

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6800219号
(P6800219)

(45) 発行日 令和2年12月16日 (2020. 12. 16)

(24) 登録日 令和2年11月26日 (2020. 11. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/62 (2006. 01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z
C 1 2 N 15/24 (2006. 01)	C 1 2 N 15/24
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)	C 1 2 N 15/12
C O 7 K 14/54 (2006. 01)	C O 7 K 14/54
C O 7 K 14/715 (2006. 01)	C O 7 K 14/715

請求項の数 11 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-514889 (P2018-514889)	(73) 特許権者	591100596
(86) (22) 出願日	平成28年9月15日 (2016. 9. 15)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(65) 公表番号	特表2018-527011 (P2018-527011A)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(43) 公表日	平成30年9月20日 (2018. 9. 20)		ディカル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/071759		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開番号	W02017/046200		ュ・ドゥ・トルビアック 101
(87) 国際公開日	平成29年3月23日 (2017. 3. 23)	(73) 特許権者	507421289
審査請求日	令和1年6月14日 (2019. 6. 14)		ユニヴェルシテ・ドゥ・ナント
(31) 優先権主張番号	15306418.3		フランス国、44000 ナント、ケ・ド
(32) 優先日	平成27年9月16日 (2015. 9. 16)		ゥ・トゥルヴィル 1
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(73) 特許権者	512259891
			ユニベルシテ アンジェ
			フランス国、エフー49035 アンジェ
			セデ 01, リュ ドゥ レンヌ, 40

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチド並びに炎症疾患及び自己免疫疾患の処置のためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 5 又は配列番号 6 からなる本発明の特異的なインターロイキン - 15 (IL - 15) アンタゴニストポリペプチドを含む、特異的な IL - 15 アンタゴニストポリペプチド。

【請求項 2】

免疫グロブリンドメインに融合させた、請求項 1 記載の特異的な IL - 15 アンタゴニストポリペプチド。

【請求項 3】

免疫グロブリンドメインが免疫グロブリン定常ドメイン (Fc 領域) である、請求項 2 記載の特異的な IL - 15 アンタゴニストポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 記載の特異的なインターロイキン - 15 (IL - 15) アンタゴニストポリペプチドをコードしている核酸。

【請求項 5】

請求項 4 記載の核酸を含むベクター。

【請求項 6】

請求項 4 及び / 又は請求項 5 記載の核酸によってトランスフェクトされた、感染した、又は形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 1 記載の特異的なインターロイキン - 15 (I L - 15) アンタゴニストポリペプチドを含む、医薬組成物。

【請求項 8】

患者における免疫応答を抑制するための請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9】

患者が自己免疫疾患を患う、請求項 8 記載の医薬組成物。

【請求項 10】

患者が、急性散在性脳脊髄炎 (A D E M)、急性壊死性出血性白質脳炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗 G B M / 抗 T B M 腎炎、抗リン脂質抗体症候群 (A P S)、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性肝炎、自己免疫性高脂血症、自己免疫性免疫不全症、自己免疫性内耳疾患 (A I E D)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性脾炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病 (A T P)、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性蕁麻疹、軸索性及び神経性神経障害、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、自己免疫性心筋症、キャスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性疲労症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (C I D P)、慢性再発性多発性骨髄炎 (C R M O)、シャーグ・ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡 / 良性粘膜類天疱瘡、クローン病、コーガン病、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキー心筋炎、クレスト病、本態性混合型クリオグロブリン血症、脱髄性神経障害、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病 (視神経脊髄炎)、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、実験的アレルギー性脳脊髄炎、エヴァンス症候群、線維筋痛症、線維性肺肺炎、巨細胞性動脈炎 (側頭動脈炎)、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管炎性肉芽腫症 (G P A)、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、高ガンマグロブリン血症、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P)、I g A 腎症、I g G 4 関連硬化症、免疫調節性リボタンパク質、封入体筋炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病 (1 型)、間質性膀胱炎、若年性関節炎、川崎症候群、ランバート・イートン症候群、白血球破壊性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状 I g A 病 (L A D)、ループス (S L E)、ライム病、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織病 (M C T D)、意義不明の単クローン性 γ グロブリン血症 (M G U S)、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎 (デビック病)、自己免疫性好中球減少症、眼部癬痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ、P A N D A S (連鎖球菌感染性小児自己免疫神経精神障害)、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (P N H)、パリー・ロムベルグ症候群、パーソナー・ジュ・ターナー症候群、毛様体扁平部炎 (周辺性ブドウ膜炎)、天疱瘡、末梢神経障害、静脈周囲性脳脊髄炎、悪性貧血、P O E M S 症候群、結節性多発動脈炎、多腺性自己免疫症候群 1 型、2 型及び 3 型、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レイノー現象、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、再発性多発軟骨炎、下肢静止不能症候群、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、類肉腫症、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精子及び精巣自己免疫、全身硬直症候群、亜急性細菌性心内膜炎 (S B E)、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞性動脈炎、血小板減少性紫斑病 (T T P)、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織病 (U C T D)、ブドウ膜炎、血管炎、小水疱水疱性皮膚病、白斑、ワルデンストレームマクログロブリン血症 (W M)、並びにウェゲナー肉芽腫症 [多発血管炎性肉芽腫症 (G P A)] からなる群より選択される自己免疫疾患を患う、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 11】

移植片生着を促進するための、及び移植片対宿主疾患の患者を処置するための請求項 9

10

20

30

40

50

記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

本発明は、特異的なインターロイキン - 15 (I L - 15) アンタゴニストポリペプチド並びに炎症疾患及び自己免疫疾患の処置のためのその使用に関する。

【0002】

発明の背景：

I L - 2 及び I L - 15 は、リンパ球の恒常性及び機能の重要な調節因子である γ c サイトカインファミリー (I L - 2、4、7、9、15 及び 21) に属する。それらは、リンパ球の増殖及び生存を促進する潜在性を有し、したがって全体的に主に適応免疫応答を増強する。どちらのサイトカインも、それぞれ、2つの受容体サブユニットである C D 122 及び C D 132、すなわち β 鎖及び共通の γ c 鎖を共有する。I L - 2 は、C D 122 と C D 132 から構成される二量体受容体又は C D 25 と C D 122 と C D 132 から構成される三量体受容体のいずれかへの結合を通してその多面的な活性を発揮する。例えば、C D 25 と C D 122 と C D 132 の複合体は、高い親和性 ($K_a = 10^{-11} M^{-1}$) で I L - 2 に結合し、そして活性化 T 細胞及び制御性 T 細胞上に存在する (T r e g ; C D 3 + C D 4 + C D 25 + F o x p 3 +)。C D 25 は、T r e g 細胞において高いレベルで構成的に発現され、それによりそれらは非常に低いバックグラウンドレベルの I L - 2 を利用することができる。I L - 2 とは対照的に、I L - 15 は、細胞間の接触を通して作用する膜結合型サイトカインである。インビボにおける主な I L - 15 のシグナル伝達機序は、ヘテロ二量体 C D 122 / C D 132 受容体への I L - 15 R α (C D 215) による I L - 15 のトランス提示である。C D 25 とは異なり、I L - 15 R α は、非常に高い親和性 ($K_a = 10^{-11} M^{-1}$) で I L - 15 に結合し、これは完全な I L - 15 受容体の存在下でもさらに増加せず、すなわち、I L - 15 は、C D 25 に対する I L - 2 と比較して、I L - 15 R α に対して 100 倍高い親和性を有する。I L - 15 R α は、T 細胞、NK 細胞、NK T 細胞、B 細胞、DS、単球、及びマクロファージ上に、並びに、胸腺及び B M 間質細胞株に発現される。I L - 2 及び I L - 15 は、適応免疫系及び自然免疫系の両方において多くの機能を共有する。なぜなら、どちらのサイトカインも、同じ C D 122 / C D 132 受容体ヘテロ二量体を通してシグナルを伝達するからである。どちらのサイトカインも、自然免疫及び適応免疫において中心的な役割を果たす。初期のインビトロにおける実験は、2つのサイトカインの効果において大きな機能的な重複を示したが (活性化リンパ球及び NK 細胞の増殖及び細胞毒性の誘導、B 細胞の増殖及び免疫グロブリン合成の共刺激、並びに T 細胞の化学物質誘引)、追加の実験は、それらがインビボにおいて補完的な作用又はさらには相反的な作用さえ発揮し得ることを示した。マウスにおける I L - 2 又は I L - 2 R α のノックアウトは、活性化 T 細胞及び B 細胞個体群の増加を伴う自己免疫表現型に関連していたが、I L - 15 及び I L - 15 R α ノックアウトは、NK 細胞、NK - T 細胞、上皮内リンパ球、及び記憶 C D 8 T 細胞の特異的異常を生じた。さらに、I L - 2 は、活性化により誘発される細胞死を誘発することによって、末梢性トレランスを促進する。I L - 2 は、T r e g 細胞の発達及び機能にとって確かに重要であるが、I L - 15 は、I L - 2 により媒介される活性化により誘発される細胞死を阻害し、そして I L - 2 とは異なり、I L - 15 は、C D 8 記憶 T 細胞に対する生存因子である。これらの観察と一致して、I L - 2 の主な役割は活性化 T 細胞の持続的な増殖を制限することであり、一方、I L - 15 は、T 細胞の分裂開始及び記憶 T 細胞の生存にとって重要であることが示唆されている。I L - 15 の高い発現レベルは、クローン病、乾癬、白血病、関節リウマチ (R A)、及び移植片拒絶のような自己免疫疾患及び炎症疾患の発病に関連している。したがって、I L - 15 の調節因子は、治療分野において高い関心を示す。I L - 15 及び I L - 15 R α - スシが可動性リンカーによって付着している融合タンパク質 (R L I 及び I L R) が、リンパ球のサブセットの増殖のため

10

20

30

40

50

の強力なアジュバントとして記載された (Mortier E. et al. J Biol Chem. 2006 Jan 20;281(3):1612-9及び国際公開公報第2007046006号)。IL-15アンタゴニストは、炎症疾患を処置するための潜在的な治療薬であり得、そしていくつかのIL-15アンタゴニストが先行技術において記載されている。例えば、Ferrari-Lacraz S.等は、免疫グロブリンのFcドメインに融合させたIL-15突然変異体からなるIL-15アンタゴニストを記載し、そして該アンタゴニストが関節リウマチの処置に有用であり得ることを実証した (Ferrari-Lacraz S. et al. J Immunol. 2004 Nov 1;173(9):5818-26)。しかしながら、先行技術に記載されたIL-15アンタゴニストはまた、IL-2のシグナル伝達経路に潜在的に拮抗し、したがって、それらがインビボにおいて注射された場合、有害な副作用 (例えばトレランスに関する) を伴う可能性がある。

10

【0003】

発明の概要：

本発明は、特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチド並びに炎症疾患及び自己免疫疾患の処置のためのその使用に関する。特に、本発明は特許請求の範囲によって定義される。

【0004】

発明の詳細な説明：

本発明者らは驚くべきことに、101位又は108位の少なくとも1つのグルタミン (Q) 残基を突然変異させたMortier E. et al. J Biol Chem. 2006 Jan 20;281(3):1612-9及び国際公開公報第2007046006号に記載のRLI融合タンパク質が、IL-15アンタゴニストとして作用するが、インターロイキン-2のシグナル伝達経路に拮抗しないことを示す。このポリペプチドは、一般的なIL-2R β /g受容体に標的化する最初の特異的なIL-15アンタゴニストであり、したがって、先行技術に記載のIL-15アンタゴニストを上回る巨大な利点を与える。なぜなら、それはIL-2のシグナル伝達経路に依存する制御性T細胞 (Treg細胞) の恒常性に影響を及ぼすことなく、IL-15によって媒介されるNK細胞の増殖を阻害することができるからである。

20

【0005】

したがって、本発明は、i) 配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一率を有するアミノ酸配列を含むIL15-R α スシ含有ポリペプチド、ii) リンカー、及びiii) 配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一率を有するアミノ酸配列を含むIL-15ポリペプチド (ただし108位のグルタミン (Q) 残基は突然変異している) を含む、特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチドに関する。

30

【0006】

本明細書において使用する「特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチド」という表現は、IL-2のシグナル伝達経路に拮抗することなく、IL-15のシグナル伝達経路を阻害することができるポリペプチドを指す。

【0007】

本発明によると、第二のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一率を有する第一のアミノ酸配列とは、第一の配列が、第二のアミノ酸配列に対して80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99又は100%の同一率を有することを意味する。

40

【0008】

配列同一性は、同一率 (又は類似率又は相同率) に換算して頻繁に測定され; 比率が高くなればなるほど、2つの配列は類似している。比較のための配列のアラインメント法は当技術分野において周知である。様々なプログラム及びアラインメントアルゴリズムがSmith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene, 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS, 5:151-153, 1989; Corpet et al. Nuc. Acids Res., 16:10881-10890, 1988; Huang et al.,

50

Comp. Appls Biosci., 8:155-165, 1992; 及びPearson et al., Meth. Mol. Biol., 24:307-31, 1994に記載されている。Altschul et al., Nat. Genet., 6:119-129, 1994は、配列アラインメント法及び相同性の計算についての詳細な考察を提示する。例えば、アラインメントツールのA L I G N (Myers and Miller, CABIOS 4:11-17, 1989) 又はL F A S T A (Pearson and Lipman, 1988) を使用して配列比較 (インターネットプログラム (登録商標) 1996, W. R. Pearson及びバージニア大学、f a s t a 2 0 u 6 3 バージョン 2 . 0 u 6 3、発売日1996年12月) を行なうことができる。A L I G Nは、全配列を互いに比較するが、L F A S T Aは局所的な類似領域を比較する。これらのアラインメントツール及びそれらのそれぞれのチュートリアルは、例えば、インターネットのN C S A ウェブサイトで入手することができる。あるいは、約30アミノ酸より大きなアミノ酸配列の比較のために、デフォルトパラメーター (ギャップ存在コスト11、及び残基ごとのギャップコスト1) に設定されたデフォルトB L O S U M 6 2マトリクスを使用してB l a s t 2配列関数を使用してもよい。短いペプチド (約30アミノ酸より少ない) をアラインさせる場合、アラインメントは、デフォルトパラメーター (オープンギャップ9、エクステンションギャップ1のペナルティー) に設定されたP A M 3 0マトリクスを使用して、B l a s t 2配列関数を使用して実施されるべきである。B L A S T配列比較システムは、例えば、N C B Iウェブサイトから入手することができる; Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990; Gish. & States, Nature Genet., 3:266-272, 1993; Madden et al. Meth. Enzymol., 266:131-141, 1996; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997; 及びZhang & Madden, Genome Res., 7:649-656, 1997 も参照されたい。

【0009】

本発明によると、I L 1 5 - R α スシ含有ポリペプチド、リンカー、及びI L - 1 5 ポリペプチドはインフレームで融合し、ここでI L - 1 5 R α スシ含有ポリペプチドのC末端は、リンカーのN末端に融合し、そしてリンカーのC末端は、I L - 1 5 ポリペプチドのN末端に融合している。

【0010】

本明細書において使用する「リンカー」という用語は当技術分野におけるその一般的な意味を有し、そして該タンパク質が適切な二次構造及び三次構造を確実に形成するのに十分な長さのアミノ酸配列を指す。

