

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-528444

(P2017-528444A)

(43) 公表日 平成29年9月28日 (2017.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/55 (2006.01)	C 0 7 K 14/55 Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

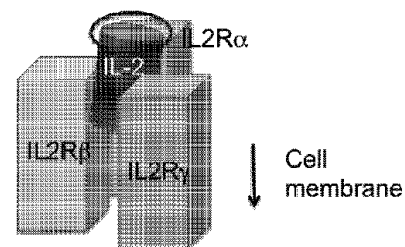
(21) 出願番号	特願2017-507401 (P2017-507401)	(71) 出願人	517020724
(86) (22) 出願日	平成27年8月10日 (2015.8.10)		デリニア, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月31日 (2017.3.31)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/044462		139, ケンブリッジ, テクノロジー
(87) 国際公開番号	W02016/025385		スクエア 400, 10ティーエイチ
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016.2.18)		フロア
(31) 優先権主張番号	62/070,016	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成26年8月11日 (2014.8.11)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の処置のために調節性T細胞を選択的に活性化させる改変IL-2変異体

(57) 【要約】

本明細書で記載される本発明は、調節性T細胞に対する選択的アゴニスト活性と、さらなるアミノ酸置換であって、循環半減期を、IL-2選択的アゴニスト単独と比較して延長する、ポリエチレングリコール (PEG) との化学的コンジュゲーションを可能とするアミノ酸置換とを伴う新規のIL-2タンパク質である。好ましいIL-2選択的アゴニスト変異体は、IL2/N88R/C125S/D109Cである。本発明は、例えば、配列番号1に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、置換D109Cを含有し、T細胞を活性化させる能力を有するIL-2変異体タンパク質を提供する。

FIGURE 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有し、置換 D 1 0 9 C を含有し、かつ T 細胞を活性化させる能力を有する I L - 2 変異体タンパク質。

【請求項 2】

配列番号 1 に対して 98% 超の配列同一性を有する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

1 0 9 位におけるシステインに連結されたポリエチレングリコール部分を有し、該ポリエチレングリコール部分の分子量が、5 ~ 4 0 k D a の間である、請求項 1 に記載のタンパク質。

10

【請求項 4】

I L - 2 タンパク質が、N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、および Q 1 2 6 F からなる群から選択される置換のうちの少なくとも 1 つを含有する、請求項 1 に記載の I L - 2 変異体タンパク質。

【請求項 5】

置換 C 1 2 5 S をさらに含む、請求項 4 に記載の I L - 2 変異体タンパク質。

【請求項 6】

前記 I L - 2 タンパク質の配列が、置換 N 8 8 R および置換 C 1 2 5 S を含有する、請求項 3 に記載の I L - 2 変異体タンパク質。

【請求項 7】

配列番号 1 に対して 98% の配列同一性を有する、請求項 6 に記載の I L - 2 変異体タンパク質。

20

【請求項 8】

請求項 4 に記載の P E G 化タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 9】

配列番号 1 に対して少なくとも 95% の配列同一性、D 1 0 9 C の置換を有し、T 細胞を活性化させる能力を有するヒト I L - 2 変異体タンパク質の循環半減期を延長する方法であって、ポリエチレングリコール部分を、1 0 9 位におけるシステイン残基に連結するステップを含み、該ポリエチレングリコール部分が、該タンパク質の循環半減期を、該ポリエチレングリコール部分を伴わない同じタンパク質と比較して延長するのに十分な長さである方法。

30

【請求項 10】

前記タンパク質が、配列番号 1 に対して 98% 超の配列同一性を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記タンパク質が、1 0 9 位におけるシステインに連結された、分子量が 5 k D a ~ 4 0 k D a の間であるポリエチレングリコール部分を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記タンパク質が、N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、および Q 1 2 6 F からなる群から選択される置換のうちの少なくとも 1 つを含有する、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記タンパク質が、置換 C 1 2 5 S をさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記タンパク質が、置換 N 8 8 R および置換 C 1 2 5 S を含有する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記タンパク質が、配列番号 1 に対して 98% の配列同一性を有する、請求項 12 に記載の方法。

50

【請求項 16】

医薬組成物を、ヒト調節性T細胞濃度を刺激するのに十分な治療有効用量で投与する、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2014年8月11日に出願された米国仮特許出願第62/070,016号への優先権の利益を主張し、その内容は、本明細書中に参考として援用される。

【背景技術】

10

【0002】

本発明の背景

免疫系は、自己と非自己とを区別することが可能でなければならない。自己／非自己の区別ができないと、免疫系は、体内の細胞および組織を破壊し、その結果として、自己免疫疾患を引き起こす。調節性T細胞は、免疫系の活性化を能動的に抑制し、病理学的な自己反応性の発生を妨げ、その帰結としての自己免疫疾患を防止する。自己免疫疾患を処置するために、調節性T細胞を選択的に活性化させる薬物および方法を開発することは、精力的な研究の対象であるが、本発明が開発されるまでは、大部分が不成功に終わっている。

【0003】

20

調節性T細胞(Treg)とは、他の免疫細胞の活性を抑制する、CD4+CD25+T細胞のクラスである。Tregは、免疫系ホメオスタシスにとって重要であり、自己抗原に対する寛容性を維持し、外来抗原に対する免疫応答をモジュレートするのに主要な役割を果たす。1型糖尿病(T1D)、全身性エリテマトーデス(SLE)、および移植片対宿主病(GVHD)を含む、複数の自己免疫疾患および炎症性疾患は、Treg細胞数が不足している、またはTreg機能が欠損していることが示されている。その帰結として、Treg細胞の数および／または機能を高める療法の開発が、大きな関心の的となっている。

【0004】

探索されている、自己免疫疾患のための1つの処置手法は、ex vivoで増やした自家Treg細胞の移植である(Tang, Q. ら、2013年、Cold Spring Harb. Perspect. Med.、3巻:1~15頁)。この手法は、疾患の動物モデルの処置およびいくつかの早期段階ヒト臨床試験において有望であることが示されているが、患者自身のT細胞を用いた個別化処置を必要とし、侵襲性であり、技法的に複雑である。別の手法は、低用量インターロイキン2(IL-2)による処置である。Treg細胞は、IL2RAサブユニット(CD25)、IL2RBサブユニット(CD122)、およびIL2RGサブユニット(CD132)から構成される高親和性IL-2受容体のIL2Rαβγを構成的に高レベルで発現することの特徴とし、Treg細胞の増殖は、IL-2に依存することが示されている(Malek, T. R. ら、2010年、Immunity、33巻:153~65頁)。慢性GVHD患者(Koreth, J. ら、2011年、N Engl J Med.、365巻:2055~66頁)およびHCV関連自己免疫性血管炎患者(Saadoun, D. ら、2011年、N Engl J Med.、365巻:2067~77頁)に対する、低用量IL-2処置についての臨床試験は、Tregレベルの上昇および臨床的有效性の証を示している。他の複数の自己免疫疾患および炎症性疾患におけるIL-2の有効性について探索する新たな臨床試験が緒についている。

30

40

【0005】

これらの試験で使用されている、IL-2の組換え形態である、プロロイキン(Prometheus Laboratories、San Diego、CAにより市販されている)は、高毒性と関連している。プロロイキンは、転移性黒色腫および転移性腎臓が

50

んの処置について承認されているが、その副作用が非常に重度であるので、その使用が推奨されるのは、集中治療へのアクセスを伴う院内環境に限られる（ウェブアドレス：www.proleukin.com/assets/pdf/proleukin.pdf）。より近年になってTreg細胞についての特徴付けがなされるまでは、IL-2は、T細胞および他の免疫細胞を活性化させて、がん細胞を消失させる、免疫系の刺激因子であると考えられていた。Treg細胞は、それらによるIL2R $\alpha\beta\gamma$ の発現に起因して、他の多くの免疫細胞型に比べより低濃度のIL-2に応答するため、自己免疫疾患におけるIL-2についての臨床試験では、Treg細胞をターゲティングする目的で、低用量のIL-2が採用されている（Klatzmann D、2015年、Nat Rev Immunol、15巻：283～94頁）。しかし、これらの低用量であってもなお、安全性および忍容性の問題が結果として生じており、使用される処置では、長期的な処置コースまたは間欠的な5日間にわたる処置コースにおいて、毎日の皮下注射が採用されている。したがって、Treg細胞の数および機能を強化し、Treg細胞をIL-2より特異的にターゲティングし、より安全であり、かつ、より忍容可能であり、投与頻度が少ない、自己免疫疾患の治療が必要とされている。

【0006】

IL-2ベースの治療の治療指数を改善するための1つの手法は、他の免疫細胞と比べて、Treg細胞に対して選択的な、IL-2の変異体を使用することである。IL-2受容体は、T細胞、NK細胞、好酸球、および単球を含む、異なる様々な免疫細胞型上で発現し、この広範な発現パターンは、免疫系および全身性の高毒性に対するその多面的影響に寄与している可能性が高い。IL-2受容体は、（1）シグナル伝達しない低親和性受容体である、IL2RA；（2）偏在的に、従来型T細胞（Tcons）上、NK細胞上、好酸球上、および単球上で発現する、IL2RBおよびIL2RGから構成される中親和性受容体（IL2R $\beta\gamma$ ）；ならびに（3）活性化T細胞上で一過性に発現し、Treg細胞上で構成的に発現する、IL2RA、IL2RB、およびIL2RGから構成される高親和性受容体（IL2R $\alpha\beta\gamma$ ）の3つの形態で存在する。IL2R $\beta\gamma$ と比べて、IL2R $\alpha\beta\gamma$ に対して選択的なIL-2変異体が開発されている（Shanafelt, A. B. ら、2000年、Nat Biotechnol、18巻：1197～202頁；Cassell, D. J. ら、2002年、Curr Pharm Des、8巻：2171～83頁）。これらの変異体は、IL2RBに対するそれらの親和性を低減する、アミノ酸置換を有する。IL-2の、IL2RGに対する親和性は、検出不能であるため、これらの変異体では、その帰結として、IL2R $\beta\gamma$ 受容体複合体に対する親和性が低減されており、IL2R $\beta\gamma$ 発現細胞を活性化させる能力も低減されているが、IL2RAに結合する能力およびIL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体複合体に結合し、これを活性化させる能力は保持されている。IL2R $\beta\gamma$ 発現NK細胞は、毒性の主要な寄与因子であるという仮説に基づき、これらの変異体のうちの1つである、IL2/N88R（Bay 50-4798）が、免疫系刺激因子としての、IL-2の低毒性のバージョンとして、臨床において調べられた。Bay 50-4798は、NK細胞と比べて、活性化T細胞の増殖を選択的に刺激することが示され、がん患者（Margolin, K. ら、2007年、Clin Cancer Res、13巻：3312～9頁）およびHIV患者（Davey, R. T. ら、2008年、J Interferon Cytokine Res、28巻：89～100頁）についてのフェーズI/II臨床試験において評価された。これらの臨床試験は、Bay 50-4798が、プロロイキンよりはるかに安全であり、より忍容可能であることを示し、また、Bay 50-4798が、Treg細胞の中で豊富な細胞集団であるCD4+CD25+ T細胞のレベルを上昇させることも示した。これらの試験に後続する、この分野における研究により、Treg細胞の固有性がさらに完全に確立され、Treg細胞は、IL2R $\alpha\beta\gamma$ を選択的に発現することが裏付けられた（Malek, T. R. ら、2010年、Immunity、33巻：153～65頁において総説されている）。この新たな研究に基づき、今では、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 選択的アゴニストは、Treg細胞に対して選択的であるはずであると理解することができる

10

20

30

40

50

。

【0007】

IL-2 ベースの治療の治療指数を改善するための第2の手法は、分子の薬物動態を最適化して、Treg細胞を最大限に刺激することである。IL-2の作用についての初期研究により、*in vitro*における、IL-2による、ヒトT細胞増殖の刺激は、有効濃度のIL-2への最低限5～6時間にわたる曝露を必要とすることが裏付けられた（Cantrell, D. A. ら、1984年、Science、224巻：1312～1316頁）。ヒト患者へと投与される場合、IL-2の血漿半減期は、静脈内投与では85分間であり、皮下投与では3.3時間と極めて短い（Kirchner, G. I. ら、1998年、Br J Clin Pharmacol、46巻：5～10頁）。その短い半減期のために、循環IL-2を、T細胞増殖を刺激するのに必要なレベルまたはこれを上回るレベルで、必要な持続時間にわたり維持することは、Treg細胞に対するEC50を有意に上回るピークIL-2レベルを結果としてもたらす高用量を必要とするか、または高頻度の投与を必要とする（図1）。これらの高IL-2ピークレベルは、IL-2Rβγ受容体を活性化させる可能性があり、他の意図されない作用または有害作用を及ぼす可能性がある。IL-2より循環半減期が長いIL-2類似体は、IL-2より低用量、低ピークレベルで、指定された期間にわたり、標的薬物濃度を達成しうる。したがって、このようなIL-2類似体では、Treg細胞を有効に刺激するのに、IL-2より低用量または低頻度の投与が必要とされる。また、IL-2薬の低頻度の皮下投与も、患者に対する忍容性が大きい。これらの特徴を伴う治療剤は、臨床における、薬理学的有効性の改善、毒性の低減、および患者による治療の遵守の改善を意味する。

10

20

【0008】

治療用タンパク質の半減期を延ばす1つの手法は、治療用タンパク質を、ポリエチレングリコール（PEG）などの非免疫原性水溶性ポリマーとコンジュゲートすることである。タンパク質の、PEG分子への化学的コンジュゲーション（PEG化）は、タンパク質の有効流体力学半径を増大させることにより循環半減期を延長し、これによって、タンパク質コンジュゲートが腎臓により血液から濾過される速度を低減する。IL-2およびIL-2の選択的アゴニストは、およそ15,000ダルトン（15kDa）という、比較的小型のタンパク質であり、腎クリアランスが急速である。PEG分子の循環半減期は、PEGの分子量に比例して延長される（Yamaoka, T. ら、1994年、J Pharm Sci、83巻：601～6頁）。

30

PEG化された治療用タンパク質の産生および製造の成功に影響を与える、多数の因子が存在する。第1に、PEG化タンパク質は、PEG分子とタンパク質との化学的コンジュゲーションにより調製されるため、PEG化に関与するさらなる製造ステップのために、タンパク質は、効率的に製造しうることが重要である。第2に、PEG部分を、特定のアミノ酸残基を介して、タンパク質に効率的にコンジュゲートするべきであり、これは均質な生成物を高収率でもたらす。第3に、タンパク質上のPEG化部位は、タンパク質の治療活性に対する干渉が最小限となるように選ぶべきである。タンパク質の治療活性に対する干渉は、PEGの、タンパク質の活性部位へのコンジュゲーションに起因する場合もあり、PEGによる活性部位に対する立体障害に起因する場合もあろう。例として述べると、PEG分子を、IL-2の第一級アミンにコンジュゲートした結果として、IL-2分子1つ当たり1つ～4つの間のPEGポリマーを含有するタンパク質分子種の異種混合物がもたらされた、PEG化されたIL-2の一形態がかつて報告された（Katre, N. V. ら、1987年、Proc Natl Acad Sci U S A、84巻：1487～91頁；Knauf, M. J. ら、1988年、J Biol Chem、15巻：263号：15064～701988頁）が、この形態は、IL-2と比べて、4～6分の1の生物学的活性の低減を呈した（Chen, S. A.、2000年、J Pharmacol Exp Ther、293巻：248～59頁）。IL-2選択的アゴニストは、Treg細胞上の3つの受容体サブユニットの複合体に結合し、これらを活性化させなければならないため、IL-2上の適切なコンジュゲーション部位は、

40

50

生物活性を最適にするために、注意深く選ばなければならない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Tang, Q. ら、2013年、Cold Spring Harb. Perspect. Med.、3巻：1～15頁

【非特許文献2】Malek, T. R. ら、2010年、Immunity、33巻：153～65頁

【非特許文献3】Koreth, J. ら、2011年、N Engl J Med.、365巻：2055～66頁

【非特許文献4】Saadoun, D. ら、2011年、N Engl J Med.、365巻：2067～77頁

【非特許文献5】Klatzmann D、2015年、Nat Rev Immunol.、15巻：283～94頁

【非特許文献6】Shanafelt, A. B. ら、2000年、Nat Biotechnol.、18巻：1197～202頁

【非特許文献7】Cassell, D. J. ら、2002年、Curr Pharm Des.、8巻：2171～83頁

【非特許文献8】Margolin, K. ら、2007年、Clin Cancer Res.、13巻：3312～9頁

【非特許文献9】Davey, R. T. ら、2008年、J Interferon Cytokine Res.、28巻：89～100頁

【非特許文献10】Cantrell, D. A. ら、1984年、Science、224巻：1312～1316頁

【非特許文献11】Kirchner, G. I. ら、1998年、Br J Clin Pharmacol.、46巻：5～10頁

【非特許文献12】Yamaoka, T. ら、1994年、J Pharm Sci.、83巻：601～6頁

【非特許文献13】Katre, N. V. ら、1987年、Proc Natl Acad Sci U S A.、84巻：1487～91頁

【非特許文献14】Knauf, M. J. ら、1988年、J Biol Chem.、15巻；263号：15064～701988頁

【非特許文献15】Chen, S. A.、2000年、J Pharmacol Exp Ther.、293巻：248～59頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、IL-2配列内の特定の位置における単一のアミノ酸置換を伴うIL-2の変異体であって、Treg細胞を活性化させるIL-2-PEGコンジュゲートの能力を保持しながら、PEG分子の安定的で特異的な化学的コンジュゲーションを可能とする変異体に関する。PEGコンジュゲーション部位として規定される、これらの指定されたアミノ酸位置は、PEG分子の、IL-2変異体へのコンジュゲーションから生じるIL-2-PEGコンジュゲートが、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体に結合し、これを活性化させるその能力の減弱を、最小限とするように選ばれる。本発明はまた、前述のIL-2変異体上のPEGコンジュゲーション部位を伴うIL-2変異体であって、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体に対して選択的であり、その帰結として、Treg細胞に対する選択性が大きいIL-2変異体にも関する。

【0011】

化学的に活性化させたPEGであって、タンパク質へのコンジュゲーションのための、多数の異なる、化学的に反応性の基を伴い、第一級アミンを含有するアミノ酸残基または

10

20

30

40

50

チオール基へのコンジュゲーションを可能とするPEGが開発されている。これらのうちで、システイン残基上に固有に存在するチオール基は、PEGの、タンパク質への、最も選択的なコンジュゲーションを可能とし、マレイミド反応性基またはヨードアセトアミド反応性基を伴うPEGは、遊離システインのチオールと極めて選択的に反応する。細胞外タンパク質内の大半のシステイン残基は、タンパク質のコンフォメーションを安定化させるジスルフィド結合に関与するが、少数の遊離（不対合）システイン残基は通例、タンパク質の内部に埋もれている（Petersen, M. T. ら、1999年、Protein Eng.、1999年、12巻：535～48頁）。タンパク質内の遊離システイン残基へのPEGコンジュゲーションは、天然の露出された遊離システイン残基、または新規の遊離システイン残基の導入を必要とする。新規の遊離システインの、タンパク質への工学的導入は、導入された新規のシステインが、他のシステインと共に、不適切な鎖内ジスルフィド結合を形成し、これによりタンパク質のミスフォールディングを引き起こしうる、または他の分子と共に鎖間ジスルフィド結合を形成し、これによりタンパク質の凝集を引き起こすしうる危険性を伴う。システイン残基を突然変異させたIL-2変異体は、ジスルフィド結合の誤対合に起因して、活性の実質的な低減を呈しうる（Wang, A. ら、1984年、Science.、224巻：1431～3頁）。本明細書では、本発明は、新規の遊離システイン残基の、IL-2変異体タンパク質への工学的導入であって、適正なタンパク質フォールディングに適合性であり、チオール反応性PEGの部位特異的コンジュゲーションを可能とし、Treg上のIL2R $\alpha\beta\gamma$ に結合し、これを活性化させる能力を保持するIL-2-PEGコンジュゲートを結果としてもたらす工学的導入に焦点を絞る。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、IL-2または半減期を延長したIL-2-PEGタンパク質の単回投与の後における、Treg細胞の増殖を刺激するのに必要な、循環半減期、ピーク薬物レベル、生物学的有効濃度と持続時間との間の関係についての概略的例示を示す。破線は、皮下注射に続く、IL-2の、時間経過にわたる血中レベルを表し、実線は、IL-2-PEGコンジュゲートの、時間経過にわたる血中レベルを表す。水平方向の点線は、それぞれ、IL2R $\alpha\beta\gamma$ を発現する細胞を活性化させるのに必要な濃度（EC50値）およびIL2R $\beta\gamma$ を発現する細胞を活性化させるのに必要な濃度（EC50値）を指し示す。双方向の矢印は、細胞の増殖を刺激するのに必要なEC50での、IL-2への曝露の持続時間（5～6時間）を指し示す。

30

【0013】

【図2】図2は、PEGまたは他の非免疫原性ポリマーのコンジュゲーションのための接合部位を決定するための戦略を表す。高親和性IL-2受容体の3つのサブユニットと複合させたIL-2が描示される。溶媒へと露出され、IL-2受容体サブユニットと相互作用しないIL-2の表面アミノ酸残基は、PEGポリマーを接合させるための候補アミノ酸残基であり、これらを丸で囲む。

【0014】

【図3】図3は、IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 複合体の3D結晶構造であって、PEGまたは他の非免疫原性ポリマーを接合させるための基準を満たす残基のアミノ酸側鎖を指し示す3D結晶構造を示す。表示の残基は、T3C、S6C、K8C、K48C、K49C、T51C、K97C、G98C、F103C、M104C、E106C、およびD109Cである。IL-2を中央前方、IL-2RBを左方、IL-2RTを右方に指し示し、IL-2RAを、上方かつ後方に指し示す。受容体複合体の、細胞膜に対する相対的な配向を、矢印により指し示す。

40

【0015】

【図4】図4は、Treg細胞について濃縮されたT細胞亜集団内における、IL2/N88R/C125S/D109CおよびPEG化されたIL2/N88R/C125S/D109Cによる、pSTAT5の選択的活性化を示す。ヒトPBMCを、各プロットの

50

上方に示される試料と共に、37℃で10分間にわたりインキュベートし、固定し、透過処理し、抗体で染色し、次いで、フローサイトメトリーにかけた。FACSプロットを、擬似カラー方式で表示する。CD4+としてゲーティングした細胞を示すが、細胞には、4つの象限の各々において示される通り、さらにゲーティングした。各象限内の数は、各ゲート内のCD4+細胞の百分率を指し示す。上象限内の細胞は、Treg細胞について濃縮された集団であり、最も高いもので1~2%のCD25発現細胞を示す。非処置細胞は、培地単独中でインキュベートし、IL-2は、 4×10^{-9} Mの濃度で添加し、IL2/N88R/C125S/D109C試料およびIL2/N88R/C125S/D109C-PEG試料は、 4×10^{-8} Mの濃度で添加し、PEG処理した試料は、IL2/N88R/C125S/D109C-PEGと同じ量のPEGを含有する、モックPEG化反応物中でインキュベートした。IL-2は、CD25^{low}細胞内およびCD25^{high}細胞内のいずれにおいても、大量のSTAT5リン酸化を刺激する。IL2/N88R/C125S/D109CおよびIL2/N88R/C125S/D109C-PEGのいずれも、定性的かつ定量的に異なる効果を及ぼし、主に1%未満の細胞内および主にCD25^{high}細胞内で、STAT5のリン酸化を刺激する。

【0016】

【図5-1】図5は、IL-2タンパク質およびIL-2選択的アゴニストタンパク質の、ヒトPBMC中の7つの異なる免疫細胞型に対する選択性を裏付ける。IL2/N88R/C125S/D109CおよびIL2/N88R/C125S/D109C-PEGのいずれも、Tregに対して、wt IL-2と比較して高度に選択性であり、複数の細胞型において、IL-2を超える選択性を示す。

【図5-2】図5は、IL-2タンパク質およびIL-2選択的アゴニストタンパク質の、ヒトPBMC中の7つの異なる免疫細胞型に対する選択性を裏付ける。IL2/N88R/C125S/D109CおよびIL2/N88R/C125S/D109C-PEGのいずれも、Tregに対して、wt IL-2と比較して高度に選択性であり、複数の細胞型において、IL-2を超える選択性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

(発明の要旨)

本明細書で記載される本発明は、調節性T細胞に対する選択的アゴニスト活性と、さらなるアミノ酸置換であって、循環半減期を、IL-2選択的アゴニスト単独と比較して延長する、ポリエチレングリコール(PEG)との化学的コンジュゲーションを可能とするアミノ酸置換とを伴う新規のIL-2タンパク質である。置換されるアミノ酸位置は、IL-2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体複合体内の、それらの溶媒への露出と、ポリマーコンジュゲート変異体が、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体複合体に結合しこれを活性化させる能力を保持する能力の予測とに基づき選択した。システインアミノ酸残基を、選択されたアミノ酸位置へと導入した、一連の組換えIL-2変異体を構築し、これらの変異体タンパク質を、活性についてスクリーニングした。発現および精製に成功したIL-2変異体は、リフォールディングさせ、マレイミド-PEGポリマーにコンジュゲートし、次いで、調節性T細胞に対する選択的アゴニスト活性について調べた。好ましいIL-2選択的アゴニスト変異体であるIL2/N88R/C125S/D109Cは、こうして同定された。この新規のタンパク質およびそのPEGコンジュゲートは、患者における調節性T細胞のレベルおよび活性を、選択的かつ効率的に高め、自己免疫病態を抑制し、したがって、自己免疫疾患を処置するための、安全で有効な治療剤となる。

【0018】

本発明はまた、配列番号1に対して少なくとも95%から98%、さらに100%までの配列同一性を有し、置換D109Cを含有し、T細胞を活性化させる能力を有するIL-2変異体タンパク質も提供する。本発明のタンパク質は、109位におけるシステインに連結されたポリエチレングリコール部分に連結され得る。ポリエチレングリコール部分の分子量は、任意選択で、5~40kDaの間である。本発明のIL-2変異体タンパク

質は、N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、および Q 1 2 6 F からなる群から選択される置換のうちの少なくとも1つを含有しうる。さらに、本発明の I L - 2 変異体タンパク質は、任意選択で、置換 C 1 2 5 S も含みうる。より好ましいのは、I L - 2 タンパク質配列が、置換 N 8 8 R および置換 C 1 2 5 S を含有する I L - 2 変異体タンパク質である。本発明のタンパク質は、任意選択で、本発明のタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物としても提供される。

【0019】

本発明はさらに、本発明のヒト I L - 2 変異体タンパク質の循環半減期を延長する方法であって、ポリエチレングリコール部分を、109位におけるシステイン残基に連結するステップを含み、ポリエチレングリコール部分が、タンパク質の循環半減期を、ポリエチレングリコール部分を伴わない同じタンパク質と比較して延長するのに十分な長さである方法も提供する。本発明の方法はさらに、ヒト調節性T細胞レベルを刺激するのに十分な治療有効用量での、タンパク質変異体の投与も提供する。

【0020】

(発明の詳細な説明)

(導入)

本発明は、I L - 2 受容体に対する高親和性、高生物活性、および I L - 2 自体と比較した循環半減期の伸長を維持しながら、P E G ポリマーの、I L - 2 変異体タンパク質への、特異的で効率的な化学的コンジュゲーションを可能とするアミノ酸置換を含む、新規の I L - 2 変異体タンパク質である。この変異体タンパク質は、公表されている I L - 2 - I L 2 R α β γ 受容体複合体の結晶構造において溶媒へと露出される、I L - 2 配列内の候補アミノ酸の位置を同定し、選択された位置においてシステイン残基を置換した、変異体タンパク質を構築する工程を介して発見された。これらの I L - 2 変異体を発現させ、精製し、十分な高レベルで産生された変異体タンパク質を、P E G - マレイミドとコンジュゲートし、次いで、I L 2 / N 8 8 R / D 1 0 9 C - P E G を、T r e g 細胞に対する生物活性について調べ、活性であることを示した。本発明により規定される分子は、自己免疫病態および炎症性病態を抑制するT細胞の小垂集団の産生を刺激する新規の機構により、自己免疫疾患の安全で有効な処置を可能とする。このパラダイム変革的治療剤は、多数の異なる自己免疫疾患を処置することができる可能性がある。

【0021】

(定義)

野生型タンパク質に由来する変異体に言及する場合、「D 1 0 9 C」などのアミノ酸置換への言及は、数(109)による位置における元の残基であるアスパラギン酸(D)と、これに続く置換された残基であるシステイン(C)を指す。

【0022】

本明細書で使用される「配列番号1に対して少なくともあるパーセント(例えば、97%)の配列同一性」とは、2つまたはそれ超の核酸またはポリペプチドの配列が同じである程度を指す。目的の配列と、第2の配列との、評価する領域にわたる、例えば、目的の配列の長さにわたるパーセント同一性は、配列アラインメントし、同一性を最大化するように、ギャップの導入を許容しながら、評価する領域内の残基(ヌクレオチドまたはアミノ酸)であって、同一な残基と向かい合う残基の数を決定し、領域内に含まれる目的の配列または第2の配列の残基の総数(いずれか大きい方)で除し、100を乗じることにより算出することができる。特定のパーセント同一性を達成するのに必要とされる同一な残基の数を算出する場合は、端数を、最も近い整数に四捨五入する(rounded to)ものとする。パーセント同一性は、様々なコンピュータプログラムを使用することにより計算することができる。例えば、B L A S T 2、B L A S T N、B L A S T P、G a p p e d B L A S T などのコンピュータプログラムは、アラインメントを生成し、目的の配列の間のパーセント同一性を提示する。K a r l i n および A l t s c h u l によるアルゴリズム(K a r l i n および A l t s c h u l、P r o c. N a t l. A c a d. S c L U S A、87巻: 22264~2268頁、1990年)であって、K a r l i n

および Altschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：5873～5877頁、1993年における通りに改変されたアルゴリズムは、Altschulら（Altschulら、J. Mol. Biol.、215巻：403～410頁、1990年）によるNBLASTおよびXBLASTプログラムへと組み込まれている。比較を目的として、ギャップ処理を施したアラインメントを得るためには、Altschulら（Altschulら、Nucleic Acids Res.、25巻：3389～3402頁、1997年）において記載されている通り、Gapped BLASTを活用する。BLASTプログラムおよびGapped BLASTプログラムを活用する場合は、それぞれのプログラムのデフォルトのパラメータを使用することができる。PAM250行列を使用することもでき、BLOSUM62行列を使用することもできる。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、The National Center for Biotechnology Information (NCBI)により公開されている。これらのプログラムについては、URLによるワールドワイドウェブアドレスを「ncbi.nlm.nih.gov」とするウェブサイトを参照されたい。特許請求の範囲の具体的な実施形態では、NCBIにより提供されているデフォルトのパラメータにより、BLAST2を使用して、パーセント同一性を計算する。

10

【0023】

本発明の「IL-2選択的アゴニスト」とは、IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 選択的アゴニストである。機能的には、「IL-2選択的アゴニスト」は、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体複合体を、IL2R $\beta\gamma$ 受容体複合体と比べて、選択的に活性化させる。「IL-2選択的アゴニスト」は、野生型IL-2タンパク質に由来し、配列番号1の野生型IL-2に対して少なくとも95%配列同一性を有するものとして構造的に規定され、Treg細胞を優先的に活性化させる能力により機能的に規定される。タンパク質はまた、Treg内のIL-2受容体によるシグナル伝達であって、CD4+CD25-low T細胞またはNK細胞と比較した、Treg細胞内のリン酸化STAT5タンパク質のレベルにより測定されるシグナル伝達を選択的に活性化させるその能力により機能的に規定することもでき、NK細胞と対比した、フィトヘマグルチニンにより刺激されるT細胞の選択的活性化により機能的に規定することもできる。

20

【0024】

「Treg」または「Treg細胞」とは、調節性T細胞を指す。調節性T細胞とは、他の免疫細胞の活性を抑制するT細胞のクラスであり、フローサイトメトリーを使用して、細胞マーカー表現型であるCD4+CD25+FOXP3+により規定される。FOXP3は、細胞内タンパク質であり、染色のために、細胞の固定と透過処理を必要とすることから、生存するTregを規定するためには、細胞表面表現型である、CD4+CD25+CD127-を使用することができる。Tregはまた、tTreg（胸腺由来）およびpTreg（末梢由来であり、末梢のナイーブT細胞から分化させた）など、多様なTregサブクラスも含む。全てのTregは、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体を発現し、それら自身のIL-2を産生せず、増殖のためにIL-2に依存するが、当業者は、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 選択的アゴニストが、いずれのクラスも選択的に活性化させることを認識する。

30

【0025】

「PEG」とは、エチレングリコールの水溶性ポリマーである、ポリ（エチレングリコール）分子である。PEG分子を、タンパク質に化学的にコンジュゲートして、それらの循環半減期を延長することができる。PEGは、異なるサイズで得ることができ、また、化学反応性基により誘導体化して、タンパク質への共有結合性のコンジュゲーションを可能とする、化学的活性化形態でも市販されている。活性化PEGは、NOF America (White Plains, NY) および Celares GmbH (Berlin, Germany) などの市販品供給源から得ることができる。直鎖状PEGは、重量平均分子量を5,000ダルトン、10,000ダルトン、20,000ダルトン、30,000ダルトン、および40,000ダルトンとするPEGポリマーなど、多様な分子量で産生されている。また、分枝状PEGポリマーも開発されている。一般に使用される

40

50

活性化PEGポリマーは、N-ヒドロキシスクシンイミド基（リシン残基およびタンパク質のN末端などの第一級アミンへのコンジュゲーションのための）、アルデヒド基（N末端へのコンジュゲーションのための）、およびマレイミド基またはヨードアセトアミド基（システイン残基など、チオールへのカップリングのための）で誘導体化されたPEGポリマーである。

【0026】

「IL-2-PEGコンジュゲート」とは、PEGを共有結合でコンジュゲートされたIL-2タンパク質である。IL-2部分は、野生型IL-2、C125S置換を伴うIL-2、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体に対する選択性を結果としてもたらすN88、D20もしくはQ126における置換を伴う前出のタンパク質のうちの1つ、またはPEG分子の部位特異的コンジュゲーションを可能とするさらなる置換を伴う前出のタンパク質のうちの1つであってよい。

10

【0027】

「生物活性」とは、細胞ベースの定量的*in vitro*アッセイにおける生物学的活性の測定値を指す。

【0028】

「Treg細胞の機能的活性化」とは、Treg内におけるIL-2媒介性の応答であると規定される。Treg細胞の機能的活性化についてのアッセイリードアウトは、pS TAT5の刺激、Treg細胞の増殖、およびTregエフェクタータンパク質レベルの刺激を含む。

20

【0029】

（PEGコンジュゲーションのための、IL-2部分のデザインおよび構築）

以下の検討項目を、所望の要件を最もよく満たすIL-2部分をデザインするための指針とした。

（1）チオールが、マレイミド活性化PEG試薬およびヨードアセトアミド活性化PEG試薬との極めて特異的な反応性を有するので、遊離（不対合）システイン残基を、IL-2へと工学的導入した。

（2）全ての構築物は、IL-2内の唯一の不対合システイン残基を除去する置換C125Sと、IL2RBに対する親和性を低減するためIL2R $\alpha\beta\gamma$ に対して選択的である置換N88Rとを伴う野生型ヒトIL-2のバックグラウンドで作製した。C125Sは、IL2RGとの主要な接触点であるQ126に直接隣接する。

30

（3）さらなる単一のシステイン置換を、IL-2上の表面への露出部位において作出して、水溶性PEGとの効率的なコンジュゲーションを可能とした。

（4）またPEGコンジュゲーション部位は、IL2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体複合体内で溶媒へと露出され（Wang, X. ら、2005年、Science、310巻：1159～63頁）、したがって、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ への結合およびその活性化を損なう可能性が小さくなるように選んだ。

（5）変異体タンパク質は、発現が良好でなければならず、適正にフォールディングしなければならない。新規の遊離システインの存在は、不適正な分子内ジスルフィド形成およびミスフォールディングを結果としてもたらす場合もあり、他の分子との分子間ジスルフィド架橋を結果としてもたらすことから、凝集をもたらす場合もある。

40

【0030】

（一般的方法）

一般に、本発明の変異体IL-2タンパク質の調製は、本明細書で開示される手順、および認知された組換えDNA技法であって、例えば、ポリメラーゼ連鎖増幅反応（PCR）、プラスミドDNAの調製、制限酵素によるDNAの切断、オリゴヌクレオチドの調製、DNAのライゲーション、mRNAの単離、適切な細胞へのDNAの導入、宿主の形質転換またはトランスフェクション、宿主の培養を包含する組換えDNA技法により遂行することができる。加えて、融合分子は、カオトロピック剤、ならびに周知の電気泳動方法、遠心分離方法、およびクロマトグラフィー方法を使用して、単離および精製することが

50

できる。これらの方法に関する開示については、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2版(1989年)) ; および Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York (1989年) を参照されたい。

【0031】

本発明の変異体タンパク質をコードする遺伝子は、所望の融合体をコードするDNAをもたらしのに採用される基本ステップとして、制限酵素による消化およびライゲーションを包含する。DNA断片の末端は、ライゲーションの前に、改変を必要とする場合があり、これは、突出を充填することにより遂行することもでき、断片の末端部分を、ヌクレアーゼ (例えば、ExoIII) により欠失させることにより遂行することもでき、部位指向性突然変異誘発により遂行することもでき、PCRにより新たな塩基対を付加することにより遂行することもできる。ポリリンカーおよびアダプターを採用して、選択された断片の接続を容易とすることができる。発現構築物は、制限、ライゲーション、およびE. coliの形質転換のラウンドを採用して、段階的にアSEMBLすることが典型的である。当技術分野では、発現構築物の構築に適する、多数のクローニングベクター (lambda、ZAP、Agilent; pET、EMD Millipore) が公知であり、特定の選び出しは、本発明にそれほど重要ではない。クローニングベクターの選択は、発現構築物を宿主細胞へと導入するために選択される、遺伝子導入系の影響を受ける。各段階の終点において、結果として得られる構築物を、制限、DNA配列、ハイブリダイゼーション、およびPCR解析により解析することができる。

10

20

【0032】

当技術分野で公知の方法により、本発明のIL-2変異体タンパク質をコードする遺伝子へと、特定の突然変異を導入するには、部位指向性突然変異誘発を使用することが典型的である。例えば、米国特許出願公開第2004/0171154号; Storiciら、2001年、Nature Biotechnology、19巻: 773~776頁; Krenら、1998年、Nat. Med.、4巻: 285~290頁; ならびにCalissanoおよびMacino、1996年、Fungal Genet. Newslett.、43巻: 15~16頁を参照されたい。本発明では、任意の部位指向性突然変異誘発手順を使用することができる。本発明の変異体を調製するのに使用しうる、多くの市販のキットが利用可能である。

30

【0033】

本発明に従い、多様なプロモーター (転写開始調節領域) を使用することができる。適切なプロモーターの選択は、提案される発現宿主に依存する。選ばれた宿主において機能的である限りにおいて、異種供給源に由来するプロモーターも使用することができる。

【0034】

IL-2タンパク質は、E. coli内で、シグナル配列を伴わずに発現させることもでき、タンパク質は、封入体から回収し、活性形態へとリフォールディングさせることができる。このような発現系は、米国特許第7,105,653B2号において記載されている。

40

【0035】

多様なシグナル配列を使用して、本明細書で記載されるタンパク質の発現を容易とすることができる。シグナル配列は、効率的な分泌のために選択またはデザインされ、また、発現宿主内のプロセッシングも使用することができる。哺乳動物細胞には、天然ヒトIL-2シグナル配列、TCRコード配列と相同なシグナル配列を使用することもでき、マウスIL-2コード配列と相同なシグナル配列を使用することもできる。他の適切なシグナル配列/宿主細胞対は、B. subtilis内で分泌させるためのB. subtilis sacBシグナル配列、およびP. pastorisによる分泌のためのSaccharomyces cerevisiae α 接合因子シグナル配列、またはP. pastoris酸ホスファターