스 CTLL-2 T 세포의 생성.

도 10. 오쏘IL-2 변이체의 제1 세트는 오쏘 T 세포에 대하여 선택적이다.

도 11. 오쏘IL-2 변이체는 오쏘IL-2Rβ 발현 CTLL-2 세포 상에서 선택적 STAT5 인산화를 유도한다.

도 12. 오쏘IL-2Rβ(H134D Y135F)를 발현하도록 조작된 일차 림프절 유래 T 세포.

도 13. 오쏘IL-2 변이체는 오쏘IL-2Rβ 발현 일차 마우스 T 세포 상에서 선택적 STAT5 인산화를 유도한다.

도 14. 오쏘IL-2 변이체는 야생형 T 세포와 비교하여 오쏘IL-2Rβ 발현 CTLL-2 세포의 선택적 세포 성장을 유도한다.

도 15. 마우스 및 인간 참조 IL-2Rβ/IL-2 서열의 정렬.

도 16. 직교 인간 IL-2 쌍의 효모 진화. (a) 야생형(청색 히스토그램)에 결합하지만 오쏘(적색 히스토그램) 인간 IL-2Rβ H133D Y134F 돌연변이 사량체에 결합하지 않는 효모-디스플레이 야생형 인간 IL-2의 FACS 분석. (b) 효모의 표면 상에 나타난 인간 IL-2Rβ HY 돌연변이에 가깝거나 접촉할 것으로 예측되는 IL-2 잔기를 무작위화하는 인간 IL-2 돌연변이(~1^{8} 돌연변이)의 라이브러리. 양성(오쏘 hIL-2Rβ에 대항함) 및 음성(야생형 hIL-2Rβ에 대항함) 선택 둘 다의 연속된 라운드 후, 본 발명자들은 오쏘(적색 히스토그램)에 결합하지만 야생형(청색 히스토그램) 인간 IL-2Rβ 사량체에는 결합하지 않는 효모-나타난 인간 IL-2 돌연변이를 수득하였다. (c,d) 오쏘 hIL-2 돌연변이를 후속적으로 단리하고, 효모 라이브러리로부터 시퀀싱하였다. 돌연변이의 공통 세트는 오쏘 hIL-2Rβ에 결합할 수 있는 오쏘 hIL-2 서열의 집합을 나타내는 것으로 확인되었다.

도 17. 마우스에서 직교 IL-2Rb 발현 T 세포의 선택적 확장 또는 증가된 생존을 입증하는데 사용된 생체내 마우스 모델. 공여자 세포를 CD45.2를 발현하는 야생형 C57BL/6J 마우스의 비장으로부터 단리하고, CD3/CD28에 의해 생체외 활성화시키고, 레트로바이러스 인코딩 직교 IL-2Rb-IRES-YFP로 형질도입하고, 2일 동안 100 IU/mL mIL-2 중에서 확장시키고, 마우스 CD8 T 세포 단리 키트(Miltenyi)를 사용하여 정제하였다. 야생형(CD45.2 양성, YFP 음성)과 직교 IL-2Rb 발현 T 세포(CD45.2 양성, YFP 양성)의 n ~ 1:1 혼합물을 수용자 BL6.$Rag^{2-/-}$ x $IL2rg^{-/-}$ CD45.1 마우스 내로 레트로-오비탈 주사를 통해 입양 도입하였다. PBS, 야생형 mIL-2(150,000IU/마우스), 또는 오쏘IL-2 클론 1G12/149(1,000,000IU/마우스)를 T 세포 도입(d0) 직후 시작하여 연속 5일 동안(d4까지) 24 hr

간격으로 매일 IP 주사하였다. 마우스를 d5 및 d7에 희생시키고, 마우스의 혈액 및 비장에서의 총 공여자 T 세포 수를 유세포 분석기로 정량하였다.

도 18A 내지 도 18B. 수용자 마우스에서의 공여자 T 세포 확장을 정량하는데 사용된 게이팅(Gating) 전략. 마우스 혈액 및 비장으로부터의 단일 세포 현탁액을 준비하고, 공여자 T 세포의 확인을 위하여 CD45.2-퍼시픽 블루로 1 hr 동안 4C에서 염색하였다. 유세포 분석기 직전에, 세포를 생존/사망 배제를 위하여 요오드화프로피듐(PI)의 1:2000 희석과 함께 배양하였다. 세포를 정 및 측 스캐터(SSC-A v FSC-A), 싱글렛(FSC-A v FSC-H), 생세포(PI 음성)를 기반으로 게이팅하고, 야생형 T 세포(CD45.2 양성, YFP-음성) 및 직교 T 세포(CD45.2 양성, YFP-양성)의 총 수를 FACS를 통해 정량하였다. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$는 프리즘(Prism)을 사용하여 일원분산분석(one-way ANOVA)으로 측정하였다.

도 19. 오쏘IL-2 클론 1G12/149는 마우스에서 선택적으로 직교는 확장시키지만 야생형 T 세포는 확장시키지 않는다. 혈액(10^3세포/uL) 및 비장(비장당 세포의 총 수)에서 야생형 및 직교 T 세포의 수를 도 18에 기재된 바와 같이 유세포 부석기를 통해 정량하였다. 야생형 T 세포에 대한 직교 T 세포의 비는 혈액 및 비장에서 직교 T 세포의 총 수를 야생형 T 세포의 총 수로 나누어 결정하였다. 1을 초과하는 비는 직교 T 세포의 선택적 확장을 나타내고, 이는 오쏘IL-2 클론 1G12/149에 의해 달성된다. 제5일(상) 및 제7일(하)에서 혈액(좌) 및 비장(우)에서의 살아있는 세포의 총 수는 유세포 분석기를 통해 정량하였다. 야생형 IL-2에 의한 처리가 PBS 대조군에 비해 야생형 및 오쏘 T 세포 둘 다의 확장을 야기하는 반면, 오쏘IL-2 클론 1G12/149에 의한 처리는 야생형 T 세포에 대한 제한된 활성과 함께 오쏘 T 세포를 선택적으로 확장시킨다.

도 20. 직교 IL-2는 직교 IL-2Rβ T 세포에 대하여 선택적 활성을 갖는다. (a) IRES-YFP 리포터 및 IL-2Rβ에 대한 표면 염색을 사용하여 확인될 수 있는, IL-2 KO NOD 마우스로부터 단리되고 오쏘IL-2Rβ를 발현하도록 바이러스 형질도입된 일차, 비장 유래 마우스 T 세포의 FACS 분석. T 세포는 또한 야생형 IL-2Rβ의 발현을 보유한다. (b) 오쏘IL-2는 야생형 T 세포에 대하여 약화된 활성을 갖거나 활성이 없는 오쏘IL-2Rβ 발현 T 세포에 대한 선택적 STAT5 인산화를 유도한다.

도 21. 직교 IL-2는 시험관내에서 직교 IL-2Rβ T 세포를 선택적으로 확장시킨다. (a) IRES-YFP를 사용하여 확인될 수 있는, 오쏘IL-2Rβ를 발현하도록 바이러스 형질도입된 일차, 비장 유래 마우스 T 세포의 FACS 분석. 형질도입 및 비형질도입 T 세포의 혼합물을 5일 동안 다양한 농도의 야생형, 오쏘IL-2 클론 1G12, 또는 3A10 중에서 배양하고 FACS로 분석하였다. IL-2는 야생형 및 오쏘 T 세포 둘 다를 확장시키는 반면, 오직 오쏘 T 세포는 오쏘IL-2 3A10 중에 배양될 때 확장되고, 반면 오쏘IL-2 1G12는 야생형 T 세포에 대한 유의미하게 감소된 활성과 함께 오쏘 T 세포를 선택적으로 확장시킨다. FACS 플롯은 100 nM IL-2, 64 pM 오쏘IL-2 1G12, 및 10 uM 오쏘IL-2 3A10 중에서 배양에 상응하는 것을 보여준다. (b) 사이토카인의 농도 증가에서 배양 5일 후, 야생형 및 오쏘IL-2 클론 1G12 및 3A10에 대한 야생형 및 오쏘 T 세포 증식 용량-반응. IL-2는 야생형 및 오쏘 T 세포 둘 다를 동일한 강도로 확장시키고, 오쏘IL-2 1G12는 오쏘 T 세포를 선택적으로 확장시키고, 오쏘IL-2 3A10은 오쏘 T 세포를 특이적으로 확장시킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 개시내용을 더 용이하게 이해하기 위하여, 특정한 용어 및 구는 하기뿐만 아니라 명세서 전반에서 정의된다. 본 명세서에 제공된 정의는 비제한적이고, 당해 분야의 숙련가가 본 발명의 시기에 무엇을 알고 있을 것인지의 관점에서 이해되어야 한다.

[0015] 정의

[0016] 본 발명의 방법 및 조성물을 기재하기 전에, 본 발명은, 자체로서 물론 달라질 수 있기 때문에, 기재된 특정의 방법 또는 조성물로 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정의 실시형태를 기재하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 첨부된 특허청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 한정하는 것을 의도하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0017] 소정 범위의 값이 제공되는 경우, 본 명세서가 달리 명백히 지시하지 않는 한, 당해 범위의 상한치 및 하한치 사이의, 하한치 단위의 1/10까지의 각 중간 값이 또한 구체적으로 개시되어 있는 것으로 이해된다. 언급된 범위 내의 임의의 언급된 값 또는 중간 값 및 당해 언급된 범위 내의 임의의 기타 언급된 또는 중간 값 사이의 각각의 보다 작은 범위는 본 발명 내에 포함된다. 이들보다 작은 범위의 상한치 및 하한치는 당해 범위 내에 독립적으로 포함되거나 배제될 수 있고, 당해 한계치 중 어느 것도 보다 작은 범위에 포함되지 않거나 둘 다가 포함되

는 각 범위는 본 발명의 범위 내에 또한 포함되며, 언급된 범위내의 임의의 구체적으로 배제된 한계치에 적용된다. 언급된 범위가 당해 한계치 중의 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 이들 중의 어느 하나 또는 둘 다를 제외한 범위도 또한 본 발명에 포함된다.

[0018] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련가가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으나, 몇몇 가능한 및 바람직한 방법 및 재료가 이제 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 문헌은 당해 문헌이 인용되는 것과 관련하여 당해 방법 및/또는 재료를 개시 및 기재하기 위해 참조로서 본 명세서에 도입된다. 본 발명의 개시내용은 도입된 문헌의 임의의 개시내용을 부정하는 정도까지 대신하는 것으로 이해된다.

[0019] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는, 당해 문장이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "세포"에 대한 지시대상은 복수의 이러한 세포들을 포함하고, "펩타이드"에 대한 지시대상은 하나 이상의 펩타이드 및 이의 등가물, 예를 들면, 당해 분야의 숙련가에게 공지된 폴리펩타이드 등에 대한 지시대상을 포함한다.

[0020] 본 명세서에 언급된 문헌은 본 명세서의 출원일 전에 이들의 개시를 위해서만 제공된다. 본 명세서의 어떠한 것도 본 발명이 선행 발명에 비추어 이러한 문헌보다 선행하는 권한이 없는 것으로 해석되어야 한다. 추가로, 제공된 문헌의 일자는 독립적으로 확인하는데 필요할 수 있는 실제 공개 일자와 상이할 수 있다.

[0021] 사이토카인 수용체 및 리간드 쌍은, 제한 없이, 하기 수용체를 포함한다:

사이토카인	수용체 서브유닛
IL-1-유사	
IL-1α	CD121a, CDw121b
IL-1β	CD121a, CDw121b
IL-1RA	CD121a
IL-18	IL-18Rα, β
IL-2	CD25, 122, 132
IL-4	CD124, 213a13, 132
IL-7	CD127, 132
IL-9	IL-9R, CD132
IL-13	CD213a1, 213a2,
	CD1243, 132
IL-15	IL-15Ra, CD122, 132
IL-3	CD123, CDw131
IL-5	CDw125, 131
GM-CSF	CD116, CDw131
IL-6	CD126, 130
IL-11	IL-11Ra, CD130
G-CSF	CD114
IL-12	CD212
LIF	LIFR, CD130
OSM	OSMR, CD130
IL-10	CDw210
IL-20	IL-20Rα, β
IL-14	IL-14R
IL-16	CD4
IL-17	CDw217
IFN-α	CD118
IFN-β	CD118
IFN-γ	CDw119
CD154	CD40
LT-β	LTβR

[0022]

TNF-α	CD120a, b
TNF-β	CD120a, b
4-1BBL	CDw137(4-1BB)
APRIL	BCMA, TACI
CD70	CD27
CD153	CD30
CD178	CD95(Fas)
GITRL	GITR
LIGHT	LTbR, HVEM
OX40L	OX40
TALL-1	BCMA, TACI
TRAIL	TRAILR1-4
TWEAK	Apo3
TRANCE	RANK, OPG
TGF-β1	TGF-βR1
TGF-β2	TGF-βR2
TGF-β3	TGF-βR3
Epo	EpoR
Tpo	TpoR
Flt-3L	Flt-3
SCF	CD117
M-CSF	CD115
MSP	CDw136

[0023]

[0024] "오쏠로그", 또는 "오쏠로그 사이토카인/수용체 쌍"은 (a) 천연 사이토카인 또는 동족 수용체에 대한 결합이 부재하고, (b) 대응물 조작된(직교) 리간드 또는 수용체에 특이적으로 결합하는 아미노산 변화에 의해 변형된 단백질의 유전적으로 조작된 쌍을 의미한다. 결합 후, 직교 수용체는 천연 반응을 모사하지만 직교 수용체를 발현하는 조작된 세포에 특이적인 생물학적 활성을 제공하도록 천연 세포 구성요소를 통해 형질도입된 신호전달을 활성화시킨다. 직교 수용체는 직교 사이토카인의 천연 대응물을 포함하는 내인성 대응물 사이토카인에 결합하지 않고, 직교 사이토카인은 직교 수용체의 천연 대응물을 포함하는 임의의 내인성 수용체에 결합하지 않는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 직교 수용체에 대한 직교 사이토카인의 친화력은 천연 수용체에 대한 천연 사이토카인의 친화력과 비슷하고, 예를 들면, 천연 사이토카인 수용체 쌍 친화력의 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 25%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 100%이고, 더 높을 수 있고, 예를 들면, 천연 수용체에 대한 천연 사이토카인의 친화력의 2X, 3X, 4X, 5X, 10X 또는 그 이상의 친화력을 갖는다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "결합하지 않는다" 또는 "결합할 수 없는"은 검출 가능하지 않은 결합 또는 유의미하지 않은 결합, 즉, 천연 리간드의 것보다 훨씬 낮은 결합 친화력을 갖는 결합을 의미한다. 친화력은 다양한 농도의 표지화되지 않은 리간드의 존재 하에 수용체와 단일 농도의 표지화된 리간드의 결합을 측정하는 경쟁 결합 실험으로 측정될 수 있다. 전형적으로, 표지화되지 않은 리간드의 농도는 적어도 여섯 자릿수가 넘게 다양하다. 경쟁 결합 실험을 통해, IC_{50}가 측정될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "IC_{50}"은 수용체와 표지화된 리간드 사이의 회합의 50% 억제에 필요한 표지화되지 않은 리간드의 농도를 의미한다. IC_{50}은 리간드-수용체 결합 친화력의 지표이다. 낮은 IC_{50}은 높은 친화력을 나타내고, 높은 IC_{50}은 낮은 친화력을 나타낸다.

[0026] 인터류킨 2(IL-2)는 활성화된 $CD4^+$ T 세포에 의해 주로 생성되는 다능성 사이토카인이고, 정상 면역 반응을 생성하는데 중요한 역할을 한다. IL-2는 활성화된 T 림프구의 증식 및 확장을 촉진하고, B 세포 성장을 강화하고, 단핵구 및 자연 살해 세포를 활성화시킨다. 이들 활성 덕분에 IL-2는 시험되고 암의 승인된 치료(알데스류킨, 프로류킨(Proleukin)(등록상표))로서 사용된다. 진핵 세포에서 인간 IL-2는 153개의 아미노산의 전구체 폴리펩타이드로서 합성되고, 이로부터 20개의 아미노산이 제거되어 성숙 분비된 IL-2를 생성한다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "IL-2"는 천연, 또는 야생형 IL-2를 의미한다. 성숙 인간 IL-2는 문헌

[Fujita, et. al, PNAS USA, 80, 7437-7441(1983)]에 기재된 바와 같이 133개의 아미노산 서열(추가의 20개의 N-말단 아미노산으로 구성된 단일 펩타이드보다 작음)로서 발생한다. 인간 IL-2의 아미노산 서열은 등록 위치자 NP_000577.2 하에 젠뱅크(Genbank)에서 확인된다. 인간 및 마우스 IL-2 및 IL-2Rβ의 참조 서열은 도 15에 제공된다.

[0028] IL-2는 IL-2 수용체(IL-2R)와의 상호작용하에 세포 신호전달 경로를 개시함으로써 T 림프구의 생존 및 분화를 지지한다. IL-2는 암 및 자가면역을 포함하는 다수의 인간 질환을 치료하는데 임상적으로 사용되고, 이식된 T 세포의 생존을 촉진하기 위하여 입양 T 세포 요법에서 보조제로서 사용된다. 그러나, IL-2는 또한 표적 세포 유형의 활성화를 차단함으로써 대항 효과를 가질 수 있다. IL-2의 활성화가 특이적인 T 세포 서브세트를 향하도록 하기 위하여, 본 발명은 조작된 직교 IL-2 및 IL-2 수용체 쌍을 제공한다. 직교 IL-2는 직교 IL-2R베타를 발현하도록 조작된 T 세포의 강력한 STAT5 인산화 및 시험관내 증식을 유도함으로써 야생형 IL-2의 활성을 요약한다. 직교 IL-2는 각각 생체외 배양된 야생형 CD25 양성 또는 음성 마우스 T 세포 상에서 제한된 활성을 갖거나 활성을 갖지 않는다. 이들 연구는 자연에 존재하지 않는 상호작용을 생성하는 리모델링 사이토카인 수용체 인터페이스가 관심 대상 T 세포 서브세트에 대한 복잡한 사이토카인의 활성을 지시하고, 이로써 유전자 조작을 통해 T 세포 기능에 대한 정밀한 제어를 가능하게 하는 실용적인 전략이라는 것을 나타낸다.

[0029] IL-2 이외에, IL-15 및 IL-7은 또한 림프 항상성을 조절하고, 또한 입양 T 세포 요법을 강화하는 보조제로서 사용되어 왔다. IL-2 및 IL-15는 동일한 IL-2R-베타 사슬을 공유한다. 직교 IL-15는 IL-2를 직교화하는데 사용된 동일한 직교 IL-2R-베타에 대항하여 선택될 수 있다. IL-7은 직교화를 위한 표적인 별개의 IL-7R-알파 사슬을 이용한다.

[0030] 직교 IL-2는 예를 들면, 당해 분야에 공지된 바와 같은 페길화, 글리코실화 등에 의해 IgG, 알부민, 또는 다른 분자의 Fc 도메인에 융합되어 이의 반감기를 연장할 수 있다. Fc-융합은 또한 생체내에서 대안적인 Fc 수용체 매개된 성질을 부여할 수 있다. "Fc 영역"은 천연 발생하거나, 파파인에 의한 IgG 소화에 의해 생성된 IgG C-말단 도메인과 동족인 합성 폴리펩타이드일 수 있다. IgG Fc는 약 50 kDa의 분자량을 갖는다. 오쏠로그 IL-2 폴리펩타이드는 전체 Fc 영역, 또는 일부분인 키메라 폴리펩타이드의 순환 반감기를 연장시킬 수 있는 능력을 보유한 더 작은 부분을 포함할 수 있다. 추가로, 전장 또는 단편 Fc 영역은 야생형 분자의 변이체일 수 있다. 즉, 이들은 폴리펩타이드의 기능에 영향을 미치거나 미치지 않을 수 있는 돌연변이를 함유할 수 있고; 하기 추가로 기재된 바와 같이, 천연 활성은 필요하지 않거나, 모든 경우에 바람직하다.

[0031] 다른 실시형태에 있어서, 오쏠로그 폴리펩타이드는 항원 태그, 예를 들면, FLAG 서열로서 기능하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. FLAG 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같이 비오티닐화된, 매우 특이적인, 항-FLAG 항체에 의해 인식된다(또한 문헌[Blanar et al., Science 256: 1014, 1992; LeClair et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8145, 1992] 참조). 몇몇 실시형태에 있어서, 키메라 폴리펩타이드는 C-말단 c-myc 에피토프 태그를 더 포함한다.

[0032] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 오쏠로그 단백질은 키메라 폴리펩타이드의 일부분으로서 존재할 수 있다. 상기 기재된 이종 폴리펩타이드 이외에, 또는 대신에, 본 발명의 핵산 분자는 "마커" 또는 "리포터"를 인코딩하는 서열을 함유할 수 있다. 마커 또는 리포터 유전자의 예는 β-락타마제, 클로람페니콜 아세틸트랜스페라제(CAT), 아데노신 데아미나제(ADA), 아미노글리코시드 포스포트랜스페라제(neo1, G418r), 다이하이드로폴레이트 환원효소(DHFR), 하이그로마이신-B-호스포트랜스페라제(HPH), 티미딘 키나제(TK), lacz(인코딩 β-갈락토시다제), 및 잔틴 구아닌 포스포리보실트랜스페라제(XGPRT)를 포함한다. 본 발명의 실시와 관련된 많은 표준 절차에서와 같이, 숙련가는 추가의 유용한 시약, 예를 들면, 마커 또는 리포터의 기능을 제공할 수 있는 추가의 서열을 알 것이다.

[0033] 직교 사이토카인 및 수용체는 또한 사이토카인의 다른 위치(예를 들면, 직교 조작에 포함된 것들 이외의 위치)에서의 보존적 변형 및 치환을 포함할 수 있다. 이러한 보존적 치환은 문헌[Dayhoff, The Atlas of Protein Sequence and Structure 5(1978)], 및 [Argos, EMBO J., 8:779-785(1989)]에 기재된 것들을 포함한다. 예를 들면, 하기 군 중 하나에 속한 아미노산은 보존적 변화를 나타낸다: I군: ala, pro, gly, gin, asn, ser, thr; II군: cys, ser, tyr, thr; III군: val, ile, leu, met, ala, phe; IV군: lys, arg, his; V군: phe, tyr, trp, his; 및 VI군: asp, glu.

[0034] 용어 "T 세포"는 CD3 및/또는 T 세포 항원 수용체의 발현을 특징으로 할 수 있는 포유동물 면역 이펙터 세포를 의미하고, 이러한 세포는 오쏠로그 사이토카인 수용체를 발현하도록 조작될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 T

세포는 미경험 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들면, T_H1, T_H2, T_H9, T_H11, T_H22, T_{FH}; 조절 T 세포, 예를 들면, T_R1, 천연 T_{Reg}, 유도 T_{Reg}; 기억 T 세포, 예를 들면, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포, NKT 세포, γδT 세포로부터 선택된다.

[0035] 몇몇 실시형태에 있어서 T 세포는 오쏠로그 IL-2와 생체내에서 접촉하고, 즉, 조작된 T 세포는 수용자 내로 도입되며, 오쏠로그 IL-2의 유효 용량은 수용자 내로 주사되고 이들의 천연 환경, 예를 들면, 림프절 등에서 T 세포와 접촉이 허용된다. 다른 실시형태에 있어서 접촉은 시험관내에서 수행된다.

[0036] 대상체로부터 수집된 T 세포는 목적하는 세포에 대하여 풍부하게 하는 기술에 의하여 세포의 혼합물로부터 분리될 수 있다. 적절한 용액은 분산 또는 현탁을 위하여 사용될 수 있다. 이러한 용액은 일반적으로 저농도, 일반적으로 5-25 mM의 허용 가능한 버퍼와 함께 통상적으로 소 태아 혈청 또는 다른 천연 발생 인자로 보충된 균형 염 용액, 예를 들면, 생리 식염수, PBS, 행크 균형 염 용액 등일 것이다. 통상적인 버퍼는 HEPES, 인산염 버퍼, 락테이트 버퍼 등을 포함한다.

[0037] 친화력 분리를 위한 기술은 항체-코팅된 자석 비드를 사용하는 자기 분리, 친화력 크로마토그래피, 단일클론 항체에 결합되거나 단일클론 항체와 함께 사용되는 세포독성제, 예를 들면, 보충물 및 세포독소, 및 예를 들면, 플레이트와 같은 고체 매트릭스에 접착된 항체를 갖는 "패닝", 또는 다른 편리한 기술을 포함할 수 있다. 정확한 분리를 제공하는 기술은 다양한 정도의 세련도를 가질 수 있는 형광 활성화된 세포 분류, 예를 들면, 다중 색상 채널, 저각도 및 둔각 광산란 검출 채널, 임피던스 패널 등을 포함한다. 세포는 사멸 세포와 연관된 염료(예를 들면, 요오드화프로피듐)를 사용하여 사멸 세포에 대항하여 선택될 수 있다. 선택된 세포의 생존능에 지나치게 해롭지 않은 임의의 기술이 사용될 수 있다. 친화력 시약은 상기 지시된 세포 표면 분자에 특이적인 수용체 또는 리간드일 수 있다. 항체 시약 이외에, 펩타이드-MHC 항원 및 T 세포 수용체 쌍; 펩타이드 리간드 및 수용체; 이펙터 및 수용체 분자 등이 사용될 수 있다.

[0038] 분리된 세포는 일반적으로 수집 튜브의 바닥에 혈청의 쿠션을 갖는, 세포의 생존능을 유지하는 임의의 적절한 배지에서 수집될 수 있다. 흔히 소태아 혈청으로 보충된, dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, 이스코브(Iscove) 배지 등을 포함하는 다양한 배지가 상업적으로 이용 가능하며 세포의 성질에 따라 사용될 수 있다.

[0039] 수집되고 임의로 풍부화된 세포 집단은 즉시 사용될 수 있거나, 액체 질소 온도에서 냉동되고 저장될 수 있고, 이는 해동되고 재사용될 수 있다. 세포는 일반적으로 10% DMSO, 50% FCS, 40% RPMI 1640 배지 중에 저장될 것이다.

[0040] 조작된 T 세포는 이들이 또한 임의의 다른 편리한 부위로 도입될 수 있고, 여기서 세포가 성장에 적절한 부위를 찾을 수 있음에도 불구하고, 대상체에게 생리학적으로 허용 가능한 배지 중에서, 일반적으로 혈관내로 주입될 수 있다. 일반적으로, 적어도 $1x10^6$세포/kg, 적어도 $1x10^7$세포/kg, 적어도 $1x10^8$세포/kg, 적어도 $1x10^9$세포/kg, 적어도 $1x10^{10}$세포/kg, 또는 그 이상이 투여될 것이고, 이는 일반적으로 수집 동안 수득된 T 세포의 수에 의해 제한된다.

[0041] *발현 구성:* 본 발명의 방법에서, 오쏠로그 단백질, 특히 오쏠로그 사이토카인은 재조합 방법에 의해 생성될 수 있다. 오쏠로그 수용체는 발현 벡터 상에서 조작되는 세포 내로 도입될 수 있다. 오쏠로그 단백질을 인코딩하는 DNA는 조작 공정 동안 설계된 바와 같이 다양한 공급원으로부터 수득될 수 있다.

[0042] 아미노산 서열 변이체는 본 명세서에 기재된 바와 같이 적절한 뉴클레오타이드 변화를 코딩 서열 내로 도입함으로써 제조된다. 이러한 변이체는 기재된 바와 같은 잔기의 삽입, 치환, 및/또는 특정된 결손을 나타낸다. 삽입, 치환, 및/또는 특정된 결손의 임의의 조합은 최종 구성에 도착하도록 만들어지고, 단 최종 구성은 본 명세서에서 정의되는 바와 같은 목적하는 생물학적 활성을 갖는다.

[0043] 오쏠로그 단백질을 인코딩하는 핵산은 발현을 위하여 복제 가능한 벡터 내에 삽입된다. 많은 이러한 벡터가 이용 가능하다. 벡터 구성원은 일반적으로 하기 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열. 벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 통합 벡터 등을 포함한다.

[0044] 오쏠로그 단백질은 직접적인 것뿐만 아니라 폴리펩타이드와 이종 폴리펩타이드, 예를 들면, 성숙 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에서 특이적인 절단 부위를 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩타이드와의 융합으로서 재조합적으로 생성될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 구성원일 수 있거나, 이는 벡터 내로 삽입되는 코딩

서열의 일부분일 수 있다. 선택된 이종 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 가공된(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단된) 것이다. 포유동물 세포 발현에서 천연 신호 서열이 사용될 수 있거나, 다른 포유동물 신호 서열, 예를 들면, 동일하거나 관련된 종의 분리된 폴리펩타이드뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들면, 단순 포진 gD 신호로부터의 신호 서열이 적합할 수 있다.

[0045] 발현 벡터는 일반적으로 선택 가능한 마커로도 지칭되는 선택 유전자를 함유한다. 이러한 유전자는 선택 배양 배지에서 성장한 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 성장에 필요한 단백질을 인코딩한다. 선택 유전자를 함유하는 벡터에 의해 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배양 배지에서 생존하지 않을 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들면, 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트, 또는 테트라사이클린에 내성을 부여하거나, (b) 영양 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 이용 가능하지 않은 중용한 영양소를 공급하는 단백질을 인코딩한다.

[0046] 발현 벡터는 숙주 유기체에 의해 인식되고 오쏠로그 단백질 코딩 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 함유할 것이다. 프로모터는 이들이 작동적으로 연결된 특정한 핵산 서열의 전사 및 번역을 제어하는 구조 유전자(일반적으로 약 100 내지 1000 bp)의 개시 코돈에 대하여 업스트림(5')에 위치한 번역되지 않은 서열이다. 이러한 프로모터는 전형적으로 유도 및 구성요소 두 부류로 나뉜다. 유도 프로모터는 배양 조건에서 일부 변화, 예를 들면, 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 이들 제어하에 DNA로부터의 전사의 증가된 수준을 개시하는 프로모터이다. 다양하고 강력한 숙주 세포의 많은 수의 프로모터가 잘 알려져 있다.

[0047] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 전사는, 예를 들면, 바이러스, 예를 들면, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예를 들면, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스(예를 들면, 뮤린 줄기 세포 바이러스), B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 시미안 바이러스 40(SV40)의 게놈으로부터 수득된 프로모터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들면, 액틴 프로모터, PGK(포스포글리세레이트 키나제), 또는 면역글로불린 프로모터, 열 충격 프로모터에 의해 제어될 수 있고, 단, 이러한 프로모터는 숙주 세포 시스템과 혼화성이다. SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 복제의 SV40 바이러스 기원을 또한 함유하는 SV40 제한 절편으로서 편리하게 수득된다.

[0048] 고등 진핵생물에 의한 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 인핸서는 프로모터 상에서 작용하여 이의 전사를 증가시키는, 일반적으로 약 10 내지 300 bp의 DNA의 시스-작용 요소이다. 인핸서는 상대적으로 방향 및 위치 의존적이고, 이는 인트론 내에서뿐만 아니라 코딩 서열 그 자체 내에서 전사 단위에 대하여 5' 및 3'가 확인되었다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자으로부터 알려져 있다(글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-페토단백질, 및 인슐린). 전형적으로, 그러나, 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 예는 복제 기원의 후기면 상의 SV40 인핸서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기원의 후기면 상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 인핸서는 코딩 서열에 대하여 위치 5' 또는 3'에서 발현 벡터 내로 슬라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.

[0049] 진핵 숙주 세포에서 사용되는 발현 벡터는 또한 mRNA의 전사 종결 및 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 일반적으로 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및, 가끔 3', 비번역 영역으로부터 공통적으로 이용 가능하다. 상기 열거된 구성원 중 하나 이상을 함유한 적합한 벡터의 구성은 표준 기술을 이용한다.

[0050] 본 명세서에서 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 또는 상기 기재된 고등 진핵생물 세포이다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 마우스 L 세포(L-M[TK-], ATCC#CRL-2648), SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁액 배양에서 성장을 위하여 서브클로닝된 293 또는 293 세포; 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO); 마우스 세르톨리 세포(TM4); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1 587); 인간 자궁경부암 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주(Hep G2)이다.

[0051] 조작된 T 세포를 포함하는 숙주 세포는 오쏠로그 IL-2, 또는 IL-2R 발현을 위하여 상기 기재된 발현 벡터로 형질감염될 수 있다. 세포는 프로모터의 유도, 형질전환체의 선택, 또는 목적하는 서열을 인코딩하는 유전자의 증폭에 적절하게 변형된 통상적인 영양소 배지에서 배양될 수 있다. 포유동물 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용 가능한 배지, 예를 들면, 햄(Ham) F10(Sigma), 최소 필수영양 배지((MEM), Sigma), RPMI 1640(Sigma), 및 둘베코 변형 이글 배지((DMEM), Sigma)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 임의의

이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예를 들면, 인슐린, 트랜스페린, 또는 상피세포 성장 인자), 염(예를 들면, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 인산염), 버퍼(예를 들면, HEPES), 뉴클레오사이드(예를 들면, 아데노신 및 티미딘), 항생제, 미량 원소, 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요 보충물은 또한 당해 분야의 숙련가에게 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예를 들면, 온도, pH 등은 발현을 위하여 선택된 숙주 세포와 이전에 사용된 것들이고, 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다.

[0052] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 위치한 경우, "작동적으로 연결"된다. 예를 들면, 신호 서열을 위한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 단백질원으로서 발현되는 경우, 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하기 위하여 위치하는 경우, 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결된"다는 것은 연결된 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우, 인접하고 판독 단계에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다.

[0053] 재조합으로 생성된 오쏠로그 사이토카인은 또한 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있음에도 불구하고 분비된 폴리펩타이드로서 배양 배지로부터 회수될 수 있다. 프로테아제 억제제, 예를 들면, 페닐 메틸 설포닐 플루오라이드(PMSF)는 또한 정제 동안 단백질 가수분해를 억제하는데 유용할 수 있고, 항생제는 우발적인 오염의 성장을 방지하기 위하여 포함될 수 있다. 다양한 정제 단계가 당해 분야에 알려져 있고, 예를 들면, 친화력 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 친화력 크로마토그래피는 생물학적 거대분자에 일반적으로 존재하는 고도로 특이적인 결합 부위를 이용하여 특정한 리간드를 결합시키는 이들의 능력 하에 분자를 분리한다. 공유 결합은 리간드를 단백질 샘플에 외적으로 나타내는 방식으로 리간드를 불용성, 다공성 지지 배지에 부착시키고, 이로써 하나의 분자 종의 천연 생물특이적 결합을 사용하여 혼합물로부터 제2 종을 분리하고 정제한다. 항생제는 친화력 크로마토그래피에서 흔히 사용된다. 크기 선택 단계가 또한 사용될 수 있고, 예를 들면, 겔 여과 크로마토그래피(또한 크기 배제 크로마토그래피 또는 분자체 크로마토그래피로 알려짐)는 이들의 크기에 따라 단백질을 분리하는데 사용된다. 겔 여과에서, 단백질 용액은 반투과 다공성 수지로 패킹된 칼럼을 통해 통과한다. 반투과 수지는 칼럼에 의해 분리될 수 있는 단백질의 크기를 결정하는 기공 크기 범위를 갖는다. 또한 양이온 교환 크로마토그래피가 흥미롭다.

[0054] 최종 오쏠로그 사이토카인 조성물은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 농축, 여과, 투석 등이 될 수 있다. 치료적 적용을 위하여, 사이토카인은 적절한 조작된 오쏠로그 수용체를 포함하는 포유동물에게 투여될 수 있다. 투여는 정맥내로, 볼루스로서 또는 일정한 시간 기간 동안 연속 주입에 의할 수 있다. 대안적인 투여 경로는 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척추강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로를 포함한다. 오쏠로그 사이토카인은 또한 종양내, 종양부근, 병소내, 또는 병소부근 경로에 의해 또는 림프에 적합하게 투여되어 국소뿐만 아니라 전신 치료 효과를 가한다.

[0055] 이러한 제형은 본질적으로 비독성이고 비치료적인 생리학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 이러한 담체의 예는 이온 교환기, 알루미나, 스테아르산알루미늄, 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들면, 인간 혈청 알부민, 버퍼 성분, 예를 들면, 인산염, 글리신, 소르브산, 소르브산칼륨, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세라이드 혼합물, 물, 염, 또는 전해질, 예를 들면, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트라이실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스계 성분, 및 PEG를 포함한다. 폴리펩타이드의 국소 또는 겔계 형태를 위한 담체는 다당류, 예를 들면, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 또는 메틸 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴레이트, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, PEG, 및 우드 왁스 알코올을 포함한다. 모든 투여에 있어서, 통상적인 데포 형태가 적합하게 사용된다. 이러한 형태는, 예를 들면, 마이크로캡슐, 나노캡슐, 리포솜, 플래스터, 흡입 형태, 코 스프레이, 설하정, 및 서방형 제제를 포함한다. 폴리펩타이드는 전형적으로 약 0.1 ㎍/ml 내지 100 ㎍/ml의 농도로 이러한 비히클 내에 제제화될 것이다.

[0056] 개시내용의 오쏠로그 IL-2 폴리펩타이드가 "실질적으로 순수"한 경우, 이들은 관심 대상 폴리펩타이드, 예를 들면, 오쏠로그 IL-2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드의 적어도 약 60 중량%(건조 중량)일 수 있다. 예를 들면, 폴리펩타이드는 관심 대상 폴리펩타이드의 적어도 약 75 중량%, 약 80 중량%, 약 85 중량%, 약 90 중량%, 약 95 중량% 또는 약 99 중량%일 수 있다. 순도는 임의의 적절한 표준 방법, 예를 들면, 칼럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동, 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0057] 본 발명의 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 기재된 조건의 치료에 유용한 물질을 함유한 제조품이 제공된다. 제조품은 용기 및 표지를 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, 및 시험 튜브를 포함한다.

용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 용기는 병태를 치료하는데 효과적인 조성물을 담고, 무균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들면, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통 가능한 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 중의 활성제는 오쏠로그 사이토카인이다. 용기 위의 표지 또는 이와 관련된 표지는 조성물이 선택된 병태를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 추가의 용기(들)가 담겨 있을 수 있는 제조품, 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 버퍼, 예를 들면, 인산염 완충 식염수, 링거액 또는 덱스트로스 용액과 함께 제공될 수 있다. 제조품은 다른 버퍼, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 설명을 위한 포장 삽입물을 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 더 포함할 수 있다.

[0058] 폴리펩타이드 또는 DNA 서열과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "동일성"은 두 분자 사이의 서브유닛 서열 동일성을 의미한다. 두 분자에서 서브유닛 위치를 동일한 단량체 서브유닛(예를 들면, 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드)이 차지하는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 아미노산 또는 두 뉴클레오타이드 서열 사이의 유사성은 동일한 위치의 수의 직접적인 함수이다. 일반적으로, 서열은 가장 높은 등급의 일치가 수득되도록 정렬된다. 필요에 따라, 동일성은 공개된 기술 및 널리 이용 가능한 컴퓨터 프로그램, 예를 들면, GCS 프로그램 패키지(Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12:387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA(Atschul et al., J. Molecular Biol. 215:403, 1990)를 사용하여 계산될 수 있다. 서열 동일성은 서열 분석 소프트웨어, 예를 들면, 위스콘신 대학 생명공학 센터(1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)의 유전자 컴퓨터 그룹의 서열 분석 소프트웨어 패키지를 이의 디폴트 파라미터로 사용하여 측정될 수 있다.

[0059] 용어 "폴리펩타이드," "단백질" 또는 "펩타이드"는 이의 길이 또는 번역-후 변형(예를 들면, 글리코실화 또는 인산화)과 관계없이 임의의 아미노산 잔기 사슬을 의미한다.

[0060] "단백질 변이체" 또는 "변이체 단백질" 또는 "변이체 폴리펩타이드"는 본 명세서에서 적어도 하나의 아미노산 변형 때문에 야생형 단백질과 상이한 단백질을 의미한다. 모 폴리펩타이드는 천연 발생 또는 야생형(WT) 폴리펩타이드일 수 있거나, WT 폴리펩타이드의 변형된 버전일 수 있다. 변이체 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 그 자체, 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 이를 인코딩하는 아미노 서열을 의미할 수 있다. 바람직하게는, 변이체 폴리펩타이드는 모 폴리펩타이드와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형, 예를 들면, 모 폴리펩타이드와 비교하여 약 1 내지 약 10개의 아미노산 변형, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 변형을 갖는다.

[0061] "모 폴리펩타이드", "모 단백질", "전구체 폴리펩타이드", 또는 "전구체 단백질"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 변이체를 생성하도록 후속적으로 변형되는 변형되지 않은 폴리펩타이드를 의미한다. 모 폴리펩타이드는 야생형(또는 천연) 폴리펩타이드, 또는 야생형 폴리펩타이드의 변이체 또는 조작된 버전일 수 있다. 모 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 그 자체, 모 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 이를 인코딩하는 아미노산 서열을 의미할 수 있다.

[0062] "야생형" 또는 "WT" 또는 "천연"은 본 명세서에서 대립형질 변이를 포함하는 자연에서 확인된 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. WT 단백질, 폴리펩타이드, 항체, 면역글로불린, IgG 등은 의도적으로 변형된 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0063] 용어 "수용자", "개체", "대상체", "숙주", 및 "환자"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 진단, 치료, 또는 처치가 목적되는 임의의 포유동물, 특히 인간을 의미한다. 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예를 들면, 개, 말, 고양이, 소, 양, 염소, 돼지 등을 포함하는 포유동물로 분류된 임의의 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"은 질환 또는 질병을 치료하거나 관리하는데 충분한 치료제, 예를 들면, 입양 T 세포 및 직교 사이토카인 조합의 양을 의미한다. 치료적 유효량은 질환의 개시를 지연시키거나 최소화하고, 예를 들면, 암의 확산을 지연시키거나 최소화하는데 충분한 치료제의 양, 또는 관심 대상 수용체로부터의 신호전달을 감소시키거나 증가시키는데 효과적인 양을 의미할 수 있다. 치료적 유효량은 또한 질환의 치료 또는 관리에서 치료적 이득을 제공하는 치료제의 양을 의미할 수 있다. 추가로, 본 발명의 치료제와 관련하여 치료적 유효량은 질환의 치료 또는 관리에 치료적 이득을 제공하는 치료제 단독, 또는 다른 요법과의 조합으로의 양을 의미한다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방하다", "예방하는" 및 "예방"은 예방제 또는 치료제의 투여의 결과로서 대상체에서 질병의 하나 이상의 증상의 재발 또는 개시의 방지를 의미한다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "조합으로"는 하나 이상의 예방제 및/또는 치료제의 사용을 의미한다. 용어 "조합으로"의 사용은 예방제 및/또는 치료제가 질병이 있는 대상체에게 투여되는 순서를 제한하지 않는다.

제1 예방제 또는 치료제는 질병이 있는 대상체로의 제2 예방제 또는 치료제의 투여 전에(예를 들면, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 6주, 8주, 또는 12주 전에), 이와 수반하여, 또는 후속적으로(예를 들면, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후에) 투여될 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암"(또는 "암성"), "과증식성," 및 "신생물성"은 자율적 성장의 능력을 가진 세포를 의미한다(예를 들면, 빠른 증식성 세포 성장을 특징으로 하는 비정상 상태 또는 병태). 과증식성 및 신생물성 질환 상태는 병리적인 것으로 분류될 수 있거나(예를 들면, 질환 상태의 특성화 또는 구성), 이들은 비-병리적인 것으로 분류될 수 있다(예를 들면, 정상을 벗어났지만 질환 상태와 연관이 없음). 용어는 침습성의 조직병리학적 유형 또는 단계와 관계없이, 모든 유형의 암 성장 또는 발암 과정, 전이성 조직 또는 악성 형질전환된 세포, 조직, 또는 기관을 포함하는 것을 의미한다. "병리적 과증식성" 세포는 종양 악성 종양 성장을 특징으로 하는 질환 상태에서 발생한다. 비-병리적 과증식성 세포의 예는 상처 회복과 연관된 세포 증식을 포함한다. 용어 "암" 또는 "신생물"은 폐, 유방, 갑상선, 림프선 및 림프 조직, 위장 기관, 및 비뇨생식관에 영향을 미치는 것들을 포함하는 다양한 기관계의 악성종양, 뿐만 아니라 악성종양, 예를 들면, 대부분의 대장암, 신장세포 암종, 전립선암 및/또는 고환 종양, 폐의 비소세포 암종, 소장암 및 식도암을 포함하는 것으로 간주되는 선암종을 의미하는 것으로 사용된다.

[0068] 용어 "암종"은 당해 분야에 인식되고, 호흡기계 암종, 위장계 암종, 비뇨생식계 암종, 고환 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비계 암종, 및 흑색종을 포함하는 상피 또는 내분비 조직의 악성종양을 의미한다. "선암종"은 선상 조직으로부터 유래된 암종 또는 종양 세포가 인식 가능한 선상 구조를 형성하는 암종을 의미한다.

[0069] 종양 세포의 예는 AML, ALL, CML, 부신피질암, 항문암, 재생불량성 빈혈, 담관암, 방광암, 골암, 골전이, 뇌암, 중추신경계(CNS) 암, 말초신경계(PNS) 암, 유방암, 자궁경부암, 소아 비-호지킨 림프종, 결장 및 직장암, 자궁내막암, 식도암, 유잉(Ewing) 패밀리 종양(예를 들면, 유잉 육종), 안암, 담낭암, 위장 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양, 임신성 융모성 질환, 호지킨병, 카포시 육종, 신장암, 후두 및 하인두암, 간암, 폐암, 폐 카르시노이드 종양, 비-호지킨 림프종, 남성 유방암, 악성 중피종, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수증식성 질환, 비강 및 비방암, 비인두암, 신경아세포종, 구강 및 구인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 음경암, 뇌하수체 종양, 전립선암, 망막아세포종, 횡문근육종, 타액선암, 육종, 흑색종 피부암, 비-흑색종 피부암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 자궁암(예를 들면, 자궁 육종), 이행 세포 암종, 질암, 외음부암, 중피종, 편평상피 세포 또는 표피 암종, 기관지 선종, 융모암종, 두경부암, 기형암종, 또는 발덴스트룀 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 비-암 세포에 비해 CD47의 증가된 발현을 나타내는 임의의 암은 대상 방법 및 조성물에 의해 치료되는 적합한 암이다.

[0070] 다른 실시형태에 있어서 본 발명의 방법은 감염의 치료에 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "감염"은 유기체(즉, 대상체)의 적어도 하나의 세포가 감염원에 의해 감염된 임의의 상태를 의미한다(예를 들면, 대상체는 세포내 병원체 감염, 예를 들면, 만성 세포내 병원체 감염을 갖는다). 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "감염원"은 감염된 유기체의 적어도 하나의 세포에서 증가된 CD47 발현을 유도하는 외부 생물학적 독립체(즉, 병원체)를 의미한다. 예를 들면, 감염원은 박테리아, 바이러스, 원생동물, 및 진균류를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 세포내 병원체는 특정한 흥미가 있다. 감염 질환은 감염원에 의해 유발된 질병이다. 일부 감염원은 특정한 조건하에 인식 가능한 증상 또는 질환을 유발하지 않지만 변화된 조건하에 증상 또는 질환을 유발할 가능성을 갖는다. 대상 방법은, 예를 들면, 바이러스 감염, 예를 들면, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤파드나 바이러스, 포진 바이러스, 폭스 바이러스, 인간 유두종 바이러스 등; 세포내 박테리아 감염, 예를 들면, 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 칼마이도필라(*Chlamydophila*), 에를리키아(*Ehrlichia*), 릭케트시아(*Rickettsia*), 브루셀라(*Brucella*), 레지오넬라(*Legionella*), 프란시셀라(*Francisella*), 리스테리아(*Listeria*), 콕시엘라(*Coxiella*), 네이세리아(*Neisseria*), 살모넬라(*Salmonella*), 예르시니아 종(*Yersinia sp*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 등; 및 세포내 원생동물 병원체, 예를 들면, 플라스모디움 종(*Plasmodium sp*), 트립파노소마 종(*Trypanosoma sp.*), 기아르디아 종(*Giardia sp.*), 톡소플라스마 종(*Toxoplasma sp.*), 레이쉬마니아 종(*Leishmania sp.*) 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 만성 병원체 감염의 치료에서 사용될 수 있다.

[0071] 다른 실시형태에 있어서, 조절 T 세포는 자가면역 질환의 치료를 위하여 조작된다. 염증성 질환 및 염증과 관련된 질환의 범위는 넓고, 자가면역 질환, 예를 들면, 류머티스성 관절염(RA), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증(MS), 및 자가면역 간염; 인슐린 의존성 당뇨병, 퇴행성 질환, 예를 들면, 골관절염(OA), 알츠하이머병

(AD), 및 황반 변성을 포함한다.

[0072] 대다수는 아니지만, 많은 자가면역 및 염증성 질환은 여러 유형의 T 세포, 예를 들면, TH1, TH2, TH17 등과 연관된다. 자가면역 질환은 질환의 임상 징후를 유발하는 신체 내의 기관, 조직, 또는 세포-유형(예를 들면, 췌장, 뇌, 갑상선 또는 위장관)의 부상 및 기능부전을 유발하는, 자기-단백질, -폴리펩타이드, -펩타이드, 및/또는 다른 자기-분자를 비정상적으로 표적화하는 T 및 B 림프구를 특징으로 한다. 자가면역 질환은 특정한 조직에 영향을 미치는 질환뿐만 아니라 여러 조직에 영향을 미칠 수 있는 질환을 포함하고, 이는 반응이 특정한 조직에 국한된 항원 또는 신체에 널리 분포하는 항원을 향한 것인지 여부에 따라 어느 정도는 좌우된다.

[0073] 조성물 및 방법

[0074] 조작된 직교 사이토카인 수용체/리간드 쌍, 및 이의 사용 방법이 제공된다. 조작된(직교) 사이토카인은 대응물 조작된(직교) 수용체에 특이적으로 결합한다. 결합하에, 직교 수용체는 천연 세포 요소를 통해 형질도입되어 천연 반응을 모사하는 생물학적 활성을 제공하지만 직교 수용체를 발현하는 조작된 세포에 특이적인 신호전달을 활성화시킨다. 직교 수용체는 직교 사이토카인의 천연 대응물을 포함하는 내인성 대응물 사이토카인에 결합하지 않고, 직교 사이토카인은 직교 수용체의 천연 대응물을 포함하는 임의의 내인성 수용체에 결합하지 않는다. 몇몇 실시형태에 있어서, 직교 수용체에 대한 직교 사이토카인의 친화력은 천연 수용체에 대한 천연 사이토카인의 친화력과 비슷하다.

[0075] 직교 사이토카인 및 수용체 쌍은 관심 대상 임의의 사이토카인으로부터 선택될 수 있다. 직교 사이토카인 수용체 쌍의 조작 방법은 (a) 천연 수용체 내의 아미노산 변화를 조작하여 천연 사이토카인에의 결합을 방해하는 단계; (b) 수용체 결합을 위한 접촉 잔기에서 천연 사이토카인 내의 아미노산 변화를 조작하는 단계, (c) 오쏠로그 수용체에 결합하는 사이토카인 오쏠로그를 선택하는 단계; (d) 천연 수용체에 결합하는 오쏠로그 사이토카인를 제거하는 단계, 또는 (e) 오쏠로그 사이토카인에 결합하는 수용체 오쏠로그를 선택하는 단계; (f) 천연 사이토카인에 결합하는 오쏠로그 수용체를 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 사이토카인/수용체 복합체의 구조의 지식은 부위-지정 또는 오류 유발 돌연변이 생성을 위하여 아미노산 위치를 선택하는데 사용된다. 다른 디스플레이 및 선택 방법이 또한 유용하지만, 통상적으로 효모 디스플레이 시스템을 선택 공정을 위하여 사용할 수 있다.

[0076] 몇몇 경우에, 아미노산 변화는 친화력 성숙에 의해 수득된다. "친화력 성숙된" 폴리펩타이드는 이들 변경(들)을 갖지 않는 모 폴리펩타이드와 비교하여 동족 오쏠로그 수용체에 대한 오쏠로그 폴리펩타이드의 친화력에서 개선을 야기하거나, 그 반대인, 하나 이상의 잔기에서 하나 이상의 변경(들)을 갖는 것이다. 친화력 성숙은 "모" 폴리펩타이드와 비교하여 적어도 약 10% 내지 50- 100- 150% 또는 그 이상, 또는 1 내지 5배만큼 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0077] 본 발명의 조작된 오쏠로그 사이토카인은 오쏠로그 수용체에서 하나 이상의 잔기 또는 영역에 특이적으로 결합하지만, 야생형 수용체와 교차-반응하지 않는다. 전형적으로, 교차-반응성의 부재는 적합한 검정 조건하에 분자의 충분한 양을 사용하여 ELISA 및/또는 FACS 분석에 의해 평가되는 경우, 분자들 사이의 약 5% 미만의 상대 경쟁 억제율을 의미한다.

[0078] 본 발명의 몇몇 실시형태에 있어서, 직교 수용체는 IL-2 수용체의 사슬, 즉, 인터류킨 2 수용체 알파(IL-2Rα; CD25), 인터류킨 2 수용체 베타(IL-2Rβ; CD122), 및 인터류킨 2 수용체 감마(IL-2Rɣ; CD132; 공동 감마 사슬)로부터 선택된 폴리펩타이드이다. 몇몇 특정한 실시형태에 있어서 직교 수용체는 IL-2, IL-4, IL-7 및 IL-15로부터의 신호전달에 포함된 CD132이다. 다른 특정한 실시형태에 있어서, 직교 수용체는 IL-2 및 IL-15로부터의 신호전달에 포함된 CD122이다. 직교 수용체는 일반적으로 대응물 직교 사이토카인, 예를 들면, IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 등과 쌍을 이룬다.

[0079] 몇몇 특정한 실시형태에 있어서, 직교 수용체는 CD122이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 직교 수용체는 또한 CD25 및/또는 CD132를 발현할 수 있는 T 세포 또는 NK 세포 내로 도입된다. 변형된 CD122 단백질의 핵산 코딩 서열 및 단백질 조성물이 제공된다. 본 발명에서 CD122는 천연 서열의 아미노산을 비-천연 아미노산으로 치환하거나, 천연 IL-2에 결합하는데 포함된 위치에서의 천연 아미노산의 결손에 의해, 천연 사이토카인의 결합을 방해하도록 조작된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 아미노산은 비-보존적 변화로 치환된다. 치환 또는 결손을 위하여 관심 대상 위치는, 제한 없이, 인간 CD122(hCD122)에서 R41, R42, Q70, K71, T73, T74, V75, S132, H133, Y134, F135, E136, Q214를 포함한다. 치환 또는 결손을 위하여 관심 대상 위치는, 제한 없이, 마우스 CD122(mCD122)에서 R42, F67, Q71, S72, T74, S75, V76, S133, H134, Y135, I136, E137, R215를 포함한다.

[0080] 몇몇 실시형태에 있어서, CD122는 마우스 단백질에서 Q71, T74, H134, Y135; 또는 인간 단백질에서 Q70, T73, H133, Y134로부터 선택된 위치 중 하나 또는 조합에서 치환된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 조작된 단백질은 mCD122 H134 및 Y135; 또는 hCD122 H133 및 Y134에서의 아미노산 치환을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서 아미노산 치환은 산성 아미노산, 예를 들면, 아스파르트산 및/또는 글루탐산에 대한 것이다. 특정한 아미노산 치환은, 제한 없이, mCD122 치환 Q71Y; T74D; T74Y; H134D, H134E; H134K; Y135F; Y135E; Y135R; 및 hCD122 변화 Q70Y; T73D; T73Y; H133D, H133E; H133K; Y134F; Y134E; Y134R을 포함한다. 오쏠로그 사이토카인의 선택은 오쏠로그 수용체의 선택과 함께 다양할 수 있다.

[0081] 몇몇 실시형태에 있어서, 오쏠로그 수용체가 CD122인 경우, 오쏠로그 사이토카인은 IL-2, 또는 IL-15이다. 사이토카인은, 예를 들면, 효모 디스플레이 진화, 오류 유발 또는 표적화된 돌연변이 생성 등에 의해 오쏠로그 수용체에 결합을 위하여 선택될 수 있다. 선택된 오쏠로그 서열의 대표적인 세트는 도 6에 도시된다.

[0082] 몇몇 실시형태에 있어서, 직교 사이토카인은 IL-2이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상은 천연 단백질의 것 이외의 아미노산으로 치환되거나 그 위치에서 결손된다: 마우스 IL-2(mIL-2)에 있어서, H27, L28, E29, Q30, M33, D34, Q36, E37, R41, N103 중 임의의 하나; 인간 IL-2(hIL-2)에 있어서, Q13, L14, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, G27, N88 중 임의의 하나. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 아미노산 치환의 세트는 (mIL-2에 있어서) E29, Q30, M33, D34, Q36, 및 E37; 및 hIL-2에 있어서, E15, H16, L19, D20, Q22, M23 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0083] 몇몇 실시형태에 있어서, 아미노산 치환은 mIL-2에 있어서 [H27W], [L28M, L28W], [E29D, E29T, E29A], [Q30N], [M33V, M33I, M33A], [D34L, D34M], [Q36S, Q36T, Q36E, Q36K, Q36E], [E37A, E37W, E37H, E37Y, E37F, E37A, E37Y], [R41K, R41S], [N103E, N103Q] 중 하나 이상이고; hIL-2에 있어서 [Q13W], [L14M, L14W], [E15D, E15T, E15A], [H16N], [L19V, L19I, L19A], [D20L, D20M], [Q22S, Q22T, Q22E, Q22K, Q22E], [M23A, M23W, M23H, M23Y, M23F, M23A, M23Y], [G27K, G27S], [N88E, N88Q] 중 하나 이상이다. 몇몇 실시형태에 있어서 아미노산 치환의 세트는 하기 치환 세트 중 하나를 포함한다: mIL-2에 있어서 [Q30N, M33V, D34N, Q36T, E37H, R41K]; [E29D, Q30N, M33V, D34L, Q36T, E37H]; [E29D, Q30N, M33V, D34L, Q36T, E37A], 및 [E29D, Q30N, M33V, D34L, Q36K, E37A] 및 hIL-2에 있어서 [H16N, L19V, D20N, Q22T, M23H, G27K]; [E15D, H16N, L19V, D20L, Q22T, M23H]; [E15D, H16N, L19V, D20L, Q22T, M23A], 및 [E15D, H16N, L19V, D20L, Q22K, M23A]; 또는 이의 보존적 변이체.

[0084] 몇몇 실시형태에 있어서 아미노산 치환은 hIL-2에 있어서 [E15S, E15T, E15Q, E15H]; [H16Q]; [L19V, L19I]; [D20T, D20S, D20M, D20L]; [Q22K, Q22N]; [M23L, M23S, M23V, M23T] 중 하나 이상이다. 몇몇 실시형태에 있어서 돌연변이의 공통 세트는 hIL-2에 있어서 [E15S, H16Q, L19V, D20T/S/M; Q22K; M23L/S]이다. 몇몇 실시형태에 있어서 아미노산 치환의 세트는 hIL-2에 있어서 하기 치환 세트 중 하나를 포함한다: [E15S; H16Q; L19V, D20T/S; Q22K, M23L/S]; [E15S; H16Q; L19I; D20S; Q22K; M23L]; [E15S; L19V; D20M; Q22K; M23S]; [E15T; H16Q; L19V; D20S; M23S]; [E15Q; L19V; D20M; Q22K; M23S]; [E15Q; H16Q; L19V; D20T; Q22K; M23V]; [E15H; H16Q; L19I; D20S; Q22K; M23L]; [E15H; H16Q; L19I; D20L; Q22K; M23T]; [L19V; D20M; Q22N; M23S].

[0085] 치료의 방법

[0086] 방법은 본 발명의 오쏠로그 수용체의 도입에 의하여 수용자 또는 공여자로부터의 세포를 조작하고, 조작된 세포를 동족 오쏠로그 사이토카인과 접촉시켜 오쏠로그 수용체를 자극함으로써, 세포성 반응을 개선시키기 위하여 제공된다. 대상 방법은 표적화된 세포, 예를 들면, T 세포, 조혈 줄기 세포, 등을 수득하는 단계를 포함하고, 이는 생물학적 샘플로부터 단리될 수 있거나 전구 세포의 공급원으로부터 시험관내 유래될 수 있다. 세포는 오쏠로그 수용체를 인코딩하는 서열을 포함하는 발현 벡터에 의해 형질도입되거나 형질감염되고, 이러한 단계는 임의의 적합한 배양 배지에서 수행될 수 있다.

[0087] 몇몇 실시형태에 있어서, 세포가 본 발명의 오쏠로그 수용체의 도입에 의해 변형된, 조작된 세포가 제공된다. 이러한 목적을 위하여 임의의 세포가 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 세포는, 제한 없이, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들면, T_H1, T_H2, T_H9, T_H11, T_H22, T_{FH}; 조절 T 세포, 예를 들면, T_R1, 천연 T_{Reg}, 유도 T_{Reg}; 기억 T 세포, 예를 들면, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포, NKT 세포, γδ T 세포 등을 포함하는 T 세포이다. 다른 실시형태에 있어서 조작된 세포는 줄기 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포, NK 세포이다. 몇몇 실시형태에 있어서 세포는 대상체에게 도입되기 전에 생체외 절차

로 유전적으로 변형된다. 조작된 세포는 요법을 위한 단위 용량으로 제공될 수 있고, 의도된 수용자에 관하여 동종이계, 자가유래 등일 수 있다.

[0088] 몇몇 실시형태에 있어서 직교 수용체를 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 벡터가 제공되고, 여기서 코딩 서열은 목적하는 세포에서 프로모터 활성에 작동적으로 연결된다. 다양한 벡터, 예를 들면, 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 미니서클 벡터가 당해 분야에 공지되어 있으며 이러한 목적을 위하여 사용될 수 있고, 이러한 벡터는 표적 세포 게놈 내로 통합될 수 있거나, 에피솜적으로 유지될 수 있다. 수용체 인코딩 벡터는 수용체에 결합하고 이를 활성화시키는 오쏠로그 사이토카인을 인코딩하는 벡터와 조합되어 키트로 제공될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 오쏠로그 사이토카인에 대한 코딩 서열은 고발현 프로모터에 작동적으로 연결되고, 생산을 위하여 최적화될 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 키트는 환자에게 투여를 위하여 포장된, 오쏠로그 수용체를 인코딩하는 벡터가 오쏠로그 사이토카인의 정제된 조성물로, 예를 들면, 단위 용량으로, 제공되도록 제공된다.

[0089] 몇몇 실시형태에 있어서 치료 방법이 제공되고, 방법은 이를 필요로 하는 수용자에게 조작된 세포 집단을 도입하는 것을 포함하고, 여기서 세포 집단은 본 발명의 오쏠로그 수용체를 인코딩하는 서열의 도입에 의해 변형되었다. 세포 집단은 생체외 조작될 수 있고, 일반적으로 수용체에 관하여 자가유래 또는 동종이계이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 조작된 세포의 투여 후, 도입된 세포 집단은 동족 오쏠로그 사이토카인과 생체내 접촉한다. 본 발명의 이점은 오쏠로그 사이토카인과 천연 수용체 사이의 교차-반응성이 없다는 것이다.

[0090] 세포가 오쏠로그 사이토카인과 시험관내에서 접촉하는 경우, 사이토카인은 수용체로부터의 신호전달을 활성화시키는데 충분한 용량으로 및 시간 기간 동안 조작된 세포에 첨가되고, 이는 천연 세포 시스템, 예를 들면, 보조 단백질, 공-수용체 등을 이용할 수 있다. 임의의 적합한 배양 배지가 사용될 수 있다. 따라서 활성화된 세포는 항원 특이성, 사이토카인 프로파일링 등의 측정과 관련된 실험적 목적 및 생체내 전달을 포함하는 임의의 바람직한 목적을 위하여 사용될 수 있다.

[0091] 접촉이 생체내에서 수행되는 경우, 조작된 세포의 유효량은 오쏠로그 사이토카인의 투여와 조합으로 또는 그 전에 수용자에게 주입된다. 투여량 및 빈도는 제제; 투여 방식; 사이토카인의 성질 등에 따라 다양할 수 있다. 이러한 지침이 개별적인 상황에 맞게 조절될 것이라는 것이 당해 분야의 숙련가에게 이해될 것이다. 투여량은 또한 국소화된 투여, 예를 들면, 비강내, 흡입 등, 또는 전신 투여, 예를 들면, i.m., i.p., i.v. 등에 따라 다양할 수 있다. 일반적으로 적어도 약 10^4개의 조작된 세포/kg, 적어도 약 10^5개의 조작된 세포/kg; 적어도 약 10^6개의 조작된 세포/kg, 적어도 약 10^7개의 조작된 세포/kg, 또는 그 이상이 투여된다.

[0092] 조작된 세포가 T 세포인 경우, 개선된 면역 반응은 수용자에 존재하는 표적 세포에 대한 T 세포의 세포독성 반응의 증가, 예를 들면, 종양 세포, 감염된 세포의 제거; 자가면역 질환의 증상의 감소 등에 의해 나타날 수 있다.

[0093] *세포 조성물.* 조작된 T 세포는 치료적 용도, 예를 들면, 인간 치료에 적합한 약학 조성물로 제공될 수 있다. 이러한 세포를 포함하는 치료적 제제는 수성 용액의 형태로 생리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980))와 함께 투여용으로 냉동 또는 제조될 수 있다. 세포는 우수한 의료 실시와 일치하는 방식으로 제제화되고, 투약되고, 투여될 것이다. 이러한 내용에서 고려할 인자는 치료되는 특정한 질병, 치료되는 특정한 포유동물, 개별적인 환자의 임상적 병태, 질병의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 전문가에게 공지된 다른 인자를 포함한다.

[0094] 세포는 임의의 적합한 수단에 의해, 일반적으로 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내(볼루스 또는 슬로우 드립), 동맥내, 복강내, 척추강내 또는 피하 투여를 포함한다.

[0095] 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료 응용분야에 따라 좌우된다. 조성물은 또한, 목적하는 제형에 따라, 동물 또는 인간 투여를 위한 약학 조성물을 제제화하는데 흔히 사용되는 비히클로서 정의되는, 약학적으로 허용 가능한, 비독성 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 희석제는 조합의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는 증류수, 생리학적 인산염-완충 식염수, 링거액, 덱스트로스 용액, 및 행크 용액이다. 추가로, 약학 조성물 또는 제제는 또한 다른 담체, 보조제, 또는 비독성, 비치료성, 비면역원성 안정화제 등을 포함할 수 있다.

[0096] 몇몇 다른 실시형태에 있어서, 약학 조성물은 또한 크고 천천히 대사작용된 거대분자, 예를 들면, 단백질, 다당류, 예를 들면, 키토산, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 공중합체(예를 들면, 라텍스 작용화된 세파로스(Sepharose)(상표명), 아가로스, 셀룰로스 등), 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 지질 응집체(예를

들면, 오일 액적 또는 리포솜)를 포함할 수 있다.

[0097] 허용 가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 버퍼, 예를 들면, 인산염, 시트르산염, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예를 들면, 옥타데시이디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들면, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 겔라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들면, EDTA; 당, 예를 들면, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들면, 나트륨; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들면, TWEEN(상표명), PLURONICS(상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 생체내 투여를 위하여 사용되는 제제는 반드시 무균이어야 한다. 이는 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0098] 전형적으로, 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사 가능하게 제조되고; 주사 전에 액체 비히클 중에 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 제제는 또한 상기 논의된 바와 같이, 리포솜 또는 미세 입자, 예를 들면, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 개선된 보조 효과를 위한 공중합체 중에 에멀젼화되거나 캡슐화될 수 있다. 문헌[Langer, Science 249: 1527, 1990 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997]. 본 발명의 제제는 데포 주사 또는 임플란트 제형의 형태로 투여될 수 있고, 이는 활성 성분의 지속성 또는 맥동성 방출을 허용하는 방식으로 제제화될 수 있다. 약학 조성물은 일반적으로 무균, 실질적으로 등장성이고, 미국의 식품의약국의 모든 우수 의약품 제조 관리(GMP) 기준을 완전히 준수한다.

[0099] 키트

[0100] 방법에서 사용하기 위한 키트가 또한 제공된다. 대상 키트는 오쏠로그 사이토카인 수용체를 인코딩하는 발현 벡터, 또는 발현 벡터를 포함하는 세포를 포함한다. 키트는 동족 오쏠로그 사이토카인을 더 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 구성원은 임의의 편리한 포장(예를 들면, 스틱 팩, 용량 팩 등)의 액체 또는 고체 형태의 제형(예를 들면, 치료적 유효 제형)으로 제공된다. 세포의 선택 또는 시험관내 유래를 위한 시약, 예를 들면, 성장 인자, 분화제, 조직 배양 시약 등이 또한 제공될 수 있다.

[0101] 상기 구성원 이외에, 대상 키트는 대상 방법을 실시하기 위한 설명서를 더 포함할 수 있다(특정한 실시형태에 있어서). 이들 설명서는 다양한 형태로 대상 키트에 존재할 수 있고, 이들 중 하나 이상은 키트 내에 존재할 수 있다. 이들 설명서 중 하나의 형태는 키트의 포장, 포장 삽입물 등 내의 적합한 매체 또는 기판 위에 인쇄된 정보, 예를 들면, 그 위에 정보가 인쇄된 종이 한장 또는 몇장이다. 이들 설명서의 또 다른 형태는 그 위에 정보가 기록된 컴퓨터 판독 가능 매체, 예를 들면, 디스켓, 컴팩트 디스크(CD), 플래쉬 드라이브 등이다. 존재할 수 있는 이들 설명서의 또 다른 형태는 웹사이트 주소이고, 이는 삭제된 사이트의 정보에 인터넷을 통해 접근하는 데 사용될 수 있다.

[0102] 몇몇 실시형태에 있어서 대상 조성물, 방법 및 키트는 T 세포 매개된 면역 반응을 개선시키는데 사용된다. 몇몇 실시형태에 있어서 면역 반응은 표적 세포, 예를 들면, 암 세포, 감염된 세포, 자가면역 질환에 포함된 면역 세포 등을 고갈시키거나 조절하는 것이 바람직한 병태에 관한 것이다.

[0103] 몇몇 실시형태에 있어서 병태는 만성 감염, 즉, 1주, 2주 등 이하의 기간 내에 숙주 면역계에 의해 청소되지 않는 감염이다. 몇몇 경우에, 만성 감염은 숙주 게놈 내로의 병원체 유전자 요소, 예를 들면, 레트로바이러스, 렌티바이러스, B형 간염 바이러스 등의 통합을 포함한다. 다른 경우에, 만성 감염, 예를 들면, 특정한 세포내 박테리아 또는 원생생물 병원체는 숙주 세포 내에 잔류하는 병원체 세포로부터 야기된다. 추가로, 몇몇 실시형태에 있어서, 감염은 포진 바이러스 또는 인간 유두종 바이러스와 같이 잠복기 중에 있다.

[0104] 관심 대상 바이러스 병원체는, 제한 없이, 레트로바이러스 및 렌티바이러스 병원체, 예를 들면, HIV-1; HIV-2, HTLV, FIV, SIV 등, B형 간염 바이러스 등을 포함한다. 관심 대상 미생물은 하기를 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 예르시니아 종, 예를 들면, 와이 페티스(*Y. pestis*), 와이 슈도투베르쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*), 와이 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*); 프란시스셀라 종(*Franciscella sp.*); 파스투렐라 종(*Pasturella sp.*); 비브리오 종(*Vibrio sp.*), 예를 들면, 브이 콜레라(*V. cholerae*), 브이 파라헤몰라이티쿠스(*V. parahemolyticus*); 레지오넬라 종, 예를 들면, 엘 뉴모필라(*L. pneumophila*); 리스테리아 종, 예

를 들면, 엘 모노사이토제네스(*L. monocytogenes*); 마이코플라스마 종(*Mycoplasma sp.*), 예를 들면, 엠 호미니스(*M. hominis*), 엠 뉴모니아(*M. pneumoniae*); 마이코박테리움 종, 예를 들면, 엠 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 엠 레프라(*M. leprae*); 릭케트시아 종, 예를 들면, 알 릭케트시(*R. rickettsii*), 알 티피(*R. typhi*); 클라미디아 종(*Chlamydia sp.*), 예를 들면, 씨 트라코마티스(*C. trachomatis*), 씨 뉴모니아(*C. pneumoniae*), 씨 프시타시(*C. psittaci*); 헬리코박터 종, 예를 들면, 에이치 파일로리(*H. pylori*) 등. 또한 세포내 원생생물 병원체, 예를 들면, 플라스모디움 종, 트립파노소마 종, 기아르디아 종, 톡소플라스마 종, 레이쉬마니아 종 등이 포함된다.

[0105] 본 발명의 방법으로 치료되는 감염은 일반적으로 숙주 세포 내의 이의 생활-주기, 즉, 세포내 단계의 적어도 일부분을 갖는 병원체를 포함한다. 본 발명의 방법은 치료의 부재하에 제거와 관련하여 숙주 유기체의 T 이펙터 세포에 의한 감염된 세포의 더 효과적인 살해를 제공하고, 따라서 병원체 생활 주기의 세포내 단계에 관한 것이다. 방법은 치료의 효능을 위하여 환자를 모니터링하는 것을 더 포함할 수 있다. 모니터링은 감염의 임상적 징후, 예를 들면, 열, 백혈구 수 등을 측정하고/하거나 병원체의 존재를 직접 모니터링한다.

[0106] 치료는 다른 활성제와 조합될 수 있다. 항생제의 부류는 페니실린, 예를 들면, 페니실린 G, 페니실린 V, 메티실린, 옥사실린, 카베니실린, 나프실린, 암피실린 등; β-락타마제 억제제, 세팔로스포린, 예를 들면, 세파클로르, 세파졸린, 세푸록심, 목사락탐 등과 페니실린의 조합; 카바페넴; 모노박탐; 아미노글리코시드; 테트라사이클린; 마크롤리드; 린코마이신; 폴리마익신; 설폰아마이드; 퀴놀론; 클로람페니칼; 메트로니다졸; 스펙티노마이신; 트리메토프림; 반코마이신 등을 포함한다. 사이토카인, 예를 들면, 인터페론γ, 종양 괴사 인자α, 인터류킨 12 등이 포함될 수 있다. 항바이러스제, 예를 들면, 아사이클로비르, 간사이클로비르 등이 또한 치료에 사용될 수 있다.

[0107] 몇몇 실시형태에 있어서 병태는 암이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "암"은 비세포의 정상적인 제어되지 않는 성장에 의해 유발된 다양한 병태를 의미한다. "암 세포"로 지칭되는 암을 유발할 수 있는 세포는 특징적인 성질, 예를 들면, 제어되지 않는 증식, 불멸, 전이 가능성, 빠른 성장 및 증식 속도, 및/또는 특정한 전형적인 형태학적 특징을 갖는다. 암은 종양 또는 종양들의 존재를 검출하는 것(예를 들면, 임상적 또는 방사선학적 수단), 종양 내의 세포 또는 또 다른 생물학적 샘플로부터의(예를 들면, 조직 생검으로부터의) 세포를 시험하는 것, 암을 나타내는 혈액 마커를 측정하는 것, 및 암을 나타내는 유전형을 검출하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 다수의 방식으로 검출될 수 있다. 그러나, 상기 검출 방법 중 하나 이상에서 음성 결과는 본질적으로 암의 부재를 나타내지는 않고, 예를 들면, 암 치료에 완전한 반응을 나타내는 환자는 후속적인 재발에 의해 증명되는 바와 같이 암을 가질 수 있다.

[0108] 본 명세서에서 사용되는 용어 "암"은 암종(예를 들면, 상피내 암종, 침습성 암종, 전이성 암종) 및 전암 상태, 즉, 이들의 조직학적 기원과 독립적인 신형성 변화를 포함한다. 용어 "암"은 감염된 조직 또는 세포 응집의 임의의 단계, 등급, 조직형태학적 특징, 침습성, 공격성 또는 악성에 의해 한정되지 않는다. 특히 0기 암, I기 암, II기 암, III기 암, IV기 암, I급 암, II급 암, III급 암, 악성 암 및 원발성 암종이 포함된다.

[0109] 본 발명은 이제 완전히 기재될 것이고, 다양한 변화 및 변형이 본 발명의 취지 또는 범위를 벗어나지 않으면서 만들어질 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다.

[0110] 실험

[0111] 오쏠로그 IL-2 및 IL-2Rβ

[0112] 여기서, 본 발명자들은 생체외 입양 세포 요법의 환경에서 목적하는 세포 서브세트의 선택적 확장을 가능하게 하는 조작된 사이토카인 및 수용체를 포함하는 본 발명을 기재한다. 특정한 본 발명은 입양 세포 요법에서 T 세포의 특이적인 확장을 가능하게 하고, 따라서 면역요법에서 충족되지 않은 요구를 해결하는, 사이토카인 인터류킨-2(IL-2) 및 이의 수용체 IL-2Rβ 사슬(IL-2Rβ)에 대하여 설명된다. 본 명세서에 기재된 접근법은 골수 및 줄기 세포 이식, 및 많은 다른 양상을 포함하는, 세포가 특이적인 수용체-리간드 쌍에 의해 자극되는 입양 세포 요법의 임의의 환경으로 일반화될 수 있다.

[0113] 직교 IL-2 및 IL-2Rβ 리간드-수용체 쌍이 구체적으로 기재된다. IL-2의 오쏠로그 버전 및 IL-2Rβ의 오쏠로그 버전은 서로 특이적으로 결합하지만 이들의 야생형 대응물에는 결합하지 않는다. 다중 직교 IL-2 변이체 서열은 직교 IL-2Rβ에 대한 다양한 정도의 친화력과 함께 제공된다. 직교 IL-2 의존성 신호전달 및 직교 IL-2Rβ를 발현하도록 조작된 T 세포의 T 세포 증식이 나타난다.

[0114] IL-2는 각각 이펙터 T 세포 및 조절 T 세포의 확장을 촉진할 수 있는 이의 능력 때문에 암 및 자가면역의 치료

에 있어서 매력적인 생물제제이다. 그러나, IL-2의 이러한 다면발현성 성질뿐만 아니라 표적을 벗어난 독성은 임상에서 이의 용도를 제한한다. IL-2의 면역자극 및 면역억제 성질을 분리시킬 수 있는 능력은 IL-2 면역요법의 뛰어난 형태를 제공할 수 있다.

[0115] 직교 IL-2Rβ를 발현하도록 T 세포를 조작할 수 있는 능력이 본 명세서에서 증명된다. 이들 조작된 T 세포는 직교 IL-2에 반응하는 것으로 나타나고, 이는 다운스트림 신호 변환 분자(예를 들면, STAT5)의 인산화, 및 T 세포 증식을 야기한다. 야생형 T 세포에 대한 직교 IL-2의 활성은 야생형 IL-2의 활성과 비교하여 완전히 폐기되거나 유의미하게 약화된다. 따라서, 직교 IL-2/IL-2 수용체 쌍을 사용하는 선택적 T 세포 확장이 증명된다.

[0116] 직교 IL-2/IL-2 수용체 쌍의 적용은 암 요법을 위한 종양 반응성 세포독성 T 세포, 감염 질환 및/또는 암을 위한 NK 세포, 및 자가면역 질병을 위한 조절 T 세포의 선택적 확장을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0117] IL-2Rβ에 대한 결합을 방해하지만 완전히 제거하지 않는 돌연변이로 인하여 중간체(IL-2Rβ 및 IL-2Rɣ)에 대한 약화된 친화력 또는 야생형 IL-2 수용체(IL-2Rα, Rβ, Rɣ)에 대한 고친화력을 갖는 IL-2 변이체는 또한, 예를 들면, 자가면역 질병의 치료에서, IL-2Rα 고 세포를 향한 오쏠로그 IL-2의 활성을 표적화하는 선택성에 있어서 유용하다. IL-2Rβ 사슬에 대하여 제거된 친화력을 갖지만 IL-2Rα에 대한 결합을 유지하고, 따라서 고친화력 IL-2R 형성을 억제함으로써 야생형 IL-2에 대한 경쟁적인 길항제로서 작용하는 IL-2 변이체는 자가면역 또는 그래프트-v-숙주 질병을 치료하는데 유용하다.

[0118] 직교 IL-2/IL-2 수용체 쌍을 생성하고 이용하여 T 세포 확장을 제어하는 전체적인 개념은 도 1의 도면에 도시된다. 도 2는 구조 안내된 돌연변이 생성을 사용하여 야생형 IL-2에 대한 결합이 부재한 IL-2Rβ 오쏠로그를 생성하는 단계를 포함하는 작업 흐름도를 제공한다. 야생형 IL-2에 대한 IL-2Rβ 결합을 방해할 것으로 예측된 돌연변이는 효모 기반 스크리닝 검정을 사용하여 실험적으로 확인되고, 표면 플라즈몬 공명을 통해 정제된 재조합 단백질을 사용하여 추가로 확인된다. 이러한 접근법을 사용하여 야생형 IL-2에 대한 결합을 방해하는 다수의 IL-2Rβ 점 돌연변이가 기재되고, 각각의 이들 수용체 변이체는 오쏠로그 수용체로서 작용할 수 있다. 단일 점 돌연변이는 또한 1, 2, 또는 그 이상의 추가의 점 돌연변이와 조합되어 IL-2Rβ 오쏠로그의 더 큰 라이브러리를 생성할 수 있다.

[0119] 직교 마우스 IL-2Rβ 변이체의 서열은 도 3에 도시된다. 이들 돌연변이는, 조합된 돌연변이가 야생형 IL-2 결합을 방해하는 한, 단일 점 돌연변이, 또는 이의 임의의 조합으로서 사용되어 1, 2, 3, 또는 그 이상의 점 돌연변이를 갖는 IL-2Rβ 오쏠로그를 생성할 수 있다.

[0120] 도 4는 야생형 mIL-2 결합을 폐기하는, 아미노산 변화 H134D, Y135F를 포함하는 mIL-2Rβ 변이체의 특성화를 도시한다. 이들 2개의 잔기는 IL-2 상호작용 핫 스팟으로 알려져 있고(Ring A et al, Nat Immunol(2012) 13: 1187-95), 본 발명자들은 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 통해 돌연변이가 야생형 IL-2 결합을 방해한다는 것을 확인하였다.

[0121] 도 5는 직교 IL-2/IL-2Rβ 쌍의 조작에 대한 작업 흐름도를 도시한다. 오쏠로그 라이브러리는 IL-2Rβ 직교 오쏠로그 아미노산 잔기에 근접하거나 이와 접촉하는 잔기를 무작위화하는 IL-2로 생성된다. 효모 디스플레이를 사용하여, 오쏠로그 IL-2Rβ에 결합하는 IL-2 변이체를 선택하고, 야생형 IL-2Rβ에 결합하는 클론을 제거한다. 이러한 공정은 부위-지정 또는 오류 유발 돌연변이 생성의 사용을 반복하여 오쏠로그에는 결합하지만 야생형 IL-2Rβ에는 결합하지 않는 차등적 결합 성질을 갖는 IL-2 변이체를 생성할 수 있다. 이러한 접근법을 사용하여 본 발명자들은 1) 효모-디스플레이 직교 IL-2 변이체의 온전한 구조적 완결성을 나타내는 IL-2Rα 사슬(녹색 곡선)에 대한 결합을 보유하고, 2) 직교 IL-2Rβ(오렌지색 곡선)에 결합하지만, 3) 야생형 IL-2Rβ(청색 곡선)에는 결합하지 않는 IL-2 오쏠로그의 라이브러리를 생성하였다.

[0122] 특성화된 직교 마우스 IL-2 변이체의 서열은 도 6에 도시된다. 마우스 IL-2 및 IL-2Rβ 및 인간 대응물의 정렬은 도 15에 도시된다. 이들 4개의 서열은 천연, 또는 야생형 서열에 대한 참조를 제공한다. 직교 마우스 IL-2/IL-2Rβ 쌍을 생성하도록 변경된 아미노산 잔기는 주로 인간에서 보존된다. 따라서, 직교 마우스 IL-2 및 IL-2Rβ 서열은 인간 IL-2 및 IL-2Rβ 단백질로 용이하게 번역될 수 있다.

[0123] 도 7에 도시된 바와 같이, 오쏘IL-2 변이체는 야생형 IL-2 및 IL-2Rβ 상호작용과 유사하거나 이보다 큰 친화력으로 오쏘IL-2Rβ에 결합한다. 용해성 직교 IL-2 또는 야생형 IL-2 단백질을 야생형 또는 오쏘IL-2Rβ로 코팅된 센서 칩 위에 흐르게 하였다. 결합을 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 측정하고, 1:1 결합 모델을 사용하여 곡선을 핏팅하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 오쏘IL-2 변이체는 야생형 CD25 양성 및 CD25 음성 비장세포에 대하여 약화된 활성(포스포STAT5)을 나타낸다.

[0124] 오쏘IL-2Rβ 발현 마우스 CTLL-2 T 세포의 생성이 도 9에 도시된다. 본 발명자들은 전장 직교 수용체를 인코딩하는 유전자에 의한 렌티바이러스 형질도입을 통해 직교 IL-2Rβ(오쏘CTLL-2)를 발현하는 불멸화된 마우스 T 세포주(CTLL-2)를 생성하였다. 형질도입된 세포는 형질도입되지 않은 세포에 대하여 독성인 푸로마이신에 의해 선택되었고, 이는 야생형 및 직교 IL-2Rβ 둘 다를 발현하는 안정한 CTLL-2 세포주를 야기한다. 이러한 세포주는 또한 CD25 및 CD132에 대하여 양성이고, 따라서 고친화력 IL-2 수용체 복합체를 발현하는 T 세포를 나타낸다. 세포 표면 IL-2Rβ(CD122)를 검출하는데 사용되는 항체는 야생형과 오쏘IL-2Rβ 사이에서 구별되지 않는다. 따라서, 야생형과 오쏘IL-2Rβ CTLL-2 세포 사이의 평균 형광 강도에서의 증가는 이들 세포가 직교 수용체를 발현한다는 것을 제시한다. 이는 오쏘IL-2Rβ를 발현하는데 사용되는 동일한 벡터에 의해 인코딩되는 푸로마이신에 대한 이들의 내성에 의해 추가로 지지된다.

[0125] 도 10에 도시된 바와 같이, 오쏘IL-2 변이체의 제1 세트는 오쏘 T 세포에 대하여 선택적이다. 직교 IL-2 신호전달을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 조작되지 않거나(야생형) 직교 IL-2Rβ(오쏘)를 발현하도록 형질도입된 우리의 CTLL-2 세포 모델을 이용하였다. 그 다음, 본 발명자들은 STAT5의 인산화를 유도할 수 있는 야생형 또는 다양한 직교 IL-2 클론의 능력을 측정하였다(IL-2 의존성 신호 변환의 정량적 판독). 본 발명자들은 야생형 세포와 비교하여 직교 IL-2Rβ 발현 세포에 대하여 선택적 STAT5 인산화를 유도하는 다수의 직교 IL-2 변이체를 확인하였다. 선택 클론을 위한 용량-반응 곡선은 도 11에 도시된다.

[0126] 오쏘IL-2Rβ(H134D Y135F)를 발현하도록 조작된 일차 림프절 유래 T 세포. 우리의 불멸화된 마우스 T 세포 모델 이외에, 본 발명자들은 또한 마우스 림프절 및 비장 세포의 단리, CD3/CD28에 의한 활성화 후, 전장 직교 수용체를 인코딩하는 유전자의 레트로바이러스 형질도입에 의하여 오쏘IL-2Rβ 발현 일차 마우스 T 세포를 생성하였다. 이러한 구성은 또한 IRES 후, 형광 단백질 YFP를 포함하고, 이는 FACS를 통하여 YFP 발현을 분석함으로써 형질동비의 확인을 허용한다. 마우스 T 세포는 또한 도 12에 도시된 바와 같이 고친화력 IL-2 수용체 복합체(예를 들면, CD25, CD122, 및 CD132)를 발현한다.

[0127] 오쏘IL-2 변이체는 도 13에 도시된 바와 같이 오쏘IL-2Rβ 발현 일차 마우스 T 세포에 대하여 선택적 STAT5 인산화를 유도한다.

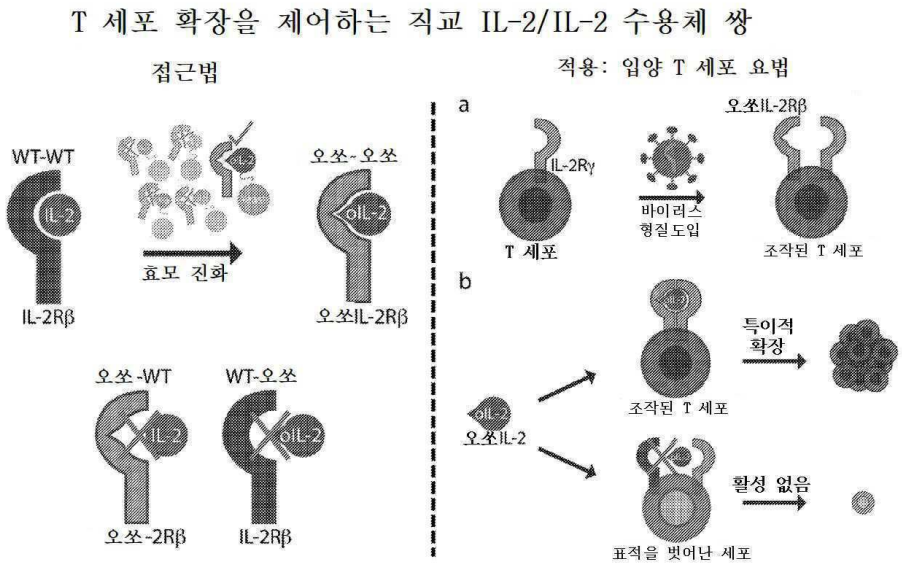
[0128] 오쏘IL-2Rβ(도 11)를 통해 선택적으로 신호를 전달하는 오쏘IL-2 변이체는 또한 야생형 CTLL-2 세포와 비교하여 오쏘IL-2Rβ를 발현하는 CTLL-2 세포의 선택적 확장을 유도한다(도 14).

[0129] 직교 IL-2 조작 접근법을 또한 인간 IL-2 및 인간 IL-2Rβ에 적용하였다. 이들 잔기가 마우스와 인간 사이에서 고도로 보존되기 때문에, 본 발명자들은 마우스 오쏘IL-2Rβ를 생성하는데 사용한 H133D Y134F 돌연변이를 인간 IL-2Rβ 내로 도입하였다. 실제로, 야생형 hIL-2Rβ는 효모-디스플레이 야생형 IL-2에 결합하는 반면, hIL-2Rβ H133D Y134F 돌연변이(오쏘-hIL-2Rβ)는 야생형 IL-2에 대한 검출 가능한 결합이 부재하였다(도 15). 본 발명자들은 H133D Y134F 돌연변이와 접촉하거나 이와 근접한 것으로 예측되는 잔기를 무작위화하고, 오쏘에 결합하지만 야생형 인간 IL-2Rβ에는 결합하지 않는 IL-2 변이체를 선택함으로써 효모의 표면에 디스플레이된 인간 IL-2 돌연변이의 라이브러리를 생성하였다. 이러한 계획은 마우스 IL-2 직교 쌍을 조작하는데 사용된 것과 동일하였고, 인간 쌍에 대하여 성공적이었다. 전략은 도 16에 도시된다. 돌연변이의 공통 세트는 도 16C에 도시된 바와 같이 오쏘 hIL-2Rβ에 결합할 수 있는 오쏘 hIL-2 서열의 집합을 나타내는 것으로 확인되었다.

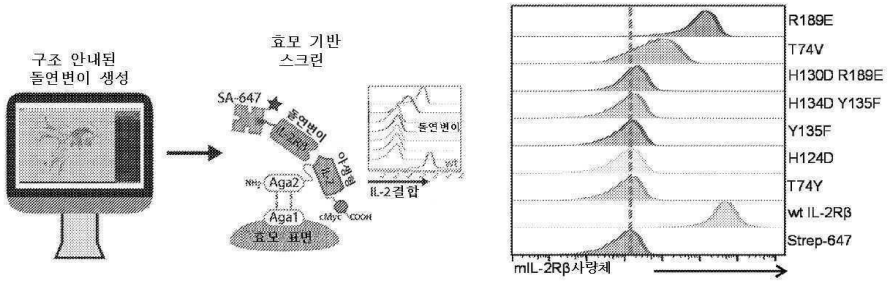
[0130] 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 생체내에서 활성이다. 마우스 모델은 도 17-19에 도시된 바와 같이 직교 IL-2Rb 발현 T 세포의 선택적 확장 또는 증가된 생존을 증명하는데 사용되었다. 마우스에서 오쏘IL-2 클론 1G12/149는 직교를 선택적으로 확장시키지만 야생형 T 세포에는 그렇지 않다는 것이 나타난다. 야생형 IL-2에 의한 처리는 PBS 대조군과 비교하여 야생형 및 오쏘 T 세포 둘 다의 확장을 야기하는 반면, 오쏘IL-2 클론 1G12/149에 의한 처리는 야생형 T 세포에 대하여 제한된 활성으로 오쏘 T 세포를 선택적으로 확장시킨다.

도면

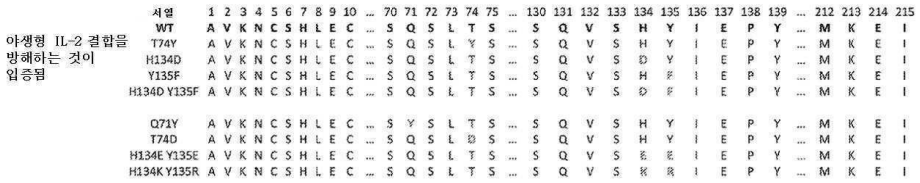
도면1



도면2

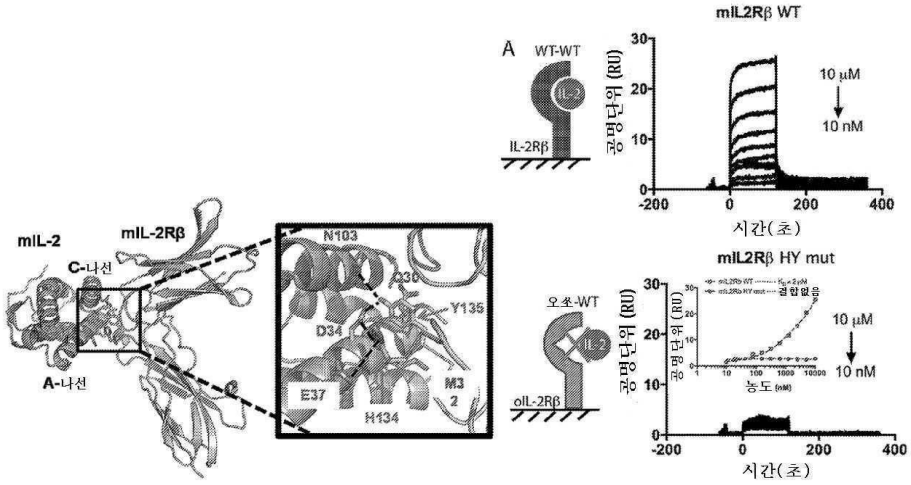


도면3

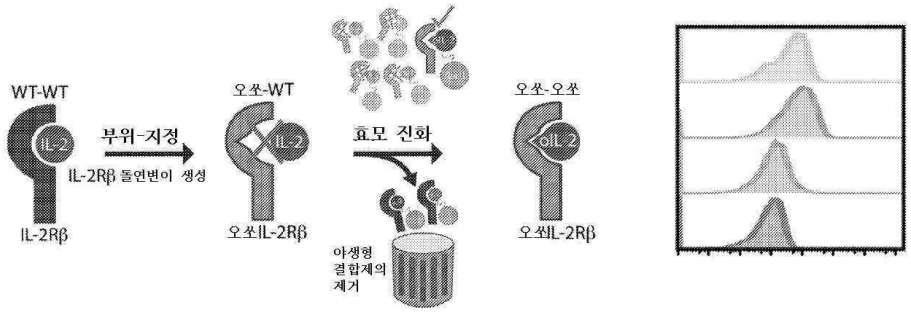


서열	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...	70	71	72	73	74	75	...	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	...	212	213	214	215
WT	**A**	**V**	**K**	**N**	**C**	**S**	**H**	**L**	**E**	**C**	...	**S**	**Q**	**S**	**L**	**T**	**S**	...	**S**	**Q**	**V**	**S**	**H**	**Y**	**I**	**E**	**P**	**Y**	...	**M**	**K**	**E**	**I**
T74Y	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	Y	S	...	S	Q	V	S	H	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
H134D	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	D	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
Y135F	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	H	F	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
H134D Y135F	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	D	F	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
Q71Y	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Y	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	H	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
T74D	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	D	S	...	S	Q	V	S	H	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
H134E Y135E	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	E	E	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
H134K Y135R	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	K	R	I	E	P	Y	...	M	K	E	I

도면4



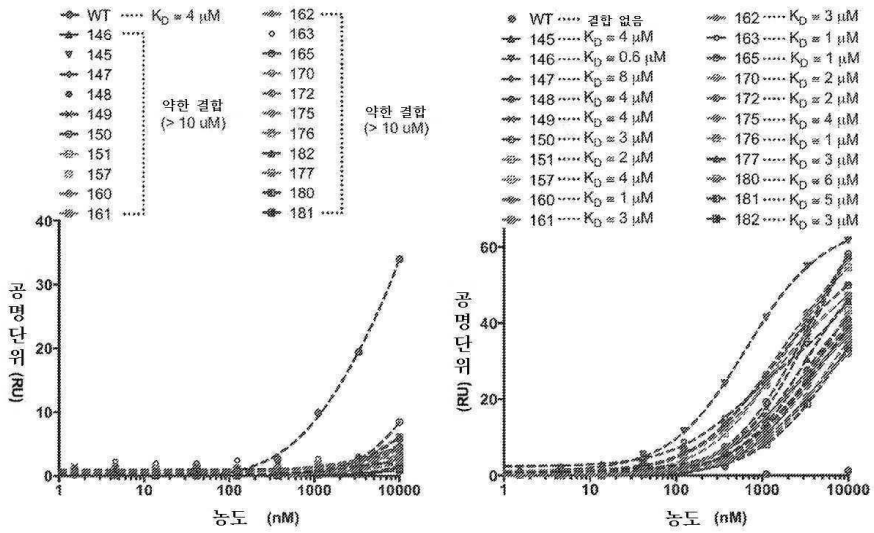
도면5



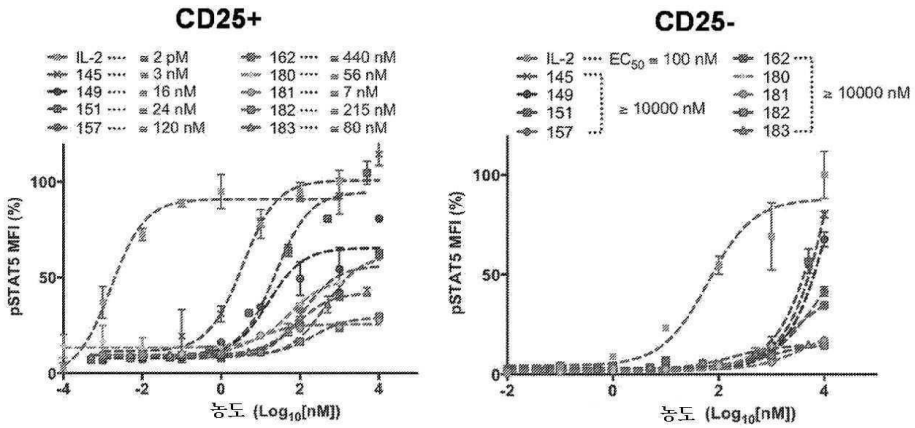
도면6

서열	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	...	100	101	102	103	104	105	...	145	146	147	148	149
WT IL-2	**H**	**L**	**E**	**Q**	**L**	**L**	**M**	**D**	**L**	**Q**	**E**	**L**	**L**	**S**	**R**	**M**	**E**	**N**	**Y**	...	**F**	**I**	**S**	**N**	**I**	**R**	...	**S**	**T**	**S**	**P**	**Q**
145	H	M	E	N	L	L	V	I	L	S	A	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
146	W	L	E	N	L	L	I	I	L	Q	W	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
147	H	W	E	N	L	L	V	I	L	Q	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
148	H	L	D	N	L	L	V	M	L	S	W	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
149	H	L	E	N	L	L	V	I	L	T	H	L	L	S	K	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
150	H	L	E	N	L	L	V	M	L	T	Y	L	L	S	S	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
151	H	L	E	N	L	L	V	M	L	S	W	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
157	H	L	D	N	L	L	V	I	L	K	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
160	H	L	F	N	L	L	V	M	L	Q	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
161	H	L	Q	N	L	L	V	M	L	M	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
162	H	L	D	N	L	L	V	I	L	T	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
163	H	L	D	N	L	L	A	M	L	T	F	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
165	H	L	D	N	L	L	V	M	L	Q	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	Q	I	R	...	S	T	S	P	Q
170	H	L	T	N	L	L	V	I	L	E	V	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
172	H	L	E	N	L	L	V	I	L	T	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
175	H	L	E	N	L	L	V	I	L	T	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
176	H	L	D	N	L	L	V	I	L	Q	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	Q	I	R	...	S	T	S	P	Q
177	H	L	D	N	L	L	V	I	L	T	A	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
180	H	L	D	N	L	L	I	I	L	Q	V	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
181	H	L	D	N	L	L	V	I	L	Q	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
182	H	L	D	N	L	L	V	I	L	K	A	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
183	H	L	A	N	L	L	V	I	L	E	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q

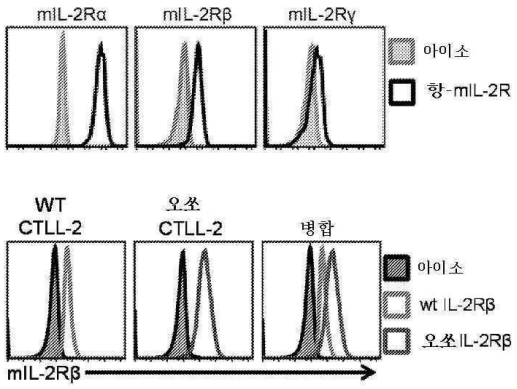
도면7


WT ····· KD ≈ 4 μM
146 ·····
145
147
148
149
150
151
157
160
161
약한 결합
(> 10 uM)
162 ·····
163
165
170
172
175
176
182
177
180
181 ·····
약한 결합
(> 10 uM)
공명단위 (RU)
농도 (nM)
WT ····· 결합 없음
145 ····· KD ≈ 4 μM
146 ····· KD ≈ 0.6 μM
147 ····· KD ≈ 8 μM
148 ····· KD ≈ 4 μM
149 ····· KD ≈ 4 μM
150 ····· KD ≈ 3 μM
151 ····· KD ≈ 2 μM
157 ····· KD ≈ 4 μM
160 ····· KD ≈ 1 μM
161 ····· KD ≈ 3 μM
162 ····· KD ≈ 3 μM
163 ····· KD ≈ 1 μM
165 ····· KD ≈ 1 μM
170 ····· KD ≈ 2 μM
172 ····· KD ≈ 2 μM
175 ····· KD ≈ 4 μM
176 ····· KD ≈ 1 μM
177 ····· KD ≈ 3 μM
180 ····· KD ≈ 6 μM
181 ····· KD ≈ 5 μM
182 ····· KD ≈ 3 μM
공명단위 (RU)
농도 (nM)

도면8


CD25+
IL-2 ····· ≈ 2 pM
145 ····· ≈ 3 nM
149 ····· ≈ 16 nM
151 ····· ≈ 24 nM
157 ····· ≈ 120 nM
162 ····· ≈ 440 nM
180 ····· ≈ 56 nM
181 ····· ≈ 7 nM
182 ····· ≈ 215 nM
183 ····· ≈ 80 nM
pSTAT5 MFI (%)
농도 (Log10[nM])
CD25-
IL-2 ····· EC50 ≈ 100 nM
145
149
151
157
≥ 10000 nM
162
180
181
182
183
≥ 10000 nM
pSTAT5 MFI (%)
농도 (Log10[nM])

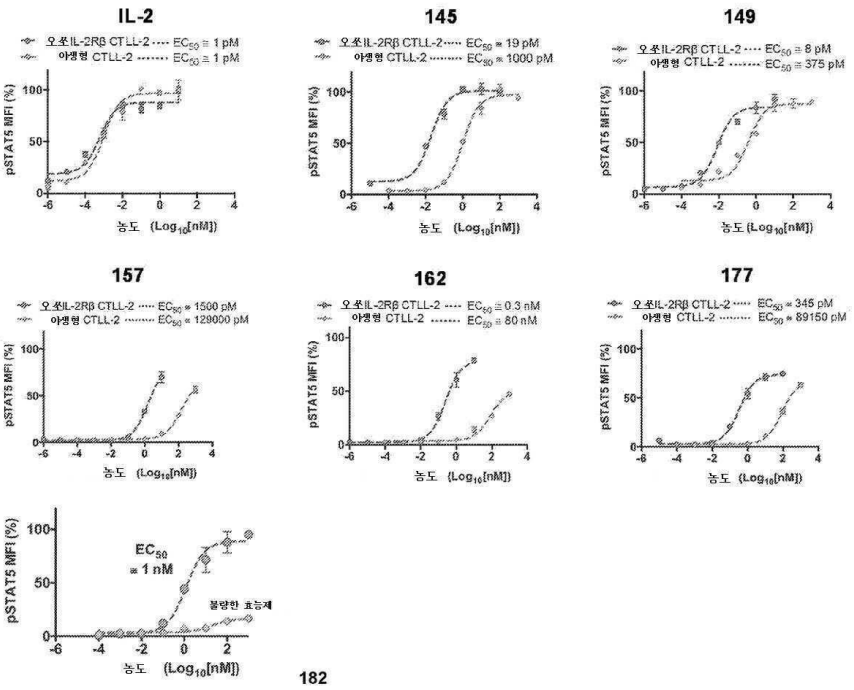
도면9


mIL-2Rα
mIL-2Rβ
mIL-2Rγ
아이소
항-mIL-2R
WT
CTLL-2
오쏘
CTLL-2
병합
아이소
wt IL-2Rβ
오쏘IL-2Rβ
mIL-2Rβ

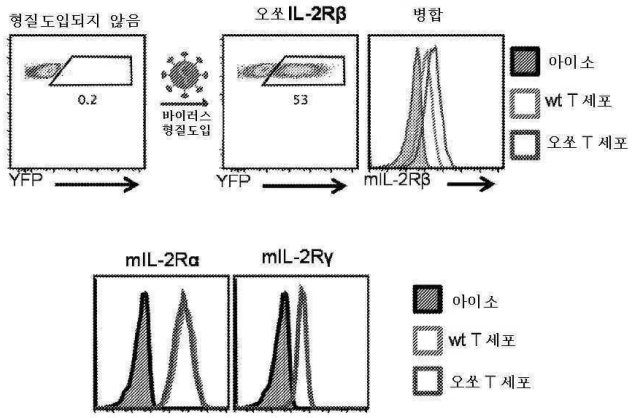
도면10

IL-2 클론	CTLL-2 T 세포주 EC_{50} 야생형 (pM)	EC_{50} 오조 (pM)	WT / 오조
WT	1.0	0.6	**2**
145	1021	20	**51**
146	40	2	**17**
147	15	1	**14**
148	4618	369	**13**
149	971	15	**67**
150	140	11	**12**
151	3382	53	**64**
157	129400	1543	**84**
160	16000	2021	**8**
161	19270	45760	**0**
162	80640	248	**325**
163	2104	1080	**2**
165	39780	21720	**2**
170	304	470	**1**
172	555	44	**13**
173	32830	9067	**4**
175	831	80	**10**
176	79220	15020	**5**
177	89150	345	**258**
180	1625	18	**89**
181	4555	67	**68**
182	5524	813	**7**
183	15400	1121	**14**

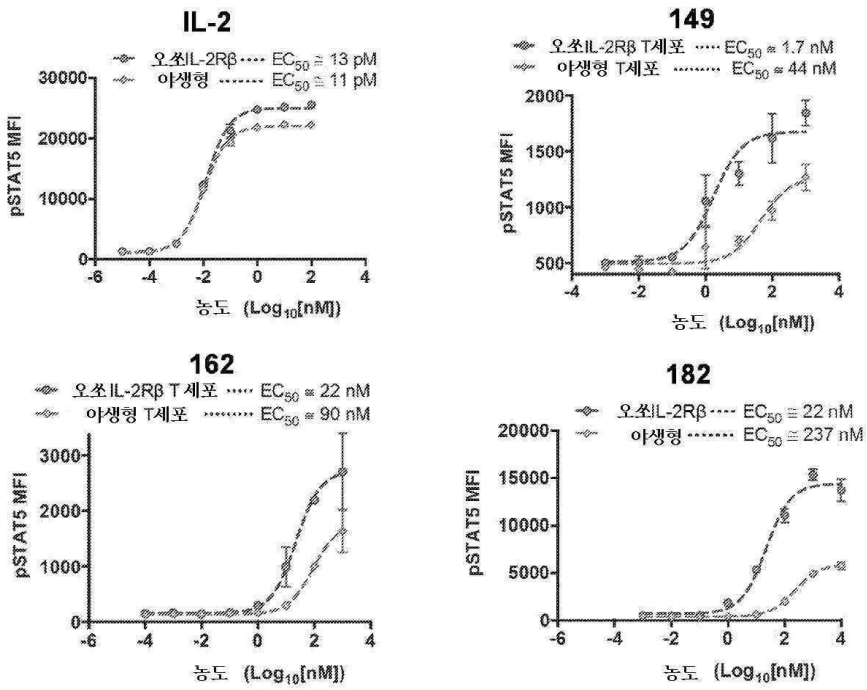
도면11



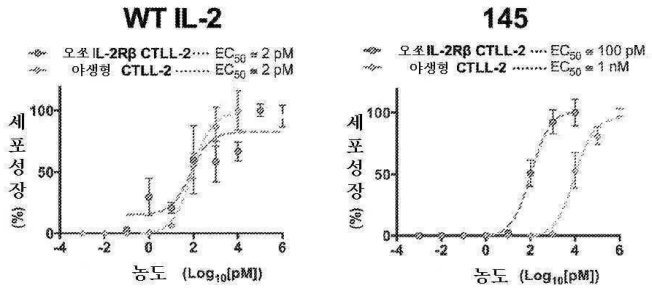
도면12



도면13



도면14



도면15

```
IL2RB_인간      1    AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWAC    60
IL2RB_마우스    1    AVKNCSHLECFYNSRANVSCMWSHEEALNVTTCHVHAKSNLRHWNKTCELTLVRQASWAC    60
                     **:  *:: ********:**:**:: **: *:*:***  : *:**:****  * ******

IL2RB_인간     61    NLILGA~PDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVET    119
IL2RB_마우스   61    NLILGSFPESQSLTSVDLLDINVVCWEEKGWRRVKTCDFHPFDNLRLVAPHSLQVLHIDT    120
                     *****: *:**.**:**:: :.*:* *   ** :   **:**:****:** ****:*::*

IL2RB_인간     120   HRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYE    179
IL2RB_마우스   121   QRCNISWKVSQVSHYIEPYLEFEARRLLGHSWEDASVLSLKQRQQWLFLEMLIPSTSYE    180
                     :******::**.***:* :******    **:**:* :*:***:*:*: ** * *.*.**

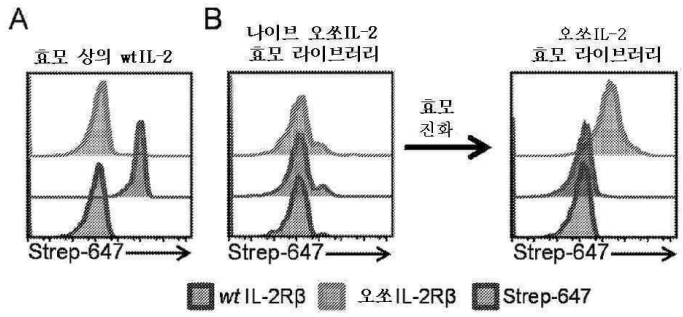
IL2RB_인간     180   FQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKD?~~IPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYL    237
IL2RB_마우스   181   VQVRVKAQRNNTGTWSPWSQPLTFRTRPADPMKEILPMSWLRYLLLVLGCFSGFFSCVYI    240
                     .*****  : :  *********:***:**   *:   : ** :**: *.   **:  **:

IL2_마우스       1    APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYL     60
IL2_인간         1    APTSS~~~~~~~~~~~~~~~~STKETQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM     46
                     *****                . :: * :***:**:*** :*. ::**:* ** ********:

IL2_마우스      61    PKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFEC    120
IL2_인간        47    PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP~RDLISNINVIVLELKGSETTFMC    105
                     **:*****.*****:** **.:**:*:***.*:*.  .::****.* *::****:.** *

IL2_마우스     121    QFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ                                149
IL2_인간       106    EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT~                                133
                     :: **:**:*:**.***:********
```

도면16



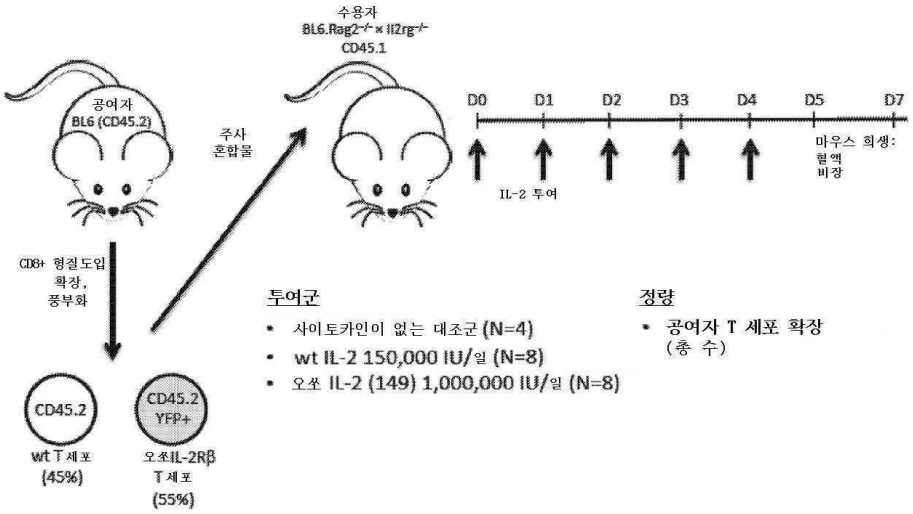
C

	15	16	19	20	22	23
WT	E	H	L	D	Q	M
C1	S	Q	V	T	K	L
C2	S	Q	V	S	K	L
C3	S	Q	V	S	K	L
C4	S	Q	I	S	K	L
C5	S		V	M	K	S
C6	T	Q	V	S		S
C7	Q		V	M	K	S
C8	Q	Q	V	T	K	V
C9	H	Q	I	S	K	L
C10	H	Q	I	L	K	T
C11			V	M	N	S

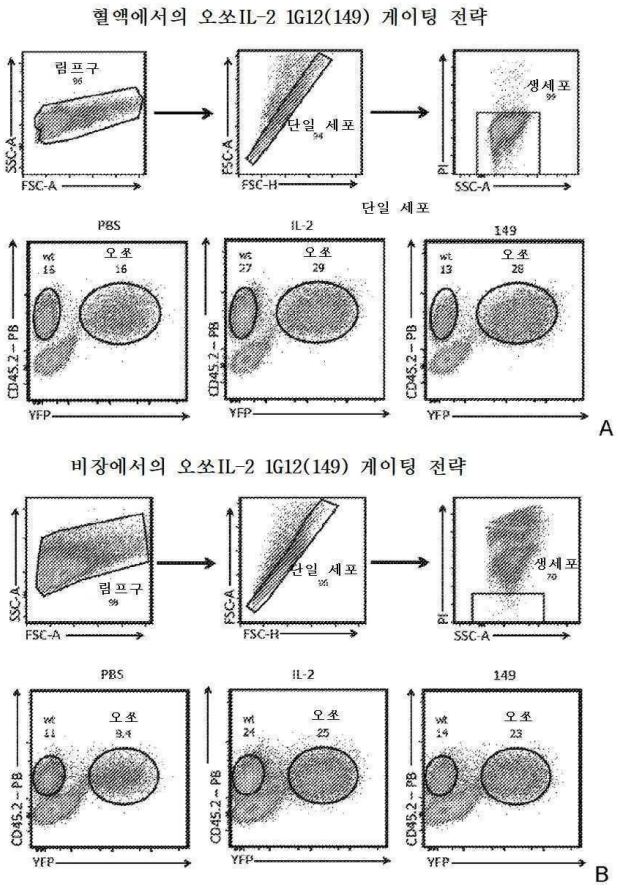
D

	15	16	19	20	23
WT	E	H	L	D	M
C1	H	Q	S	I	E
C2	T	Q	V	T	I
C3	T	Q	I	T	I
C4	T	Q	I	T	T
C5	D	N	I	M	F
C6	S	Q	V	L	Q
C7	K	Q	I	T	V
C8	I	Q	I	S	T
C9	K	Q	V	M	L
C10	K	Q	V	T	L
C11	V	Q	V	S	L
C12		N	V	M	A
C13	K		I	M	Q
C14	S	Q	V	L	V

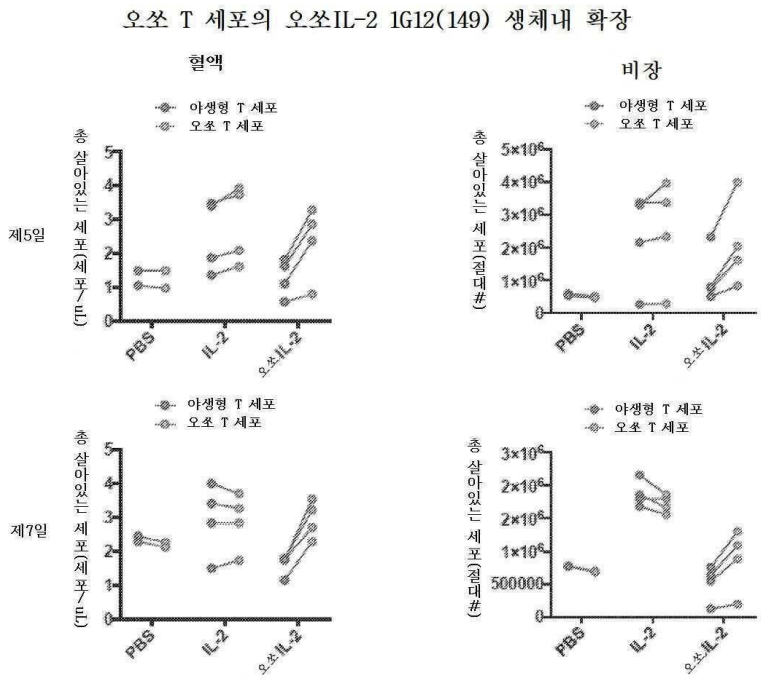
도면17


수용자
BL6.Rag2-/- x Il2rg-/-
CD45.1
공여자
BL6 (CD45.2)
주사
혼합물
D0
D1
D2
D3
D4
D5
D7
IL-2 투여
마우스 희생:
혈액
비장
CD8+ 형질도입
확장,
풍부화
CD45.2
wt T 세포
(45%)
CD45.2
YFP+
오쏘IL-2Rβ
T 세포
(55%)
투여군
사이토카인이 없는 대조군 (N=4)
wt IL-2 150,000 IU/일 (N=8)
오쏘 IL-2 (149) 1,000,000 IU/일 (N=8)
정량
공여자 T 세포 확장
(총 수)

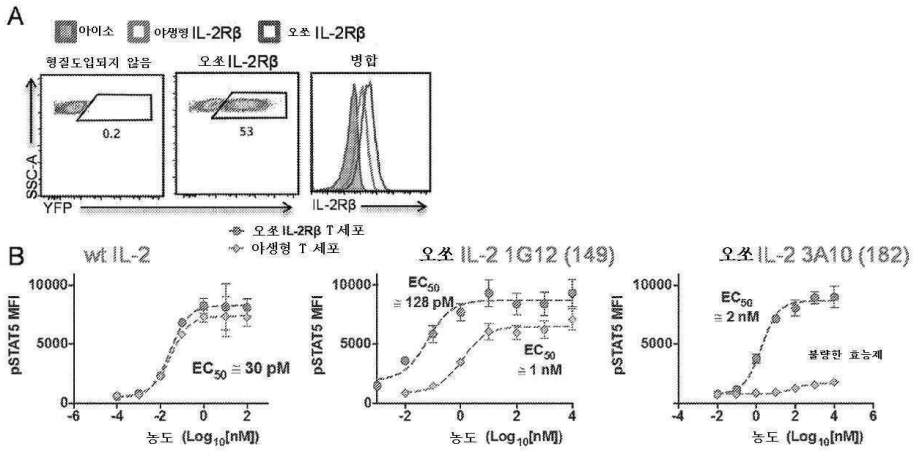
도면18


혈액에서의 오쏘IL-2 1G12(149) 게이팅 전략
림프구
단일 세포
생세포
SSC-A
FSC-A
FSC-H
PI
단일 세포
PBS
IL-2
149
wt
오쏘
CD45.2 - PB
YFP
A
비장에서의 오쏘IL-2 1G12(149) 게이팅 전략
림프구
단일 세포
생세포
PBS
IL-2
149
B

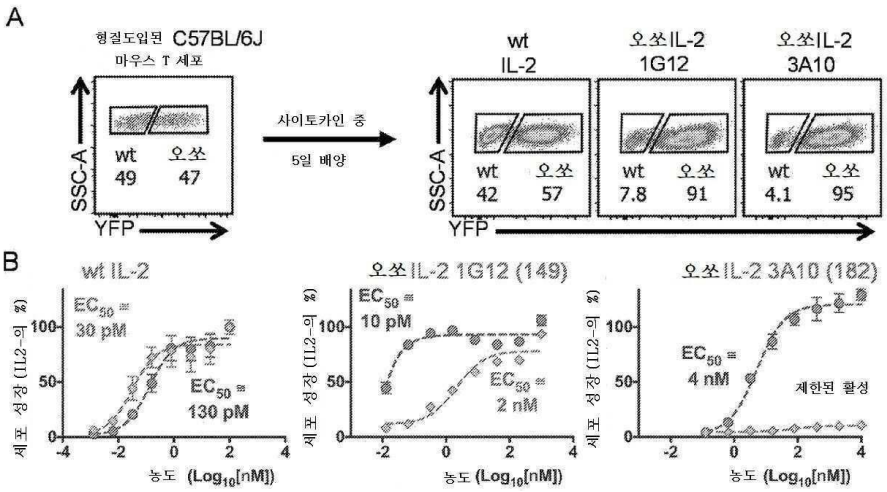
도면19


오쏘 T 세포의 오쏘IL-2 1G12(149) 생체내 확장
혈액
비장
아생형 T 세포
오쏘 T 세포
총 살아있는 세포(세포/튜)
총 살아있는 세포(절대#)
제5일
제7일
PBS
IL-2
오쏘IL-2

도면20


A
아이소
야생형 IL-2Rβ
오쏘 IL-2Rβ
형질도입되지 않음
오쏘 IL-2Rβ
병합
0.2
53
SSC-A
YFP
IL-2Rβ
B
오쏘 IL-2Rβ T 세포
야생형 T 세포
wt IL-2
오쏘 IL-2 1G12 (149)
오쏘 IL-2 3A10 (182)
pSTAT5 MFI
EC50 ≅ 30 pM
EC50 ≅ 128 pM
EC50 ≅ 1 nM
EC50 ≅ 2 nM
불량한 효능제
농도 (Log10[nM])

도면21


A
형질도입된 C57BL/6J
마우스 T 세포
SSC-A
YFP
wt
오쏘
49
47
사이토카인 중
5일 배양
wt IL-2
오쏘IL-2 1G12
오쏘IL-2 3A10
42
57
7.8
91
4.1
95
B
wt IL-2
오쏘IL-2 1G12 (149)
오쏘IL-2 3A10 (182)
EC50 ≅ 30 pM
EC50 ≅ 130 pM
EC50 ≅ 10 pM
EC50 ≅ 2 nM
EC50 ≅ 4 nM
제한된 활성
세포 성장 (IL2-의 %)
농도 (Log10[nM])