【0011】

いくつかの実施態様では、リンカーは、少なくとも1つ、しかし30個未満のアミノ酸を含むペプチドリinker、例えば、2~30アミノ酸、好ましくは10~30アミノ酸、より好ましくは15~30アミノ酸、さらにより好ましくは19~27アミノ酸、最も好ましくは20~26アミノ酸のペプチドリinkerである。いくつかの実施態様では、該リンカーは、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個のアミノ酸残基を有する。典型的には、リンカーは、該化合物が適切なコンフォメーション (すなわち、I L - 1 5 R β / γ シグナル伝達経路を通じた適切なシグナル伝達活性を可能とするコンフォメーション) をとることを可能とするものである。最も適切なリンカー配列は、(1) 可動性の伸長されたコンフォメーションをとり、(2) 融合タンパク質の機能的ドメインと相互作用する可能性のある規則的な二次構造を発生させる傾向を示さず、そして(3) 機能的タンパク質ドメインとの相互作用を促進する可能性のある疎水性又は荷電特徴を最小限有するだろう。可動性タンパク質領域における典型的な表面アミノ酸としては、G l y、A s n、及びS e r (すなわち、G、N、又はS) が挙げられる。実質的に、G l y、A s n、及びS e rを含有しているアミノ酸配列のあらゆる並べ替えが、リンカー配列に対する上記の基準を満たすことが予想されるだろう。他の中性に近いアミノ酸、例えばT h r、A l a、L e u、G l n (すなわち、T、A、L、Q) もリンカー配列に使用され得る。リンカー配列の長さは、融合タンパク質の生物学的活性に有意な影響を及ぼすことなく変更され得る。治療目的で使用される場合、リンカーは

好ましくは、非免疫原性である。例示的なリンカー配列は、米国特許第 5, 073, 627 号及び第 5, 108, 910 号に記載されている。

【0012】

いくつかの実施態様では、本発明のリンカーは、配列番号 2 又は配列番号 3 のアミノ酸配列からなる。

【0013】

本明細書において使用する突然変異という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、そして置換、欠失又は挿入を指す。「置換」という用語は、特定の位置における特定のアミノ酸残基が除去され、そして別のアミノ酸残基が同位置に挿入されることを意味する。「欠失」という用語は、特定のアミノ酸残基が除去されることを意味する。「挿入」という用語は、1 つ以上のアミノ酸残基が、特定のアミノ酸残基の前又は後に挿入され、より具体的には、1 つ以上、好ましくは 1 つ又はいくつかのアミノ酸残基が、特定の

10

【0014】

いくつかの実施態様では、108 位のグルタミン (Q) 残基は、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、リジン (K)、セリン (S)、トレオニン (T)、アスパラギン (N)、システイン (C)、アラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、ロイシン (L)、プロリン (P)、メチオニン (M)、及びトリプトファン (W) からなる群より選択されるアミノ酸残基によって置換されている。いくつかの実施態様では、108 位のグルタミン (Q) 残基はアスパラギン酸 (D) 残基によって置換されている。

20

【0015】

いくつかの実施態様では、IL-15 ポリペプチドの 101 位のグルタミン (Q) 残基も突然変異している。いくつかの実施態様では、101 位のグルタミン (Q) 残基は、アスパラギン酸 (D) 残基、リジン (K)、及びトリプトファン (W) からなる群より選択されるアミノ酸残基によって置換されている。いくつかの実施態様では、101 位のグルタミン (Q) 残基は、アスパラギン酸 (D) 残基によって置換されている。

【0016】

いくつかの実施態様では、101 位及び 108 位の両方のグルタミン (Q) 残基が置換されている。いくつかの実施態様では、101 位及び 108 位の両方のグルタミン (Q) 残基がアスパラギン酸 (D) 残基によって置換されている。

30

【0017】

いくつかの実施態様では、本発明の特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチドは、配列番号 5 又は配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一率を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様では、本発明の特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチドは、配列番号 5 又は配列番号 6 からなる。

【0018】

いくつかの実施態様では、本発明の特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチドは免疫グロブリンドメインに融合し、よってイムノアドヘシンを形成する。本明細書において使用する「イムノアドヘシン」という用語は、本発明の特異的なインターロイキン-15 (IL-15) アンタゴニストポリペプチドの結合特異性と、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を組み合わせた、抗体様分子を示す。いくつかの実施態様では、イムノアドヘシン内の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン、例えば IgG-1、IgG-2、IgG-3、又は IgG-4 サブタイプ、IgA (IgA-1 及び IgA-2 を含む)、IgE、IgD、又は IgM から得ることができる。いくつかの実施態様では、免疫グロブリン配列は、免疫グロブリン定常ドメイン (Fc 領域) である。イムノアドヘシンは、ヒト抗体の価値ある化学的及び生物学的特性の多くを有し得る。イムノアドヘシンは、適切なヒト免疫グロブリンヒンジ及び定常ドメイン (Fc) 配列に連結させた所望の特異性を有するヒトタンパク質配列から構築され得るので、関心対象の結合特異性は、全てヒト成分を使用して達成することが

40

50

できる。このようなイムノアドヘシンは、患者にとって最低限の免疫原性であり、そして慢性使用又は反復使用に対して安全である。当業者は、最も適切なFcドメインを容易に選択することができる(Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nat Rev Immunol. 2010 May;10(5):301-16. doi: 10.1038/nri2761. Review)。いくつかの実施態様では、Fc領域は、補体との結合及び/又はFc受容体への結合を阻害する突然変異を含むか又は含まない(Zheng et al, Transplantation. 2006 Jan 15;81(1):109-16)。いくつかの実施態様では、Fc領域は、天然配列のFc領域である。いくつかの実施態様では、Fc領域は変異Fc領域である。いくつかの実施態様では、Fc領域は、機能的Fc領域である。本明細書において使用する「Fc領域」という用語は、天然配列のFc領域及び変異Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化し得るが、ヒトIgG重鎖のFc領域は通常、Cys226位のアミノ酸残基から、又はPro230から、そのカルボキシル末端までにおよぶと定義される。いくつかの実施態様では、イムノアドヘシンの接着部分及び免疫グロブリン配列部分は、最小限のリンカーによって連結されている。

【0019】

本発明によると、本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドは、慣用的な自動ペプチド合成法によって又は組換え発現によって生成される。タンパク質を設計及び製造するための一般的な原則は、当業者には周知である。本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドは、慣用的な技術に従って溶液中又は固体支持体上で合成され得る。様々な自動合成装置が市販され、そしてStewart and Young; Tam et al., 1983; Merrifield, 1986 and Barany and Merrifield, Gross and Meienhofer, 1979に記載のような公知のプロトコールに従って使用され得る。本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドはまた、アプライドバイオシステムズ社製のモデル433Aなどの例示的なペプチド合成装置を使用して固相技術によって合成され得る。自動ペプチド合成を通して又は組換え法を通して生成されたあらゆる所与のタンパク質の純度は、逆相HPLC分析を使用して決定され得る。各ペプチドの化学的信憑性は、当業者には周知である任意の方法によって確立され得る。自動ペプチド合成の代替選択肢として、組換えDNA技術を使用し得、この技術では、選択されたタンパク質をコードするヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に形質転換又はトランスフェクトし、そして本明細書において以下に記載のような発現に適した条件下で培養する。組換え法は、より長いポリペプチドを生成するのに特に好ましい。様々な発現ベクター/宿主系が、ペプチド又はタンパク質をコードする配列を含有及び発現させるのに使用され得る。これらとしては、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌; 酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母(Giga-Hama et al., 1999); ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス、Ghosh et al., 2002参照)を用いて感染させた昆虫細胞系; ウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)を用いてトランスフェクトされた又は細菌発現ベクター(例えばTi又はpBR322プラスミド; 例えばBabe et al., 2000参照)を用いて形質転換された植物細胞系; 又は動物細胞系が挙げられるがこれらに限定されない。当業者は、哺乳動物によるタンパク質の発現を最適化させるための様々な技術を知っている。例えば、Kaufman, 2000; Colosimo et al., 2000を参照されたい。組換えタンパク質生成において有用である哺乳動物細胞としては、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、COS細胞(例えばCOS-7)、W138、BHK、HePG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、及び293細胞が挙げられるがこれらに限定されない。細菌、酵母及び他の無脊椎動物におけるペプチド基質又は融合ポリペプチドの組換え発現のための例示的なプロトコールは当業者には公知であり、そして本明細書において以下に簡潔に記載されている。組換えタンパク質の発現のための哺乳動物宿主系もまた当業者には周知である。宿

10

20

30

40

50

主細胞株は、発現タンパク質をプロセッシングする、又はタンパク質の活性を与える際に有用であろう特定の翻訳後修飾を生じる、特定の能力のために選択され得る。ポリペプチドのこのような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化が挙げられるがこれらに限定されない。「プレプロ」形のタンパク質を切断する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、フォールディング及び/又は機能にとって重要であり得る。CHO、HeLa、MDCK、293、WI38などの様々な宿主細胞が、このような翻訳後活性のための特定の細胞機構及び特徴的な機序を有し、そして導入された外来タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にするために選択され得る。

【0020】

いくつかの実施態様では、本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドは、それらの治療効力を改善させるために修飾されることが考えられる。治療化合物のこのような修飾は、毒性を低下させるか、循環時間を延長させるか、又は体内分布を改変するために使用され得る。例えば、潜在的に重要である治療化合物の毒性は、体内分布を改変させる様々な薬物担体ビヒクルと組み合わせることによって有意に減少させることができる。薬物の寿命を改善するための戦略は、水溶性ポリマーの使用である。様々な水溶性ポリマーが、体内分布を改変し、細胞による取り込み形態を改善し、生理学的バリアを通る透過性を変化させ、そして体内からの消失速度を改変させることが示された。標的化効果又は持続的放出効果のいずれかを達成するために、末端基として、骨格の一部として、又はポリマー鎖上の釣り下がった基として薬物部分を含有する水溶性ポリマーが合成されている。例えば、PEG化は、広範なポリペプチドの修飾のための十分に確立されかつ検証されたアプローチである。利点としては、とりわけ、(a)ポリマーが糸球体ろ過限界値を超えるまで分子の見かけのサイズを増加させる結果として、腎クリアランスを回避するために、及び/又は細胞による消失機序の回避を通して、インビボにおいて顕著に改善された循環半減期；(b)PEGの付着した分子の低下した抗原性及び免疫原性；(c)改善された薬物動態；(d)タンパク質分解に対するコンジュゲートタンパク質の増強された抵抗性；並びに(e)PEG化ポリペプチドの改善された熱的安定性及び力学的安定性が挙げられる。

【0021】

本発明の別の目的は、本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドをコードしている単離されたか、合成の、又は組換えの核酸に関する。

【0022】

本明細書において使用する「核酸」という用語は当技術分野におけるその一般的な意味を有し、そしてDNA分子又はRNA分子を指す。しかしながら、該用語は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチル-アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、及び2,6-ジアミノプリンなどであるがこれらに限定されない、公知のDNA及

びRNAの塩基類似体のいずれかを含む配列も含む。

【0023】

いくつかの実施態様では、本発明の核酸は、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージ、又はウイルスベクターなどの任意の適切なベクターに含められ得る、DNA分子又はRNA分子である。「ベクター」、「クローニングベクター」及び「発現ベクター」という用語はビヒクルであって、これによってDNA配列又はRNA配列（例えば外来遺伝子）を宿主細胞に導入し、よって宿主を形質転換し、そして導入された配列の発現（例えば転写及び翻訳）を促進することができるビヒクルを意味する。

【0024】

よって、本発明の別の目的は、本発明の核酸を含むベクターに関する。

10

【0025】

このようなベクターは、被験者に投与されると前記ポリペプチドの発現を引き起こすか又は指令する、プロモーター、エンハンサー、終結因子などの調節因子を含み得る。ベクターはさらに、1つ又はいくつかの複製起点及び/又は選択マーカーを含み得る。プロモーター領域は、コード配列に対して同質であっても異種であってもよく、そしてインビボにおける使用を含む、任意の適切な宿主細胞において、遍在的な、構成的な、調節された、及び/又は組織特異的な発現をもたらし得る。プロモーターの例としては、細菌プロモーター（T7、pTAC、Trpプロモーターなど）、ウイルスプロモーター（LTR、TK、CMV-IEなど）、哺乳動物遺伝子プロモーター（アルブミン、PGKなど）などが挙げられる。プラスミドの例としては、複製起点を含む複製プラスミド、又は例えばpUC、pcDNA、pBRなどの組み込み型プラスミドが挙げられる。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、及びAAVベクターが挙げられる。このような組換えウイルスは、パッケージング細胞のトランスフェクトによって、又はヘルパープラスミド若しくはウイルスを用いての一過性トランスフェクションによってなどの、当技術分野において公知である技術によって生成され得る。ウイルスパッケージング細胞の典型例としては、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞などが挙げられる。このような複製欠損組換えウイルスを生成するための詳細なプロトコールは、例えば、国際公開公報第95/14785号、国際公開公報第96/22378号、米国特許第5,882,877号、米国特許第6,013,516号、米国特許第4,861,719号、米国特許第5,278,056号、及び国際公開公報第94/19478号に見られ得る。

20

30

【0026】

本発明の別の目的は、本発明に記載の核酸分子及び/又はベクターによってトランスフェクトされたか、感染したか、又は形質転換された宿主細胞に関する。「形質転換」という用語は、宿主細胞への「外来」（すなわち外因性又は細胞外）遺伝子、DNA配列又はRNA配列の導入を意味し、よって宿主細胞は導入された遺伝子又は配列を発現して、導入された遺伝子又は配列によってコードされる所望の物質、典型的にはタンパク質又は酵素を生成するだろう。導入されたDNA又はRNAを受け取りそして発現する宿主細胞は「形質転換」されている。

【0027】

40

本発明の核酸分子を使用して、適切な発現系において本発明の特異的なインターロイキン-15（IL-15）アンタゴニストポリペプチドを生成し得る。「発現系」という用語は、例えばベクターによって担持されそして宿主細胞に導入された外来DNAによってコードされるタンパク質の発現のために適した条件下の宿主細胞及び適格なベクターを意味する。一般的な発現系としては、E.coli宿主細胞及びプラスミドベクター、昆虫宿主細胞及びバキュロウイルスベクター、並びに哺乳動物宿主細胞及びベクターが挙げられる。宿主細胞の他の例としては、原核細胞（例えば細菌）及び真核細胞（例えば酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など）が挙げられるがこれらに限定されない。具体例としては、E.coli、クリイペロマイセス（*Kluyveromyces*）又はサッカロマイセス（*Saccharomyces*）酵母、哺乳動物細胞株（例えばVerob細胞、CHO細胞、3T

50

3細胞、C O S細胞など)並びに初代又は樹立された哺乳動物細胞培養液(例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞などから生成)が挙げられる。本発明による発現ベクターの構築、及び宿主細胞の形質転換は、慣用的な分子生物学技術を使用して実施され得る。本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドは、例えば、本発明に従って遺伝子的に形質転換された細胞を培養し、そして該細胞によって発現されたポリペプチドを培養液から回収することによって得ることができる。それらは、次いで、必要であれば、例えば分画沈降法、特に硫酸アンモニウム沈降法、電気泳動法、ゲルろ過、アフィニティクロマトグラフィーなどによる、当業者にはそれ自体が公知である慣用的な手順によって精製され得る。特に、組換えタンパク質を調製しそして精製するための慣用的な方法が、本発明に記載のポリペプチドを生成するために使用され得る。したがって、本発明はまた、本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドを発現している組換え宿主細胞を生成するための方法に関し、該方法は、(i)インビトロ又はエキスピボにおいて上記のような組換え核酸又はベクターを適格な宿主細胞に導入し、(ii)インビトロ又はエキスピボにおいて得られた組換え宿主細胞を培養し、そして(iii)場合により、本発明のポリペプチドを発現及び/又は分泌する細胞を選択することからなる工程を含む。このような組換え宿主細胞は、本発明のポリペプチド及び融合タンパク質の生成のために使用され得る。本発明はさらに、本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドを生成する方法に関し、該方法は、(i)本発明に記載の形質転換された宿主細胞を、該ポリペプチド又は融合タンパク質の発現を可能とするに適した条件下で培養し;そして(ii)発現されたポリペプチド又は融合タンパク質を回収することからなる工程を含む。

【0028】

本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドは、自己免疫疾患及び炎症疾患の処置をはじめとする治療目的に特に適している。

【0029】

したがって、本発明のさらなる目的は、薬物としての使用のための本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドに関する。

【0030】

本発明のさらなる目的は、ある用量の本発明の特異的なインターロイキン-15(IL-15)アンタゴニストポリペプチドを投与し、これによりIL-15依存性免疫応答を調節することによって、患者における免疫応答を抑制する方法に関する。

【0031】

特に、本発明の方法は、自己免疫疾患を患っている患者を処置するのに適している。自己免疫疾患の例としては、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、急性壊死性出血性白質脳炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗GBM/抗TBM腎炎、抗リン脂質抗体症候群(APS)、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性肝炎、自己免疫性高脂血症、自己免疫性免疫不全症、自己免疫性内耳疾患(AIED)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性膵炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ATP)、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性蕁麻疹、軸索性及び神経性神経障害、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、自己免疫性心筋症、キャッスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性疲労症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、慢性再発性多発性骨髄炎(CRMO)、シャグ・ストラウス症候群、癰疽性類天疱瘡/良性粘膜類天疱瘡、クローン病、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキー心筋炎、クレスト病、本態性混合型クリオグロブリン血症、脱髄性神経障害、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病(視神経脊髄炎)、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、実験的アレルギー性脳脊髄炎、エヴァンス症候群、線維筋痛症、線維性肺炎、巨細胞性動脈炎(側頭動脈炎)、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管炎性肉芽腫症(GPA)、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本脳炎、橋本甲状腺炎

、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、高ガンマグロブリン血症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、IgG4関連硬化症、免疫調節性リボタンパク質、封入体筋炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病（1型）、間質性膀胱炎、若年性関節炎、川崎症候群、ランバート・イートン症候群、白血球破壊性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状IgA病（LAD）、ループス（SLE）、ライム病、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織病（MCTD）、意義不明の単クローン性γグロブリン血症（MGUS）、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎（デビック病）、自己免疫性好中球減少症、眼部瘢痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ、PANDAS（連鎖球菌感染性小児自己免疫神経精神障害）、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、パリー・ロムベルグ症候群、パーソナー・ジュ・ターナー症候群、毛様体扁平部炎（周辺性ブドウ膜炎）、天疱瘡、末梢神経障害、静脈周囲性脳脊髄炎、悪性貧血、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、多腺性自己免疫症候群1型、2型及び3型、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レイノー現象、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、再発性多発軟骨炎、下肢静止不能症候群、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、類肉腫症、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精子及び精巣自己免疫、全身硬直症候群、亜急性細菌性心内膜炎（SBE）、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、血小板減少性紫斑病（TTP）、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織病（UCTD）、ブドウ膜炎、血管炎、小水疱水疱性皮膚病、白斑、ワルデンストレームマクログロブリン血症（WM）、並びにウェグナー肉芽腫症〔多発血管炎性肉芽腫症（GPA）〕が挙げられるがこれらに限定されない。

【0032】

より特定すると、本発明の方法は、以下：（1）リウマチ疾患、例えば関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、強皮症、混合結合組織疾患、皮膚筋炎、多発性筋炎、ライター症候群、又はベーチェット病、（2）2型糖尿病、（3）甲状腺の自己免疫疾患、例えば橋本甲状腺炎又はグレース病、（4）中枢神経系の自己免疫疾患、例えば多発性硬化症、重症筋無力症、又は脳脊髄炎、（5）様々な天疱瘡、例えば尋常性天疱瘡、増殖性天疱瘡、落葉性天疱瘡、シニアー・アッシャー症候群、又はブラジル天疱瘡、（6）乾癬、及び（7）炎症性腸疾患（例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病）が挙げられるがこれらに限定されない、自己免疫疾患を患っている患者を処置するのに特に適している。

【0033】

本発明の特異的なインターロイキン-15（IL-15）アンタゴニストポリペプチドの投与はまた、後天性免疫不全症候群（エイズ）の処置にも有用であり得る。

【0034】

本発明の特異的なインターロイキン-15（IL-15）アンタゴニストポリペプチドの別の用途としては、後期のHTLV（ヒトTリンパ球向性ウイルス）1型により誘発された成人T細胞白血病-リンパ腫の処置が挙げられる。Burton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91:4935（1994）を参照されたい。

【0035】

いくつかの実施態様では、本発明の方法は、臓器移植片、組織移植片、又は細胞移植片などの生物学的材料の移植片を受けた患者を処置するために使用される。例えば、本発明の特異的なインターロイキン-15（IL-15）アンタゴニストポリペプチドは、移植片生着（同種移植片又は異種移植片）を促進するのに特に適し得る。典型的には、被験者は、心臓、腎臓、肺、肝臓、脾臓、脾臓、脳組織、胃、大腸、小腸、角膜、皮膚、気管、骨、骨髄、筋肉、又は膀胱からなる群より選択される移植片を移植されていてもよい。本発明の方法はまた、レシピエント被験者による、ドナー組織移植片、細胞移植片、又は臓

10

20

30

40

50

器移植片の拒絶に関連した免疫応答を予防又は抑制するのに特に適している。移植片関連疾患又は障害としては、骨髄移植に関連しているなどの移植片対宿主疾患（GVHD）、並びに、例えば皮膚、筋肉、神経、膵島、臓器、肝臓の実質細胞の移植片をはじめとする、臓器、組織又は細胞の移植片（例えば組織又は細胞の同種移植片又は異種移植片）の移植の拒絶から生じた又は関連した免疫障害が挙げられる。したがって、本発明の方法は、宿主対移植片疾患（HVGD）及び移植片対宿主疾患（GVHD）の予防に有用である。本発明の特異的なインターロイキン - 15（IL - 15）アンタゴニストポリペプチドは、移植前、移植の最中、及び／又は移植後に被験者に投与され得る（例えば、移植の少なくとも1日前、移植の少なくとも1日後、及び／又は移植手術それ自体の最中）。いくつかの実施態様では、本発明の特異的なインターロイキン - 15（IL - 15）アンタゴニストポリペプチドは、移植前及び／又は移植後に周期的に被験者に投与されてもよい。

10

【0036】

典型的には、本発明の特異的なインターロイキン - 15（IL - 15）アンタゴニストポリペプチドは典型的には治療有効量で投与される。「治療有効量」によって、任意の医学的処置に適用可能な妥当なベネフィット／リスク比で疾患を治療及び／又は予防するのに十分な本発明の融合タンパク質又はアンタゴニスト量を意味する。本発明の化合物及び組成物の1日総使用量は、妥当な医学的判断の範囲内で担当の医師によって決定されるであろうことが理解されるだろう。任意の特定の患者に対する具体的な治療有効用量レベルは、処置される疾患及び疾患の重症度；使用される具体的な化合物の活性；使用される具体的な組成、患者の年齢、体重、全般的な健康状態、性別、及び食事；使用される具体的な化合物の投与時刻、投与経路、及び排泄速度；処置期間；使用される具体的なポリペプチドと組み合わせて又は同時に使用される薬物；並びに医学分野において周知である同様な要因をはじめとする、様々な要因に依存するだろう。例えば、所望の治療効果を達成するのに必要とされるよりも低いレベルで化合物の用量を開始し、そして所望の効果が達成されるまで次第に投与量を増加させることは、当技術分野の技能の範囲内において周知である。しかしながら、製品の1日投与量は、1日あたり成人1人あたり0.01～1,000mgまでの幅広い範囲にわたり変更され得る。好ましくは、該組成物は、処置しようとする患者への症候による投与量の調整のために、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250及び500mgの活性成分を含有している。医薬品は典型的には、約0.01mg～約500mgの活性成分、好ましくは1mg～約100mgの活性成分を含有している。薬物の有効量は通常、0.0002mg/kg（体重）/日～約20mg/kg（体重）/日、特に約0.001mg/kg（体重）/日～7mg/kg（体重）/日の投与量レベルで供給される。

20

30

【0037】

本発明のさらなる目的は、場合により薬学的に許容される担体又は賦形剤と共に本発明の特異的なインターロイキン - 15（IL - 15）アンタゴニストポリペプチドを含む、医薬組成物に関する。「薬学的に」又は「薬学的に許容される」は、哺乳動物、特にヒトに適宜投与された場合に、有害反応、アレルギー反応、又は他の望ましくない反応を生じない分子実体及び組成物を指す。薬学的に許容される担体又は賦形剤は、任意の種類の無毒性固体、半固体、又は液体充填剤、希釈剤、封入材料、又は製剤化助剤を指す。経口、舌下、皮下、筋肉内、静脈内、経皮、局所、又は直腸投与用の本発明の医薬組成物において、活性成分は単独で又は別の活性成分と組み合わせて、単位投与剤形で、慣用的な薬学的支持体との混合物として、動物及びヒトへと投与することができる。適切な単位投与剤形としては、経口経路剤形、例えば錠剤、ゲルカプセル剤、散剤、顆粒剤、及び経口用懸濁剤又は液剤、舌下及び頬側投与剤形、エアゾール剤、埋込剤、皮下、経皮、局所、腹腔内、筋肉内、静脈内、皮下、経皮、くも膜下腔内、及び鼻腔内投与剤形、及び直腸投与剤形を含む。好ましくは、医薬組成物は、注射することのできる製剤にとって薬学的に許容可能であるビヒクルを含有する。これらは特に、等張の無菌食塩水溶液（リン酸一ナトリウム若しくはリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、若しくは塩化マグネシウムなど、又はこのような塩の混合物）、又は、場合に応じて滅菌水

40

50

若しくは生理食塩水を投与すると注射液の構成が可能となる乾燥させた、特に凍結乾燥させた組成物であり得る。注射用途に適した剤形としては、無菌水溶液又は分散液；ゴマ油、ピーナツ油、又は水性プロピレングリコールを含む製剤；及び無菌注射溶液又は分散液の即時調製のための無菌粉末が挙げられる。全ての場合において、剤形は無菌でなければならない、そしてシリンジが容易に扱える程度に流動性でなければならない。それは、製造及び保存の条件下で安定でなければならない、そして細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から防腐されていなければならない。遊離塩基又は薬理学的に許容される塩として本発明の化合物を含む溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で調製され得る。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びその混合物中、並びに油中において調製されてもよい。通常の保存及び使用条件下において、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐための保存剤を含有する。本発明の特異的なインターロイキン - 15 (IL - 15) アンタゴニストポリペプチドは、中性すなわち塩の形態の組成物へと製剤化されてもよい。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩（これはタンパク質の遊離アミノ基を用いて形成される）が挙げられ、これは、例えば塩酸若しくはリン酸などの無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸を用いて形成される。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩はまた、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、又は水酸化鉄などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から誘導され得る。担体はまた、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、適切なその混合物、及び植物油を含有している、溶媒又は分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散液の場合には必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防御は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。注射用組成物の延長吸収は、該組成物に、吸収を遅延する物質、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを使用することによってもたらされ得る。無菌注射液は、必要量の活性ポリペプチドを、適切な溶媒中に、必要であれば上記に列挙されたいくつかの他の成分と共に取り込み、その後、滅菌ろ過することによって調製される。一般的には、分散液は、様々な滅菌された活性成分を、基本分散媒体と上記に列挙された成分の中からの必要とされる他の成分とを含有する無菌ビヒクルに取り込むことによって調製される。無菌注射液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製法は真空乾燥技術及び凍結乾燥技術であり、これにより、事前に滅菌ろ過されたその溶液から活性成分と任意の追加の所望の成分の粉末が生じる。製剤化されると、液剤は、投与製剤に適合した様式で、治療的に有効な量で投与されるだろう。製剤は、上記の種類の注射液などの様々な投与剤形で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなども使用され得る。水溶液での非経口投与のために、例えば、液剤は、必要であれば適切に緩衝化されるべきであり、そして液体希釈剤はまず、十分な食塩水又はブドウ糖を用いて等張とされるべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内投与に特に適している。これに関連して、使用され得る無菌水性媒体は、本開示に鑑みて当業者には公知であろう。例えば、1回投与量を1mlの等張NaCl溶液に溶かし、そして1000mlの皮下点滴療法用の液体に加え得るか又は提案された注入部位に注射し得る。投与量の幾分の変更が、処置される被験者の容態に応じて必然的に行なわれるだろう。投与責任者は、いずれの事象においても、個々の被験者に対する適切な用量を決定するだろう。本発明の特異的なインターロイキン - 15 (IL - 15) アンタゴニストポリペプチドは、治療用混合物内において、1回の用量あたり、約0.0001 ~ 1.0 mg、又は約0.001 ~ 0.1 mg、又は約0.1 ~ 1.0、又はさらには約10 mgなどを含むように製剤化され得る。複数回の用量を投与してもよい。静脈内又は筋肉内注射などの、非経口投与用に製剤化された本発明の化合物の他に、他の薬学的に許容される剤形としては、例えば、経口投与用の錠剤又は他の固形剤；リボソーム製剤；

10

20

30

40

50

徐放性カプセル剤；及び現在使用されるあらゆる他の剤形が挙げられる。

【0038】

本発明は、以下の図面及び実施例によってさらに説明されるだろう。しかしながら、これらの実施例及び図面は、いずれにしても、本発明の範囲を制限するものと解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】細胞増殖に対する突然変異RLI又は突然変異IL-15の効果。Kit-225細胞(A)、TF-1β細胞(B)及びNK-92細胞(C)を、漸増濃度のIL-15(■)、RLI(●)、RLI 101-108(▲)、RLI 65-69-101-108()、RLI 65()と共に72時間培養した。Kit-225細胞(D)及びNK-92細胞(E)を、漸増濃度のIL-15(■)、IL-15 101(○)又はIL-15 108()と共に72時間培養した。細胞増殖はアラマブルー(登録商標)アッセイによって定量された。

10

【図2】RLIにより誘発された細胞増殖に対する突然変異RLIの効果。Kit-225細胞(A)、TF-1β細胞(B)及びNK-92細胞(C)を、一定濃度のRLI(Kit-225及びTF-1βについては40pM；NK-92については10pM)及び漸増濃度のRLI 101-108(■)、RLI 65-69-101-108(○)又はRLI 65(●)と共に72時間培養した。細胞増殖はアラマブルー(登録商標)アッセイによって定量された。

20

【図3】IL-15により誘発された細胞増殖に対する突然変異RLIの効果。Kit-225細胞(A)、TF-1β細胞(B)及びNK-92細胞(C)を、一定濃度のIL-15(Kit-225については80pM、TF-1β及びNK-92については40pM)及び漸増濃度のRLI 101-108(■)、RLI 65-69-101-108(○)又はRLI 65(●)と共に72時間培養した。細胞増殖はアラマブルー(登録商標)アッセイによって定量された。

【図4】IL-15又はIL-2により誘発された細胞増殖に対する突然変異IL-15の効果。Kit-225細胞(左パネル)及びNK-92細胞(右パネル)を、一定濃度のIL-15(A)又はIL-2(B)(Kit-225については80pM及びNK-92については40pM)及び漸増濃度のRLI 101-108(■)、IL-15 101(●)又はIL-15 108(○)と共に72時間培養した。細胞増殖はアラマブルー(登録商標)アッセイによって定量された。

30

【図5】IL-2 Rα遮断抗体の存在下におけるIL-2により誘発された細胞増殖に対する突然変異RLIの効果。Kit-225細胞(A)又はNK-92細胞(B)を、一定濃度のIL-2(それぞれ500又は80pM)、33B3.1遮断抗体(5nM)及び漸増濃度のRLI 101-108(■)又はRLI 65-69-101-108(○)と共に72時間培養した。細胞増殖はアラマブルー(登録商標)アッセイによって定量された。

【図6】IL-15又はIL-2によるNK-92細胞の簡潔な刺激前の、突然変異RLIの効果。NK-92細胞を、IL-15(A)又はIL-2(B)(40pM)を用いて30分間かけて刺激する前に、200nMの突然変異RLIと共に30分間インキュベートした。次いで、細胞を、24時間培養し、そして細胞増殖をアラマブルー(登録商標)アッセイによって定量した。

40

【図7】IL-15又はIL-2によるNK-92細胞の簡潔な刺激後の、突然変異RLIの効果。NK-92細胞を、1nMのIL-15(A)又はIL-2(B)と共に30分間インキュベートした。2回洗浄した後、細胞を、一定濃度の突然変異RLI(200nM)と共に24時間培養した。細胞増殖はアラマブルー(登録商標)アッセイによって定量された。

【図8】NK-92細胞の代謝活性の伝搬に対する、突然変異RLIの効果。NK-92細胞を、IL-15(A)又はIL-2(B)(1nM)を用いて30分間かけて刺激した

50

。2回洗浄した後、刺激された細胞を、突然変異 R L I (5 0 nM) の存在下においてサイトカインを飢餓させた N K - 9 2 細胞と共に 2 4 時間培養した。細胞増殖はアラマブルー (登録商標) アッセイによって定量された。

【図 9】 N K 及び C D 4 T - r e g の恒常性に対する突然変異 R L I のインビボにおける効果。 P B S 又は突然変異 R L I を、毎日 3 日間注射した (注射 1 回につき 2 μ g) 。マウスを 1 日後に屠殺した。脾臓及び骨髄を回収し、そして細胞を単離した。 N K 細胞は、 N K 1 . 1 + C D 3 - として同定され、そして T - r e g 細胞は C D 3 + C D 4 + C D 2 5 + F o x P 3 + であった。

【図 10】 I L - 1 5 のアンタゴニスト特性に対する Q 1 0 1 位又は Q 1 0 8 位における異なる突然変異の予測される効果に基づいた分子モデリング。

10

【図 11 A - C】固定された C D 1 2 2 鎖 (A 及び C) 又は F c - I L - 1 5 R α 鎖 (B 及び D) に対する、漸増濃度 (3 . 1、6 . 2、1 2 . 5、2 5、5 0 及び 1 0 0 nM) の示された分子の結合 (会合相及び解離相) の S P R センサーグラム。 (E) 固定された C D 1 2 2 鎖に対して漸増濃度の野生型 R L I 又は R L I _{Q 1 0 8 D} が結合し、続いて C D 1 3 2 鎖が順次結合する S P R センサーグラム。

【図 11 D - E】固定された C D 1 2 2 鎖 (A 及び C) 又は F c - I L - 1 5 R α 鎖 (B 及び D) に対する、漸増濃度 (3 . 1、6 . 2、1 2 . 5、2 5、5 0 及び 1 0 0 nM) の示された分子の結合 (会合相及び解離相) の S P R センサーグラム。 (E) 固定された C D 1 2 2 鎖に対して漸増濃度の野生型 R L I 又は R L I _{Q 1 0 8 D} が結合し、続いて C D 1 3 2 鎖が順次結合する S P R センサーグラム。

20

【図 12 A】 (A) 遮断性 T U - 2 7 又は非遮断性 C F - 1 抗 C D 1 2 2 m A b によって判明した、 R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} により前処置された N K - 9 2 細胞の表面上における C D 1 2 2 発現のフローサイトメトリー分析。 (B) N K - 9 2 細胞に結合する示された分子と、放射性ヨウ素化された野生型 R L I (1 nM) との競合試験。

【図 12 B】 (A) 遮断性 T U - 2 7 又は非遮断性 C F - 1 抗 C D 1 2 2 m A b によって判明した、 R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} により前処置された N K - 9 2 細胞の表面上における C D 1 2 2 発現のフローサイトメトリー分析。 (B) N K - 9 2 細胞に結合する示された分子と、放射性ヨウ素化された野生型 R L I (1 nM) との競合試験。

【図 13 A】漸増濃度の示された分子と共に培養した (A) K i t 2 2 5 細胞又は (B) N K - 9 2 細胞の増殖アッセイ。

30

【図 13 B】漸増濃度の示された分子と共に培養した (A) K i t 2 2 5 細胞又は (B) N K - 9 2 細胞の増殖アッセイ。

【図 14 A】 (A) R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} の非存在下又は存在下における野生型 R L I により誘発される S t a t 5 及び S t a t 3 リン酸化のフローサイトメトリー分析。アイソタイプ対照が示されている。 (B) 一定濃度の野生型 R L I (4 0 pM) 及び漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} と共に培養された K i t 2 2 5 細胞、 N K - 9 2 細胞及び T F - 1 β 細胞の増殖アッセイ。

【図 14 B】 (A) R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} の非存在下又は存在下における野生型 R L I により誘発される S t a t 5 及び S t a t 3 リン酸化のフローサイトメトリー分析。アイソタイプ対照が示されている。 (B) 一定濃度の野生型 R L I (4 0 pM) 及び漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} と共に培養された K i t 2 2 5 細胞、 N K - 9 2 細胞及び T F - 1 β 細胞の増殖アッセイ。

40

【図 15 A】 (A) 5 0 nM の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は I L - 1 5 _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非存在下において I L - 1 5 (2 5 pM) のローディングされた又はローディングされていない安定にトランスフェクトされた I L - 1 5 R を提示する H e L a 細胞と共に 1 時間共培養した後の、 K i t 2 2 5 応答細胞内の p - S t a t 5 発現の分析。数字は、示されたゲート内の細胞のパーセンテージを示す。 (B) R L I _{Q 1 0 8 D} (1 0 0 nM) の存在下において I L - 1 5 R を提示する H e L a 細胞上にローディングされた漸増濃度の I L - 1 5 に応答した、 p - S t a t 5 陽性 K i t 2 2 5 応答細胞のパーセンテージ。

【図 15 B】 (A) 5 0 nM の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は I L - 1 5 _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非

50

存在下において I L - 1 5 (2 5 pM) のローディングされた又はローディングされていない安定にトランスフェクトされた I L - 1 5 R を提示する H e L a 細胞と共に 1 時間共培養した後の、 K i t 2 2 5 応答細胞内の p - S t a t 5 発現の分析。数字は、示されたゲート内の細胞のパーセンテージを示す。(B) R L I _{Q 1 0 8 D} (1 0 0 nM) の存在下において I L - 1 5 R を提示する H e L a 細胞上にローディングされた漸増濃度の I L - 1 5 に応答した、 p - S t a t 5 陽性 K i t 2 2 5 応答細胞のパーセンテージ。

【図 1 6】(A) 一定濃度の I L - 2 (1 nM) 及び漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} と共に培養された T F - 1 β 細胞の増殖アッセイ。(B) C D 8 T 細胞を、 R L I _{Q 1 0 8 D} (5 0 nM) の存在下又は非存在下において 5 nM の示されたサイトカインを用いて刺激した。(C) ヒト P B M C の増殖を、フローサイトメトリーによって評価した。単離された P B M C を V P D - 4 5 0 によって標識し、そして 1 0 0 nM の R L I _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非存在下において漸増濃度の I L - 1 5 又は (D) I L - 2 と共に培養した。C D 8 T 細胞は C D 3 + C D 8 + 細胞として同定された。

【図 1 7】(A) 示されているように処置されたマウスの脾臓 N K p 4 6 + C D 3 - N K 細胞及び (B) C D 8 T 細胞内の p - S t a t 5 の分析 (1 条件あたり n = 5)。

【図 1 8 A - F】I L - 2 R α は、 R L I _{Q 1 0 8 D} による I L - 2 シグナル伝達の阻害を損なう。(A) アルファスクリーン技術によって明らかとなった、 R L I _{Q 1 0 8 D} を用いて 1 時間処置されたか (白色の棒グラフ) 又は処置されていない (黒色の棒グラフ) K i t 2 2 5 細胞内の I L - 1 5 及び I L - 2 により誘発される S t a t 5 のリン酸化の阻害アッセイ。(B) 一定濃度の I L - 2 (8 0 pM) 及び漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} と共に培養した K i t 2 2 5 細胞の増殖アッセイ。(C) 一定濃度の I L - 2 (8 0 pM) 及び 3 3 B 3 . 1 抗 C D 2 5 m A b (6 6 nM) 並びに漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} と共に培養した K i t 2 2 5 細胞の増殖アッセイ。(D) 一定濃度の I L - 1 5 (4 0 pM) 並びに漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 及び / 又は I L - 1 5 _{Q 1 0 8 D} と共に培養した K i t 2 2 5 細胞の増殖アッセイ。(E) ヒト P B M C からの N K 細胞の増殖をフローサイトメトリーによって評価した。単離された V P D - 4 5 0 で標識された P B M C を、一定濃度の I L - 1 5 又は (F) I L - 2 と共に 3 3 B 3 . 1 抗 C D 2 5 m A b 及び漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非存在下において、培養した。N K 細胞は、 C D 3 - N K p 4 6 + 細胞として同定された。(G) I L - 2 により誘発される C D 4 T 細胞の増殖を、 R L I _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非存在下において C D 2 5 の発現に対する V P D - 4 5 0 の希釈度によって評価した。(H) I L - 2 により誘発される C D 2 5 - T 細胞又は (I) C D 2 5 + C D 4 + C D 3 + T 細胞の増殖を、 1 0 0 nM の R L I _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非存在下において C D 2 5 の発現に対する V P D - 4 5 0 の希釈度によって評価した。

【図 1 8 G - I】I L - 2 R α は、 R L I _{Q 1 0 8 D} による I L - 2 シグナル伝達の阻害を損なう。(A) アルファスクリーン技術によって明らかとなった、 R L I _{Q 1 0 8 D} を用いて 1 時間処置されたか (白色の棒グラフ) 又は処置されていない (黒色の棒グラフ) K i t 2 2 5 細胞内の I L - 1 5 及び I L - 2 により誘発される S t a t 5 のリン酸化の阻害アッセイ。(B) 一定濃度の I L - 2 (8 0 pM) 及び漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} と共に培養した K i t 2 2 5 細胞の増殖アッセイ。(C) 一定濃度の I L - 2 (8 0 pM) 及び 3 3 B 3 . 1 抗 C D 2 5 m A b (6 6 nM) 並びに漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 又は R L I _{N 6 5 K} と共に培養した K i t 2 2 5 細胞の増殖アッセイ。(D) 一定濃度の I L - 1 5 (4 0 pM) 並びに漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} 及び / 又は I L - 1 5 _{Q 1 0 8 D} と共に培養した K i t 2 2 5 細胞の増殖アッセイ。(E) ヒト P B M C からの N K 細胞の増殖をフローサイトメトリーによって評価した。単離された V P D - 4 5 0 で標識された P B M C を、一定濃度の I L - 1 5 又は (F) I L - 2 と共に 3 3 B 3 . 1 抗 C D 2 5 m A b 及び漸増濃度の R L I _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非存在下において、培養した。N K 細胞は、 C D 3 - N K p 4 6 + 細胞として同定された。(G) I L - 2 により誘発される C D 4 T 細胞の増殖を、 R L I _{Q 1 0 8 D} の存在下又は非存在下において C D 2 5 の発現に対する V P D - 4 5 0 の希釈度によって評価した。(H) I L - 2 により誘

10

20

30

40

50

発されるCD25-T細胞又は(I) CD25 + CD4 + CD3 + T細胞の増殖を、100 nMのRLIQ108Dの存在下又は非存在下においてCD25の発現に対するVPD-450の希釈度によって評価した。

【図19】(A)マウスを、ポリ(I : C)の投与前にRLIQ108Dを用いて処置したか又は処置しなかった。マウスの血中のNK細胞を、IFN γ 及びCD69の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。(B)示されたように処置されたマウスの血中のCD8 T細胞及び(C) CD4 T細胞上でのCD69の発現の分析。

【図20A - C】(A)ヒトPBMC由来の全CD4 T細胞の中のFoxP3 + CD25 + CD4 T細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって分析した。(B)RLIQ108Dの存在下又は非存在下において示された濃度のIL-2を用いて刺激されたヒトPBMCの中のCD8 T細胞に対する増殖性CD4制御性T細胞の比率。(C)示されたように処置されたマウスの脾臓CD44 + CD8 + T細胞又は(D) CD3 - NKp46 + NK細胞を、フローサイトメトリーによって分析した。(E)示されたように処置されたマウスの示された成熟段階における脾臓NK細胞の数。(F)脾臓FoxP3 + CD25 + CD4 T細胞をフローサイトメトリー及び(G)リンパ球ゲートの中のNK細胞に対するCD4制御性T細胞の比率を示すグラフによって分析した。

【図20D - G】(A)ヒトPBMC由来の全CD4 T細胞の中のFoxP3 + CD25 + CD4 T細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって分析した。(B)RLIQ108Dの存在下又は非存在下において示された濃度のIL-2を用いて刺激されたヒトPBMCの中のCD8 T細胞に対する増殖性CD4制御性T細胞の比率。(C)示されたように処置されたマウスの脾臓CD44 + CD8 + T細胞又は(D) CD3 - NKp46 + NK細胞を、フローサイトメトリーによって分析した。(E)示されたように処置されたマウスの示された成熟段階における脾臓NK細胞の数。(F)脾臓FoxP3 + CD25 + CD4 T細胞をフローサイトメトリー及び(G)リンパ球ゲートの中のNK細胞に対するCD4制御性T細胞の比率を示すグラフによって分析した。

【図21】(A)20週令のマウスをRLIQ108Dを用いて処置し、そして脾臓FoxP3 + CD25 + CD4 T細胞を分析した。(B)BALB/cマウスの皮膚をDBA/2レシピエントマウスに移植した。マウス(1条件あたりn = 10)を10 μ gのRLIQ108Dを用いて1日1回処置し、そして移植片生着をモニタリングした。

【0040】

実施例1：

材料及び方法

細胞培養液

D.Cantrell博士(ダンディー大学、スコットランド、イギリス)から入手した非接着性Kit-225ヒトTリンパ腫細胞株を、6%の熱により失活させたウシ胎児血清、2 mMのグルタミン、及び5 ng/mLのヒト r IL-2を含有しているRPMI-1640培地(ギブコ-インビトロジェン社)中で培養した。B.Azzarone博士(ギュスタブ・ルシー研究所、ヴィルジェイフ、フランス)によって親切にも提供された非接着性TF-1 β ヒト赤白血病細胞株を、10%の熱により失活させたウシ胎児血清、2 mMのグルタミン、1 ng/mLのGM-CSF、及び250 μ g/mLのジェネテシンを含有しているRPMI 1640培地中で培養した。Henri Vie(インセルムU892、ナント、フランス)によって親切にも提供されたNK-92細胞株を、10%の熱により失活させたウシ胎児血清、2 mMのグルタミン、及び5 ng/mLのヒト r IL-2を含有しているRPMI-1640培地(ギブコ-インビトロジェン社)中で培養した。

【0041】

増殖アッセイ

サイトカインに対するKit-225細胞、TF-1 β 細胞及びNK-92細胞の増殖応答を、アラマーブルー(登録商標)アッセイ(ABDセロテック社、キッドリントン、イギリス)によって定量した。簡潔に言えば、細胞を、Kit-225については24時間又はTF-1 β 及びNK-92については5時間かけて、サイトカインを含まない培養

培地中で飢餓させた。細胞を $100 \mu\text{l}$ 中に 1×10^4 個の細胞で播種し、そして漸増濃度の試験タンパク質の補充された培地中で、又は一定濃度のヒト rIL-15 、ヒト rIL-2 若しくは RLI 及び漸増濃度の試験アンタゴニストの補充された培地中で 48 時間培養した。細胞を、1 ウェルあたり $10 \mu\text{L}$ のアラマブルーで 6 時間かけてパルス標識した。細胞増殖を、*Enspire* プレートリーダー（パーキンエルマー社、ホプキントン MA 州、アメリカ）を使用して $550/590 \text{ nm}$ の蛍光を測定することによって評価した。

【0042】

サイトカインによる短時間の刺激

サイトカインによる短時間の刺激に対する Kit-225 細胞、 $\text{TF-1}\beta$ 細胞及び NK-92 細胞の増殖応答を、アラマブルー（登録商標）アッセイによって定量した。簡潔に言えば、細胞を、24 時間、サイトカインを含まない培養培地中で飢餓させた。それらを 1 mL あたり 2×10^5 個の細胞で、 40 pM 又は 1 nM のヒト rIL-15 又は rIL-2 と共に 30 分間インキュベートし、2 回洗浄し、そして一定濃度の試験タンパク質の補充された培地中で 24 時間培養した。細胞代謝活性を先に記載されているようにアラマブルーによってアッセイした。2 回目のセットの実験において、30 分間のサイトカインによる刺激を、30 分後以降に、試験タンパク質と接触させた細胞上で実現した。

【0043】

生存シグナルの伝搬

細胞代謝活性の伝搬を、アラマブルー（登録商標）アッセイによって検出した。簡潔に言えば、細胞を、サイトカインを含まない培養培地中で 24 時間の間に飢餓させた。細胞を、 1 mL あたり 2×10^5 個の細胞で 1 nM のヒト rIL-15 又は rIL-2 と共に 30 分間インキュベートし、2 回洗浄し、そして 2×10^4 個のこれらの活性化細胞を、アンタゴニストの存在下で飢餓させた 2×10^4 個の細胞と共に 24 時間培養した。細胞生存率を、先に記載されている通りにアラマブルーによって評価した。

【0044】

NK 個体群及び T-reg 個体群に対する突然変異 RLI のインビボにおける効果

PBS 又は突然変異 RLI を毎日 3 日間（注射 1 回あたり $2 \mu\text{g}$ ）注射した。マウスを 1 日後に屠殺した。脾臓及び骨髄を回収し、そして細胞を単離した。フローサイトメトリーによって、 NK 細胞は $\text{NK1.1} + \text{CD3}$ - 細胞として同定され、そして T-reg 細胞は $\text{CD3} + \text{CD4} + \text{CD25} + \text{FoxP3} +$ であった。

【0045】

結果

トランス提示を通して作用する IL-15 を阻害するために、本発明者らは、 IL-15 単独よりも高い親和性で CD122 に結合する融合分子（ RLI ）を作製し、そして CD132 界面において突然変異させた（ RLI_{Q108D} ）。結果として、突然変異 RLI は CD122 鎖に効率的に結合するが、応答細胞内のシグナルを伝達できない。本発明者らは、 Kit-225 細胞、 TF-1b 細胞及び NK-92 細胞が野生型 IL-15 及び RLI の両方に応答して増殖するが、突然変異 RLI に応答した増殖シグナルは全く検出されなかったことを観察した（図 1）。次いで、本発明者らは、突然変異 RLI が、 $\text{CD122}/\text{CD132}$ 二量体受容体に直接標的化する野生型 RLI 依存性増殖を阻害することができるかどうかを試験した。本発明者らは、突然変異 RLI が、 RLI 依存性細胞増殖を効率的に阻害し、 2 nM で IC_{50} に到達することを発見した（図 2）。驚くべきことに、本発明者らは、突然変異 RLI が IL-15 依存性増殖を効率的に消失させたことを観察したが（図 3）、 IL-2 依存性増殖に対する阻害は全く観察されなかった（図 4）。本発明者らは、突然変異 RLI は、 CD25 が遮断された場合にのみ（ 33B3.1 遮断抗体） IL-2 依存性シグナルを阻害することができたことを発見した（図 5）。突然変異 RLI が IL-15 シグナルを阻害する効力を確認するために、本発明者らは細胞をサイトカインと共に 30 分間インキュベートすることによって「パルス刺激」アッセイを評価し、次いで、結合していないサイトカインを除去するために洗浄した後、細胞を、

サイトカイン非含有培地中に24時間かけて再懸濁した。本発明者らは、突然変異RLIがIL-15に対する細胞応答を効率的に減少させたが、IL-2に対する細胞応答は減少させなかったことを観察した(図7及び8)。最後に、本発明者らは、突然変異RLIがマウスにおけるNK個体群及びT-reg個体群に影響を及ぼし得るかどうかを調べた。その目的のために、本発明者らは突然変異RLI又はPBSを毎日3日間注射した(注射1回あたり2µg)。1日後、マウスを屠殺し、そしてNK及びT-regを脾臓及び骨髓から単離した。本発明者らは、NK個体群が、脾臓への突然変異RLIの注射後に減少したことを観察した。一方でT-reg個体群は未変化のままであった。骨髓には全く差は観察されなかった(図9)。

【0046】

実施例2:

材料及び方法:

細胞株

非接着性Kit225ヒトTリンパ腫細胞株を、6%の熱で失活させたウシ胎児血清、2mMのグルタミン、及び5ng/mLのヒトIL-2を含有しているRPMI-1640培地(ギブコ・インビトロジェン社)中で培養した。Henri Vie(CRCNA、ナント、フランス)によって親切にも提供されたNK-92細胞株を、10%の熱により失活させたヒト血清、2mMのグルタミン、及び5ng/mLのヒトIL-2を含有しているRPMI-1640培地(ギブコ・インビトロジェン社)中で培養した。非接着性TF-1βヒト赤白血球細胞株を、10%の熱により失活させたウシ胎児血清、2mMのグルタミン、1ng/mLのGM-CSF、及び250µg/mLのジェネテシンを含有しているRPMI 1640培地中で培養した。

【0047】

健康なドナー血液試料を、フランス血液バンク(Etablissement Francais du Sang(EFS))から回収した。末梢血単核細胞(PBMC)をフィコール勾配で単離した。全ての細胞株を37℃の加湿した5%CO₂の雰囲気中で維持した。

【0048】

表面プラズモン共鳴試験

SPR実験を、ピアコア3000バイオセンサー(ピアコア社、ウプサラ、スウェーデン)を用いて実施した。組換えタンパク質(hCD122、hCD132、Fc-IL-15Rα)をCM5センサーチップに共有結合により連結させ、そして漸増濃度のリガンド(IL-15、IL-15_{Q108D}、RLI、RLI_{Q108D}、RLI_{N65K})の結合をモニタリングした。センサーグラムの分析を、BIAlogue動態評価ソフトウェアを使用して実施した。

【0049】

アルファスクリーンシュアファイアアッセイ

Kit225細胞を、IL-2を含まない無血清培地中で12時間かけて飢餓させ、そして2×10⁵個の細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。Kit225細胞を、RLI_{Q108D}と共に30分間インキュベートし、次いで40pMのIL-15又はIL-2を用いて1時間かけて刺激した。Stat5リン酸化をp-Stat5アルファスクリーンシュアファイアキット(パーキンエルマーライフサイエンス社)を使用して測定した。刺激後、細胞を溶解した。次いで、4µlの溶解液を384ウェルの白色Optiプレート(パーキンエルマーライフサイエンス社)に移し、そしてStat5リン酸化を製造業者の説明書に従って測定した。未処置の状態から得られたStat5リン酸化値を、リガンドの存在下において特定のStat5リン酸化値について得られた数値から差し引いた。

【0050】

増殖アッセイ

サイトカインに対するKit225細胞の増殖応答をアラマーブルーアッセイ(AbDセロテック社、キッドリントン、イギリス)によって定量した。簡潔に言えば、細胞を、

10

20

30

40

50

サイトカイン非含有培養培地中で一晩かけてK i t 2 2 5細胞について飢餓させた。細胞を、100 μ l中に10⁴個の細胞で播種し、そして一定濃度のヒトr I L - 1 5、ヒト r I L - 2、又はR L I、及び漸増濃度のR L I Q_{108D}アンタゴニストの補充された培地中で72時間培養した。細胞を、1ウェルあたり10 μ Lのアラマブルーで6時間かけてパルス標識した。細胞増殖を、E n s p i r eプレートリーダー（パーキンエルマー社、ホプキントンMA州、アメリカ）を使用して550 / 590 nmでの蛍光を測定することによって評価した。

【0051】

フローサイトメトリー

h / m C D 3、h / m C D 8、h / m C D 4、h / m N K p 4 6、m N K 1 . 1、m C D 2 7、m C D 1 1 b、m C D 4 4、h / m C D 1 3 2、m C D 1 2 2、h / m C D 2 5、h I L - 1 5 R α の細胞表面発現を、市販の抗体を使用して実施した。染色前に、Fc受容体を、PBS中1%ヒト血清を用いて4 で15分間かけて遮断した。細胞を、細胞表面染色のために抗体と共に4 で30分間インキュベートした。S t a t 5及びS t a t 3のリン酸化の分析を、L y s e / F i x緩衝液及びP e r m緩衝液I I I（BDバイオサイエンス社）を使用して製造業者のプロトコールに従って実施した。F o x P 3染色を、F o x p 3キット（e B i o s c i e n c e社）に概略が示されたプロトコールに従って実施した。試料を、8カラーのF A C S C a n t o I Iサイトメーター（BDバイオサイエンス社）で取得した。分析を、F l o w J oソフトウェア9.9（ベクマン・コールター社）を使用して実施した。

【0052】

R L I Q_{108D}によるI L - 1 5のトランス提示の阻害を研究するために、I L - 1 5 R α の安定にトランスフェクトされたH e L a細胞株を、I L - 1 5と共に37 で1時間インキュベートすることにより、I L - 1 5をI L - 1 5 R α と結合させ、そしてこれを洗浄して可溶性I L - 1 5を除去した。飢餓させたK i t 2 2 5をR L I Q_{108D}と共に1時間インキュベートし、次いで、提示しているH e L a細胞と共に1時間共培養した。細胞を固定し、そして細胞内p - S t a t 5発現の分析のために透過性処理を行なった。

【0053】

ヒトP B M Cの増殖アッセイのために、細胞をフィコール勾配で単離した。次いで、細胞をPBS中で洗浄し、そして10 $\times$ 10⁶個のP B M Cを、1 Mの最終濃度のB D H o r i z o n（商標）色素450（V P D - 450、BDバイオサイエンス社）と共に37 で10分間インキュベートした。反応をPBSによる10倍希釈によって停止し、そして細胞を完全培地R 1 0（1 mMのピルビン酸ナトリウム、1 mMの非必須アミノ酸、100 IU/mLのペニシリン/ストレプトマイシン、2 mMのL - グルタミン、及び10% F B Sの補充されたR P M I 1 6 4 0培地）中で洗浄した。P B M Cを、96ウェル丸底プレート中の完全培地R 1 0に1 $\times$ 10⁶個の細胞/mLで播種し、そして示された濃度のサイトカイン及び変異体で37 でインキュベートした。

【0054】

インビボモデル

C 5 7 B L / 6マウス、B a l b / cマウス、及びD B A / 2マウスはJ a n v i e r研究所から購入した。全てのマウスは通常、6才令から12週令を使用した。全ての動物実験は、動物実験の地域における倫理委員会（ペイ・ド・ラ・ロワール、フランス）によって承認され、そして欧州連合ガイドライン（承認番号第B 4 4 - 2 7 8）に従って実施された。

【0055】

インビボにおけるS t a t 5リン酸化アッセイのために、10 μ gのR L I Q_{108D}又はPBSを、2 μ gのI L - 2を用いての30分間かけての腹腔内刺激のさらに30分前にC 5 7 B L / 6マウスに腹腔内投与した。マウスを屠殺し、続いて単離された脾臓細胞を固定した。脾臓からの細胞懸濁液を、機械的に引き裂くことによって調製し、その後

、表現型分析のために染色した。膜におけるNK p 4 6 及びCD 8 の染色を、細胞透過処理及び細胞内p - S t a t 5 染色の前に実施した。

【0056】

ポリ(I : C)による活性化のために、マウスを、10 µgのRLIQ_{108D}を用いて一晩かけて前処置したか又はしなかった。次いで、マウスを、10 µgのRLIQ_{108D}と一緒に又はその非存在下で25 µg/gのポリ(I : C)を用いて活性化し、そして血中のNK細胞及びCD 8 T細胞の活性化について試験した。6時間後の表面のCD 6 9 の発現及び細胞内IFNγをフローサイトメトリーによって分析した。

【0057】

移植片の実験を、性別の一致した動物を使用して実施した。マウスを、75 mg/kgのケタミンと15 mg/kgのキシラジンの混合物を用いて麻酔した。皮膚移植を、Balb/c (H - 2^d)ドナーマウスの尾皮膚の全層を用いて、DBA/2 (H - 2^d)レシピエントマウスの右側腹部に対して実施した。皮膚移植片を、最初の5日間、絆創膏を用いて固定した。マウスを2つの群に分類した：未処置群とRLIQ_{108D}により処置された群。マウスを、1日1回のRLIQ_{108D}の腹腔内投与用量(10 µg/マウス)を用いて処置した。次いで、移植片生着を、1日1回の目視による検査によって追跡した。全ての処置は、皮膚移植日の前日に開始された。拒絶は、移植された皮膚組織の80%超の減少として定義された。

【0058】

結果：

RLIQ_{108D}：CD 1 2 2 に対する高まった親和性及びCD 1 3 2 の動員障害を有するIL - 1 5 とIL - 1 5 Rαの融合分子。

IL - 2 及びIL - 1 5 依存性エフェクター機能を阻害するために、本発明者らは、CD 1 2 2 に対する高まった親和性及びCD 1 3 2 の動員障害を組み合わせることによってCD 1 2 2 / CD 1 3 2 二量体を標的化する独創的なアプローチを開発した。一方で、本発明者らは、IL - 1 5 をIL - 1 5 Rαと共有結合により連結させると(RLI融合分子)、可溶性CD 1 2 2 に対するIL - 1 5 の低い親和性(K_d = 25 nM) (図11A) は14倍増加することを発見した。他方で、IL - 1 5 におけるQ 1 0 8 残基をDへと突然変異することにより、CD 1 3 2 鎖へのその結合は消失することが示された。この突然変異はIL - 1 5 / IL - 1 5 Rα複合体の形成に影響を及ぼさない。なぜなら、IL - 1 5 Q_{108D} ムテインは、野生型IL - 1 5 と同じような親和性で、固定されたFc - IL - 1 5 Rαに結合したからである(図11B)。したがって、本発明者らは、可溶性IL - 1 5 Rαスドメインに共有結合により連結させたIL - 1 5 Q_{108D} ムテイン間の融合分子であるRLIQ_{108D}を作製した。対照として、IL - 1 5 部分にN 6 5 K突然変異を導入することによって、CD 1 2 2 の動員が消失したRLIN_{65K}が作製された。表面プラズモン共鳴分析により、予想された通り、RLIQ_{108D}はCD 1 2 2 鎖に対して野生型RLIと同じような親和性を保持し(図11A及び11C)、固定されたFc - IL - 1 5 Rαへの結合は全く観察されなかった(図11D)ことが示された。これに対して、RLIN_{65K}はCD 1 2 2 に結合することができなかった(図11C)。さらに、RLI / CD 1 2 2 複合体への可溶性CD 1 3 2 の結合は、RLIにQ 1 0 8 D置換を導入すると(RLIQ_{108D})完全に消失した(図11E)。細胞膜にアンカーされた受容体(CD 1 2 2、CD 1 3 2、IL - 1 5 Rα及びIL - 2 Rα(CD 2 5))を発現しているKit - 2 2 5細胞及びNK - 9 2細胞を使用)の状況では、TU - 2 7 (CD 1 2 2 へのIL - 2 及びIL - 1 5 の結合を遮断する抗CD 1 2 2 mAb)の結合はRLIQ_{108D}によって有意に阻害され、一方、RLIN_{65K}は全く影響を及ぼさなかった。対照として、非遮断性CF - 1抗CD 1 2 2 mAbの結合は、RLIQ_{108D}又はRLIN_{65K}のいずれによっても影響を受けなかった(図12A)。したがって、RLIQ_{108D}は、NK - 9 2細胞上のCD 1 2 2 / CD 1 3 2 二量体受容体への放射性ヨウ素化された野生型RLIの結合に競合したが、しかしながら、CD 1 3 2 の動員がないために、野生型RLI(2 nM)と比べて10倍高いIC₅₀(20 nM)であっ

た(図12B)。したがって、 RLI_{Q108D} は、 $CD122$ に対する高まった親和性と $CD132$ の動員障害を組み合わせた、独創的な $IL-15$ 由来分子である。

【0059】

RLI_{Q108D} は、それらの共通の $CD122/CD132$ 二量体受容体を通して $IL-15$ 及び $IL-2$ のシグナル伝達の両方を阻害する。

分子の生物学的活性に関して、予想された通り、野生型 RLI は、 $CD122/CD132$ 二量体を通して作用することによって、 $Kit225$ 及び $NK-92$ の増殖を誘導し($EC50 = 50$ pM)、一方、 RLI_{Q108D} 、 RLI_{N65K} 、及び $IL-15_{Q108D}$ は不活性であり(図13A及び図13B)、このことから、 $CD122$ 鎖及び $CD132$ 鎖の両方の動員の必要性が確認された。結合試験から予想されるように、 RLI_{Q108D} は、5 nMの $IC50$ で、野生型 RLI により誘発される $Stat3$ 及び $Stat5$ のリン酸化の両方(図14A)並びに $Kit225$ 細胞、 $NK-92$ 細胞及び $TF-1\beta$ 細胞の増殖を効率的に阻害した(図14B)。 RLI_{N65K} の阻害活性は全く観察されず(図14A及び図14B)、このことから、 $CD122$ の動員ではなく、 $CD132$ の動員を標的化することに関心が高まった。

【0060】

さらに、 $IL-15R\alpha$ によりトランスフェクトされた $HeLa$ 細胞による $Kit225$ 細胞上の $CD122/CD132$ への $IL-15$ のトランス提示は、 RLI_{Q108D} によって有意に消失し、このことにより、細胞間相互作用の最中でさえ $IL-15$ のシグナル伝達を阻害するその効力が判明した(図15A及び15B)。これとは対照的に、そして最も重要なことには、 $IL-15_{Q108D}$ はこのような阻害作用を発揮することができず(図15A)、これにより、 $CD122/CD132$ 二量体を標的化しそして阻害作用を発揮することに対して、 $IL-15_{Q108D}$ より高まった RLI_{Q108D} の親和性の重要性が強調される。

【0061】

$CD122/CD132$ 二量体受容体を通しての $IL-2$ のシグナル伝達に対する RLI_{Q108D} の有効性を試験するために、本発明者らは $CD122$ 及び $CD132$ を発現するが $IL-2R\alpha$ を発現しない $TF-1\beta$ 細胞を使用した。 RLI_{Q108D} は、3 nMの $IC50$ で、 $IL-2$ 依存性の $TF-1\beta$ 細胞増殖を効率的に阻害した(図16A)。次いで、本発明者らは、ヒト初代細胞へと本発明者らの分析を展開させた。 $VPD-450$ により標識された $PBMC$ を、 RLI_{Q108D} の存在下において $IL-15$ 又は $IL-2$ を用いて刺激した。本発明者らは、 $IL-15$ 及び $IL-2$ に応答した $CD8T$ 細胞増殖が、 RLI_{Q108D} によって両方共に阻害されたことを発見した(図16B~D)。

【0062】

RLI_{Q108D} の阻害有効性がさらにインビボにおいて確認された。 RLI_{Q108D} が、野生型 RLI の注射前にマウスに投与されると、脾臓 NK 細胞及び $CD8T$ 細胞内の $Stat5$ リン酸レベルは、未処置マウスの NK 細胞と比較して減少したことが判明した(図17A及び17B)。したがって、 $CD122/CD132$ 二量体受容体を通した $IL-2$ 及び $IL-15$ のシグナル伝達は、インビトロ及びインビボにおいて RLI_{Q108D} によって効率的に阻害された。

【0063】

$IL-2R\alpha$ は、その $IL-2R\alpha/CD122/CD132$ 三量体受容体を通して、 RLI_{Q108D} による $IL-2$ シグナル伝達の阻害を障害する。

$IL-2R\alpha$ 鎖及び $IL-15R\alpha$ 鎖が RLI_{Q108D} の遮断効果に影響を及ぼし得るかどうかという疑問に取り組むために、本発明者らは、それらの特異的な三量体受容体($IL-2$ に対する $IL-2R\alpha/CD122/CD132$ 、及び $IL-15$ に対する $IL-15R\alpha/CD122/CD132$; シス提示)を通して、外来性 $IL-2$ 及び $IL-15$ に応答する $Kit225$ 細胞、 $NK-92$ 細胞、及び $TF-1\beta$ 細胞を再び利用した。驚くべきことに、 $Kit225$ 細胞において $IL-15$ により誘発された $Stat5$

リン酸化は RLI_{Q108D} によって阻害されたが、 $IL-2$ により誘発された $Stat5$ リン酸化は阻害されなかった (図 18 A)。したがって、 RLI_{Q108D} は、 $IL-2$ により誘発された細胞増殖には影響を及ぼさないままであった (図 18 B)。興味深いことに、 $IL-2$ により誘発された細胞増殖に対する RLI_{Q108D} の阻害活性は、 $CD25$ に結合する $IL-2$ を遮断する抗体 ($33B3.1$) を加えた場合に顕現し、このことは $IL-2R\alpha$ の存在が RLI_{Q108D} の阻害作用を妨げたことを示唆する (図 18 C)。両方のアッセイにおいて、 RLI_{N65K} は不活性であった (図 18 B 及び 18 C)。

【0064】

RLI_{Q108D} は、 RLI により誘発された増殖よりも 6 倍高い、 30 nM の $IC50$ で、 $IL-15$ により誘発された細胞増殖を阻害した。さらに、本発明者らは、 $IL-15_{Q108D}$ による $IL-15R\alpha$ の遮断は、 RLI_{Q108D} の阻害活性を増強したことを発見した (図 18 D)。このことは、 RLI_{Q108D} の阻害活性が、三量体受容体の状況においては僅かに損なわれ、それ故、 $IL-15R\alpha$ の存在はその阻害作用に影響を及ぼし得ることを示す。

【0065】

本発明者らは、ヒト初代細胞へと本発明者らの分析を展開させた。 $IL-15$ により誘発される NK 細胞増殖は、 5 nM の $IC50$ で、 RLI_{Q108D} の存在下において完全に消失した (図 18 E)。これに対して、 $IL-2$ により誘発される NK 細胞増殖は RLI_{Q108D} によってほんの部分的にしか阻害されず、実験間で高い程度のばらつきがあった。しかしながら、遮断性抗 $CD25$ $33B3.1\text{ mAb}$ が培養液に添加されると、 RLI_{Q108D} による $IL-2$ により誘発される NK 細胞増殖の阻害は完全に有効であり、 $IL-15$ により誘発される増殖阻害と同じような $IC50$ であった (図 18 F)。これらの結果は、 $IL-2R\alpha$ による RLI_{Q108D} の作用の障害を確認する。以前に観察されたものに従って、 RLI_{Q108D} は、 $IL-2$ により誘発される $CD4CD25-T$ 細胞の増殖を阻害したが、 $CD25$ を発現している従来の $CD4T$ 細胞の増殖は阻害しなかった (図 18 G-I)。要するに、これらの結果は、 RLI_{Q108D} は三量体の受容体の状況においてはあまり有効ではなく、それ故、 $IL-15R\alpha$ の存在もまた、 $IL-2R\alpha$ のように劇的ではないけれども、その阻害作用に影響を及ぼし得ることを示す。

【0066】

RLI_{Q108D} による $CD122/CD132$ 二量体受容体の阻害は、細胞の活性化を制限し、そしてトレランスを促進する。

$IL-15$ 及び $IL-15R\alpha$ は、炎症中に誘導される。炎症に関連した細胞活性化を阻害する RLI_{Q108D} の効力をさらに記載するために、ポリ ($I:C$) をマウスに投与した。ポリ ($I:C$) により刺激されたマウス由来の NK 細胞による $IFN\gamma$ 発現は、細胞表面における $CD69$ の発現に影響を及ぼすことなく、 RLI_{Q108D} によって有意に損なわれた (図 19 A)。しかしながら、 $CD69$ の発現は、 RLI_{Q108D} をポリ ($I:C$) と一緒に注射した場合、 $CD8$ 及び $CD4T$ 細胞上において減少した (図 19 B 及び図 19 C)。したがって、インビボにおける TLR による刺激は、 NK 細胞及び T 細胞の活性化を支えるために $CD122/CD132$ 二量体受容体を必要とし、そしてこれは RLI_{Q108D} によって阻害される。

【0067】

$IL-15R$ は $CD122$ 及び $CD132$ とは独立して幅広く発現されているが、 $IL-2R\alpha$ の発現は主に $CD4$ 制御性 T 細胞 ($T-reg$) 及び活性化 T 細胞に限定されている。本発明者らの観察によると、ヒト $PBMC$ 由来の $FoxP3+$ 陽性細胞における $IL-2$ による $CD4T$ 細胞の増強は、 RLI_{Q108D} によって影響を受けなかった (図 20 A)。正味の結果として、 RLI_{Q108D} による処置は、 $T-reg$ と $CD8T$ 細胞の比を $T-reg$ の方にシフトさせ (図 20 B)、このことはトレランスの促進におけるその潜在性を強調する。

【0068】

インビボにおいて RLI_{Q108D} の有効性を評価するために、 RLI_{Q108D} を $IL-2$ と一緒にマウスに投与した。予想された通り、 $IL-2$ の注射により、 $CD44 + CD8T$ 細胞及び NK 細胞は増加し、これは RLI_{Q108D} によって完全に消失した（図20C及び図20D）。さらに、 NK 細胞の成熟を研究することによって、本発明者らは、 $CD11b + CD27$ - 成熟 NK 細胞個体群が劇的に減少したことを発見した（図20E）。興味深いことに、 $CD4T-reg$ 個体群は、 $IL-2$ と一緒に注射された場合、 RLI_{Q108D} によって阻害されず、さらには促進され（図20F）、これにより野生型マウスにおいて NK 細胞よりも $T-reg$ 細胞の方へとバランスが傾き（図20G）、これはヒト $PBMC$ を用いて得られた結果を確認する。興味深いことに、多量の $T-reg$ 細胞が加齢マウス内に認められ、そして RLI_{Q108D} の注射それ自体が脾臓 $T-reg$ 個体群を有意に増強させた（図21A）。

10

【0069】

制御性 T 細胞は、 T 細胞活性化を阻害することによって同種移植片拒絶を予防することができた。したがって、本発明者らは、 $Balb/c$ マウスの皮膚が $DBA/2$ レシピエントに移植された移植モデルを使用して、単独で細胞活性化よりもトレランスを支持する RLI_{Q108D} が、潜在的な治療的利点を提示し得るかどうか疑問に思った。本発明者らは、全ての未処置マウスは、14日目までに同種皮膚移植片を拒絶したことを発見した。しかしながら、移植後に RLI_{Q108D} を用いて1日1回処置することにより、移植片生着率は上昇し（図21B）、このことは RLI_{Q108D} がトレランスを支持し得るという考えを支持する。

20

【0070】

配列：

【化 1】

配列番号：1

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV
AHWTTPSLKCIRDPALVHQRAPP

配列番号：2

SGSGGGGSGGGSGGGGSLQ

配列番号：3

SGSGGGGSGGGSGGGGSGG

10

配列番号：4

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

配列番号：5

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV
AHWTTPSLKCIRDPALVHQRAPPSGGSGGGGSGGGSGGGGSGGNWVNVISDLKKIE
DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANN
SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVDMFINTS

20

配列番号：6

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV
AHWTTPSLKCIRDPALVHQRAPPSGGSGGGGSGGGSGGGGSGGNWVNVISDLKKIE
DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANN
SLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLDSFVHIVDMFINTS

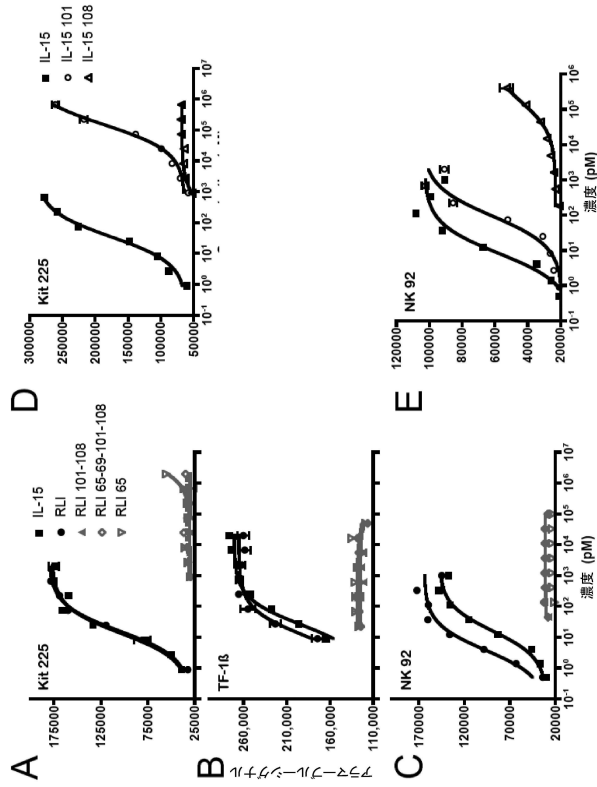
30

【0071】

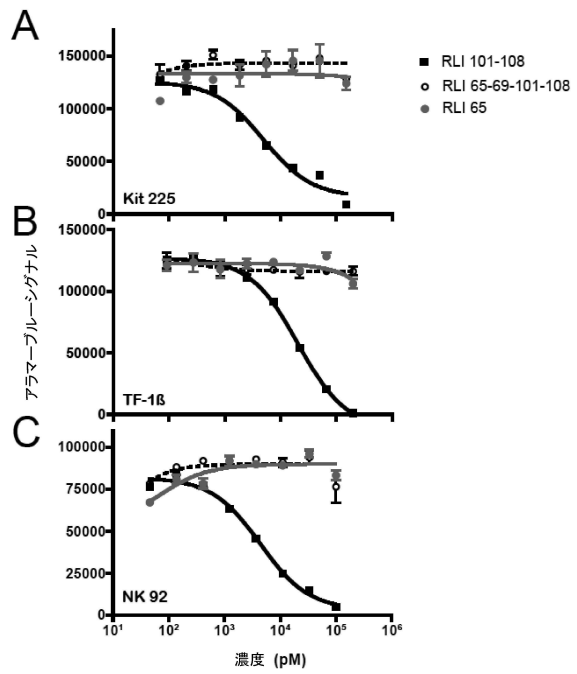
参考文献：

本出願全体を通して、様々な参考文献が、本発明が属する技術分野の最新技術を記載する。これらの参考文献の開示は、本開示への参照により本明細書に組み入れられる。

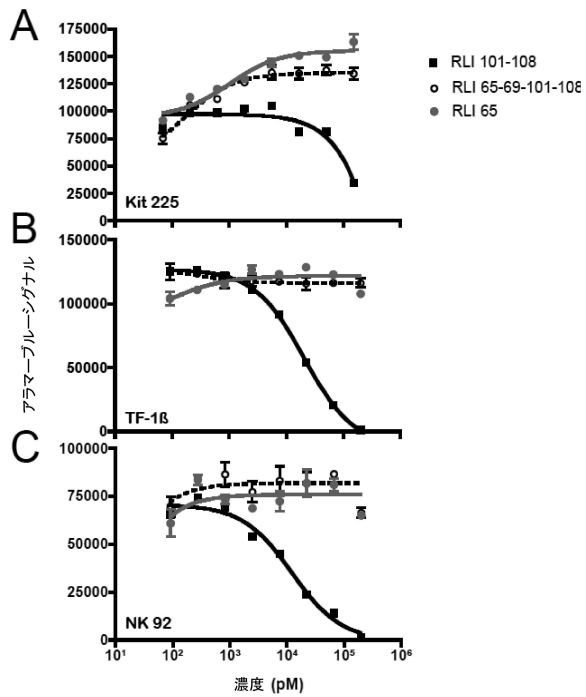
【図 1】



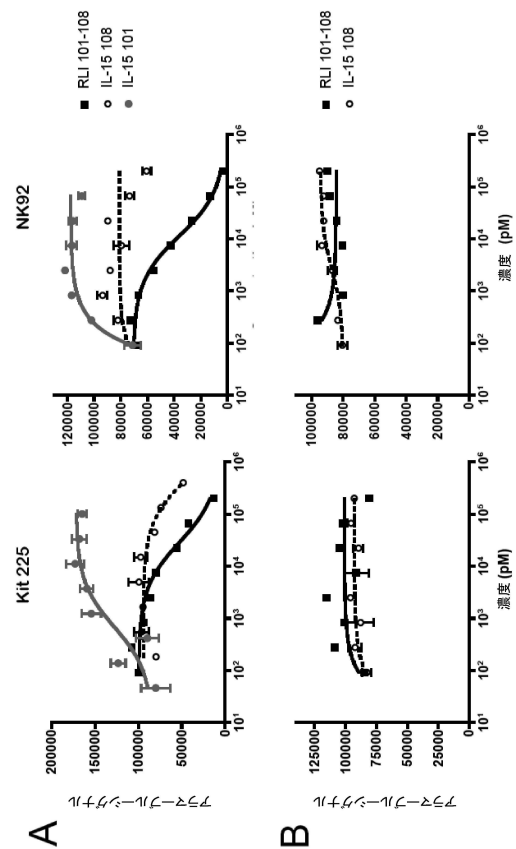
【図 2】



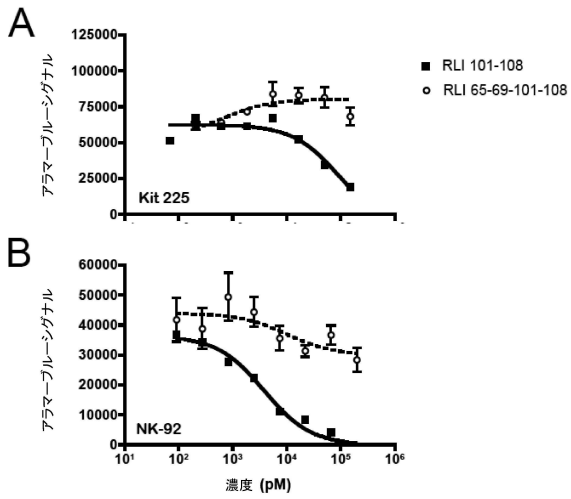
【図 3】



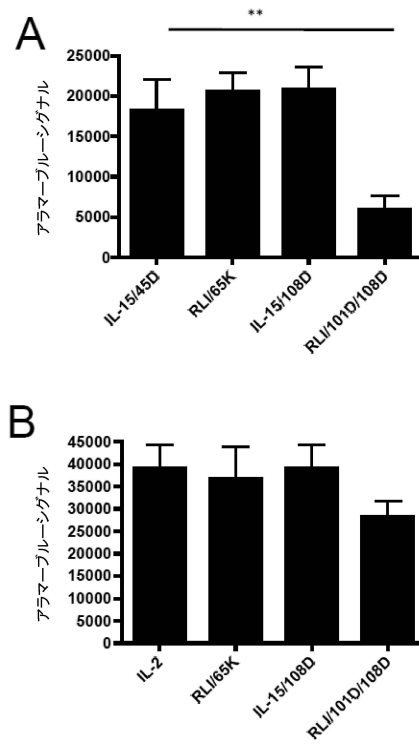
【図 4】



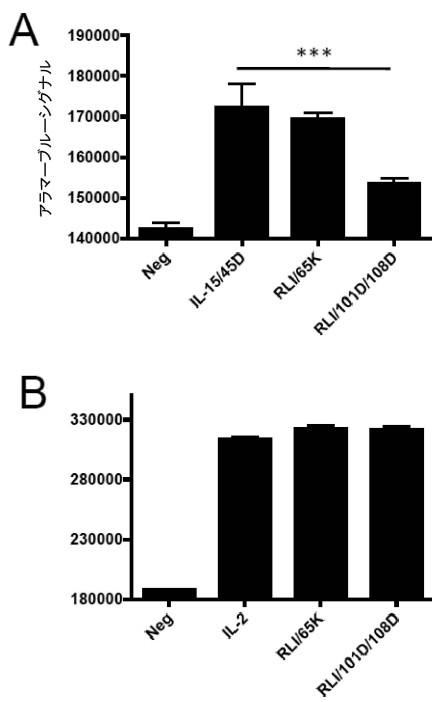
【図 5】



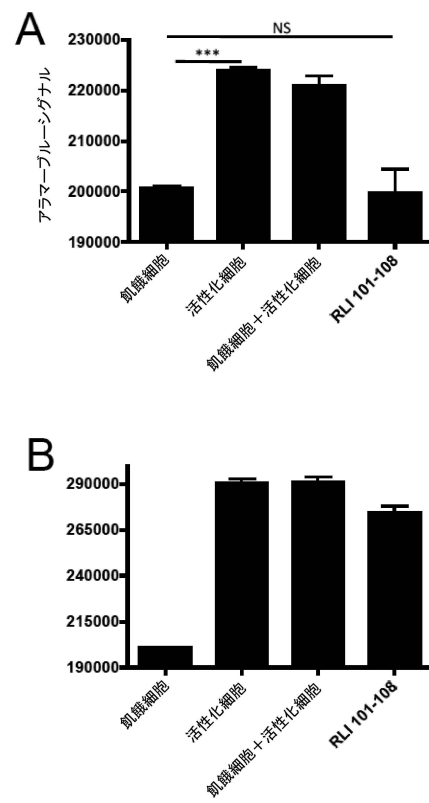
【図 6】



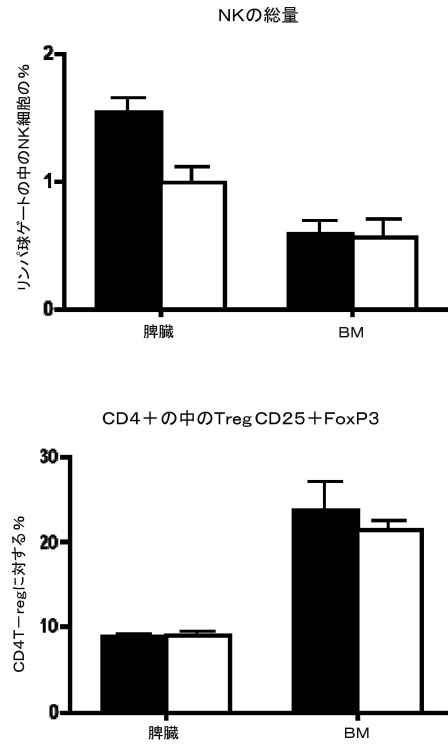
【図 7】



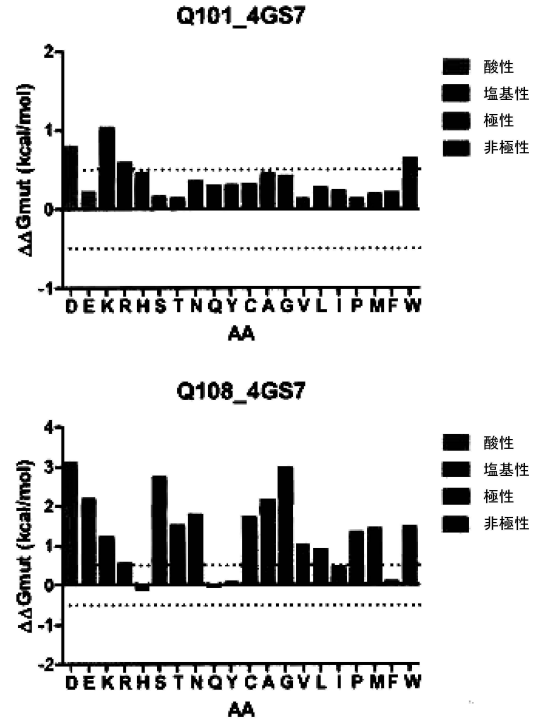
【図 8】



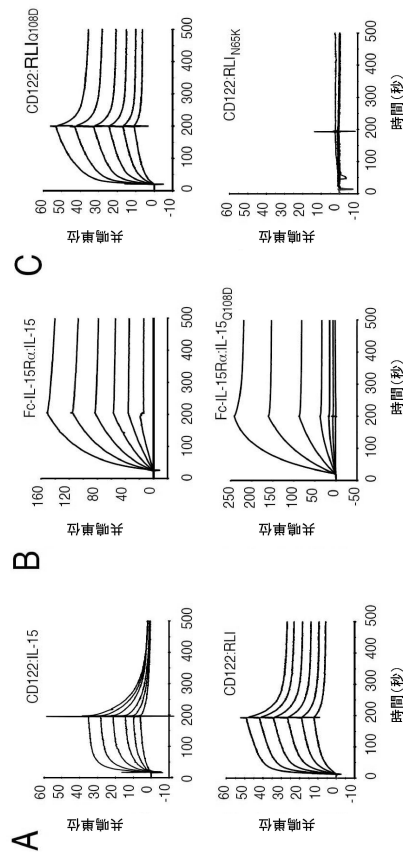
【図 9】



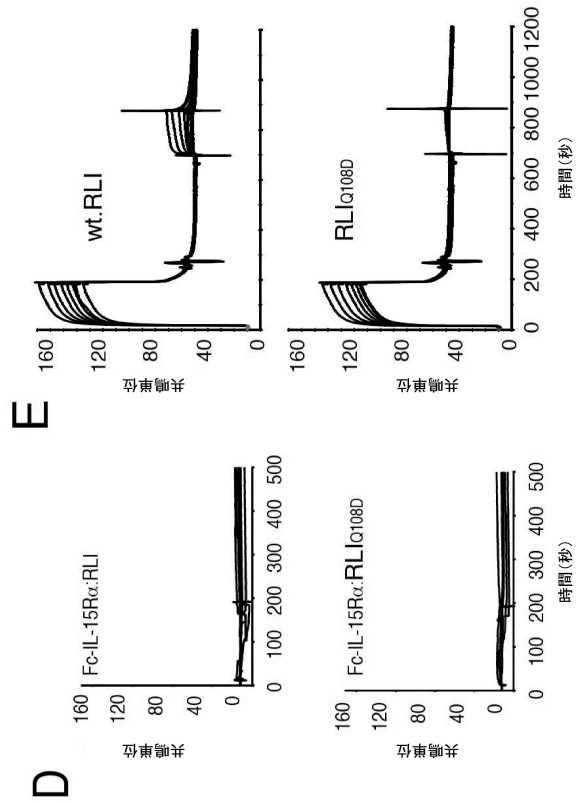
【図 10】



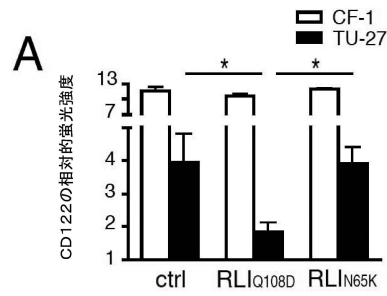
【図 11 A - C】



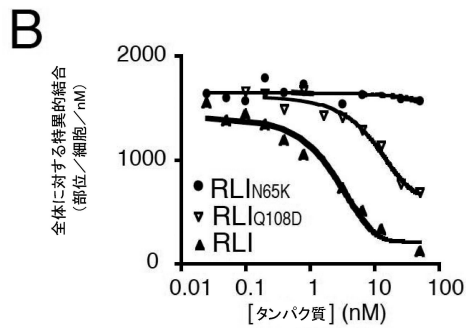
【図 11 D - E】



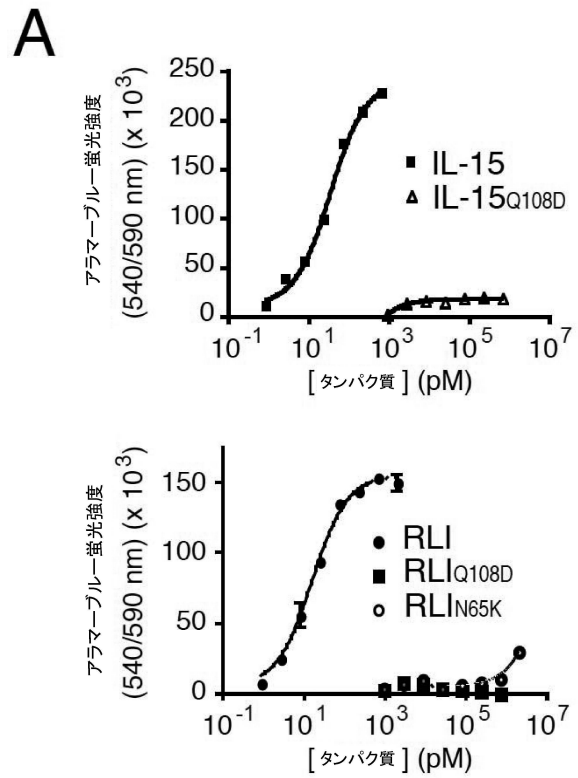
【図 1 2 A】



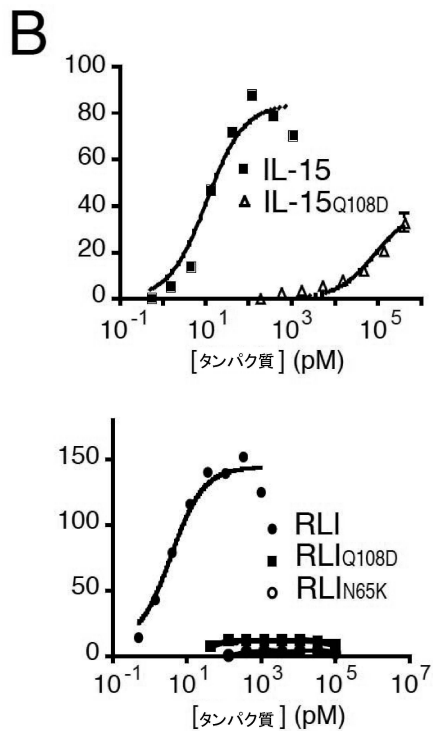
【図 1 2 B】



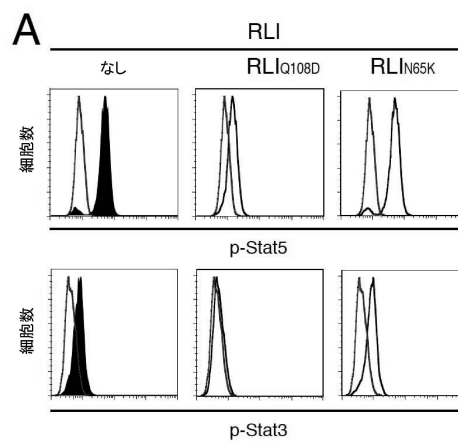
【図 1 3 A】



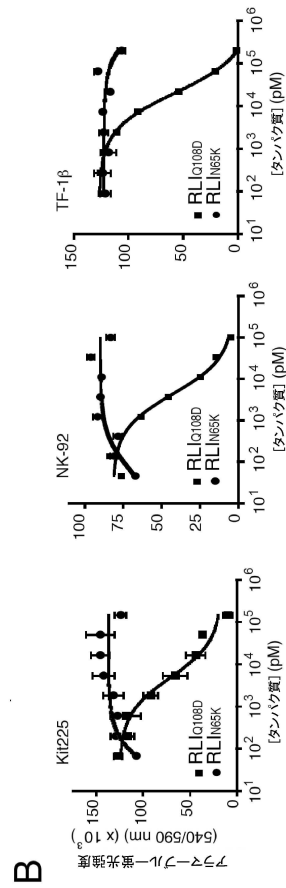
【図 1 3 B】



【図 1 4 A】

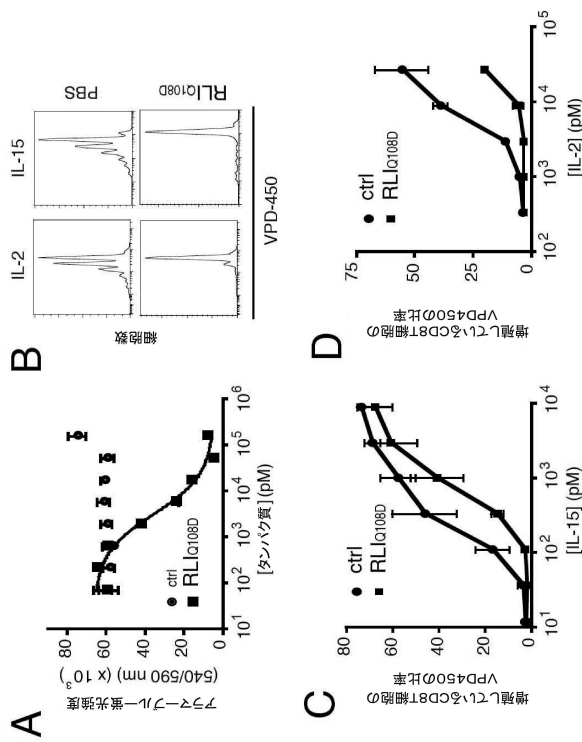


【図 14 B】



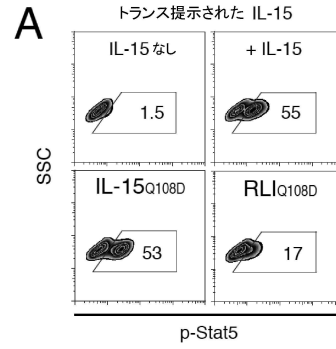
B

【図 16】

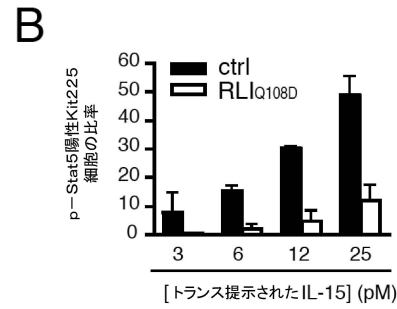


A

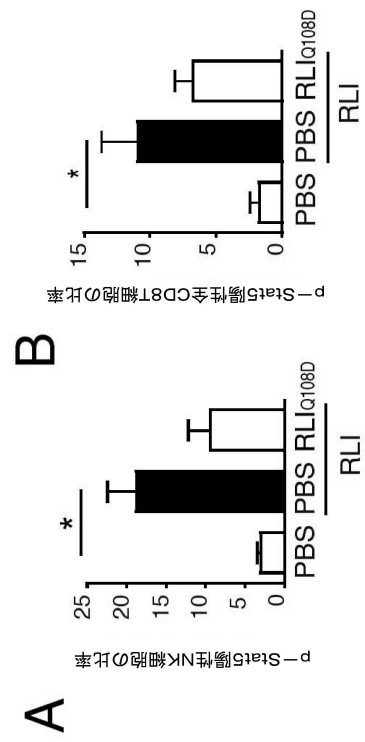
【図 15 A】



【図 15 B】

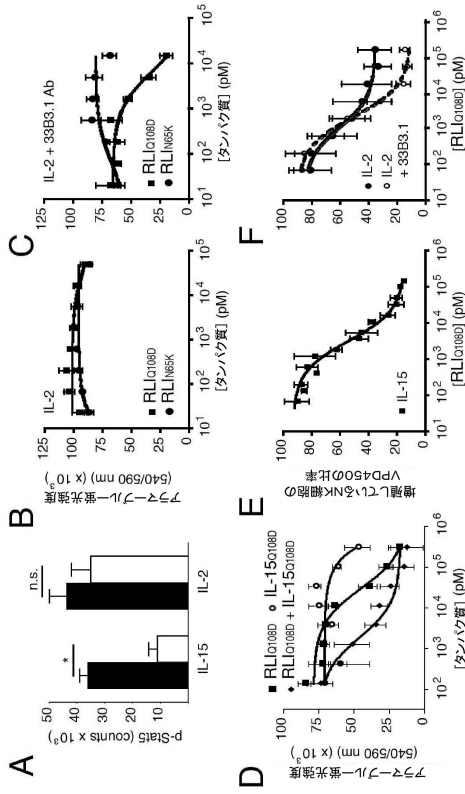


【図 17】

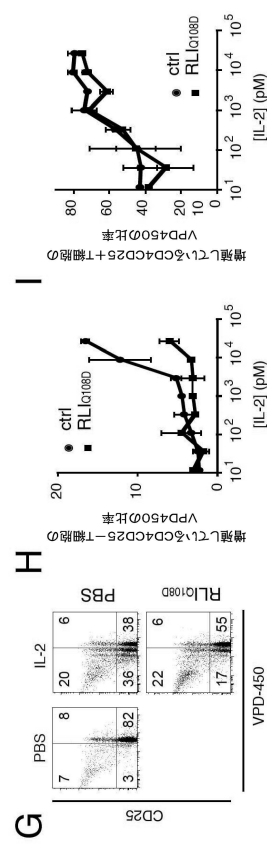


A

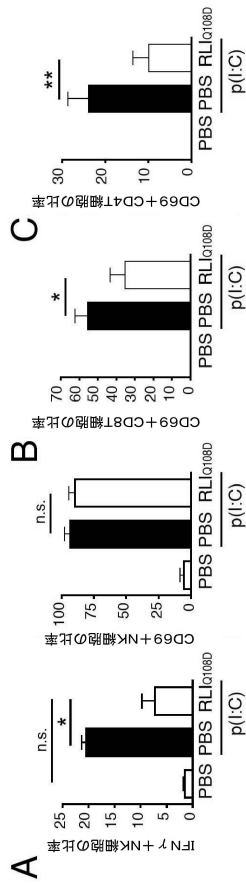
【図18A - F】



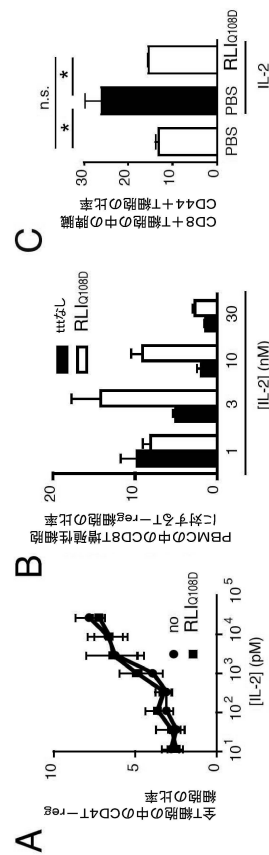
【図18G - I】



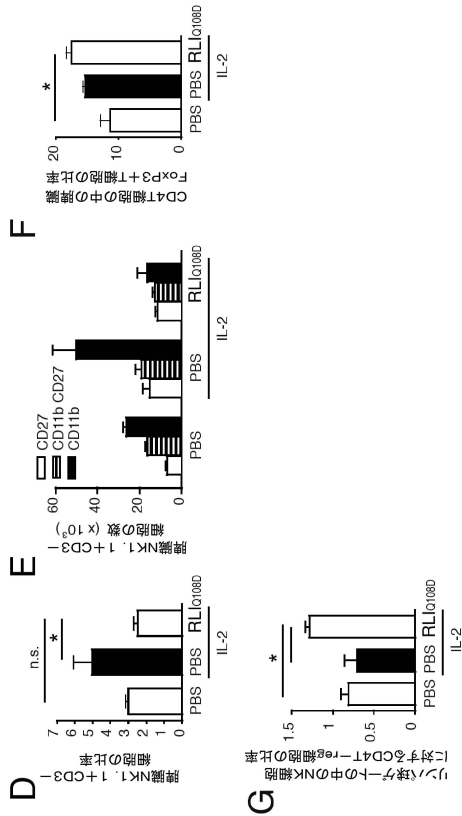
【図19】



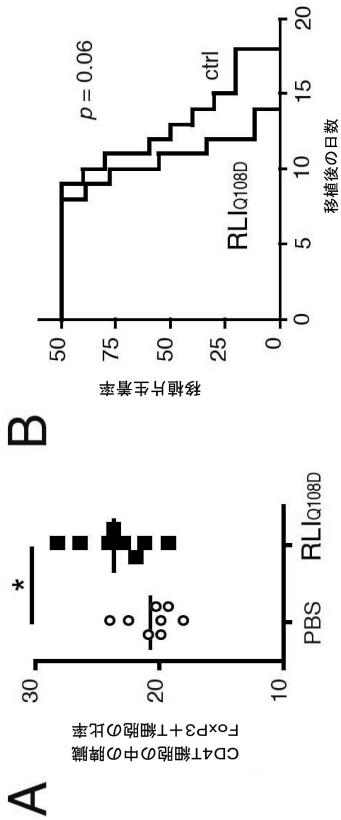
【図20A - C】



【図 2 0 D - G】



【図 2 1】



【配列表】

0006800219000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	

(73)特許権者 595040744

サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィク
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
フランス国、75016 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

(73)特許権者 518088255

サントル・オスピタリエ・ユニヴェルシテール・ドゥ・ナント
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES
フランス国、44000 ナント、アレ・ドゥ・イル・グロリエット 5

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 モルティエ, エルワン

フランス国、44007 ナント、ケ・モンクーシュ 8、ベペ・70721、アンスティチュ・
ドゥ・ルシェルシュ・アン・サンテ・イエールエス・ユエヌ、ユ892

(72)発明者 メグネム, ディーア

フランス国、44007 ナント、ケ・モンクーシュ 8、ベペ・70721、アンスティチュ・
ドゥ・ルシェルシュ・アン・サンテ・イエールエス・ユエヌ、ユ892

(72)発明者 モリソー, セバスチャン

フランス国、44007 ナント、ケ・モンクーシュ 8、ベペ・70721、アンスティチュ・
ドゥ・ルシェルシュ・アン・サンテ・イエールエス・ユエヌ、ユ892

(72)発明者 ジャック, ヤニック

フランス国、44007 ナント、ケ・モンクーシュ 8、ベペ・70721、アンスティチュ・
ドゥ・ルシェルシュ・アン・サンテ・イエールエス・ユエヌ、ユ892

審査官 西 賢二

(56)参考文献 国際公開第2006/020849(WO, A2)

特表2009-512433(JP, A)

国際公開第2015/131994(WO, A1)

国際公開第2015/018529(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

A61K 38/00 - 38/58

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)

UniProt / GeneSeq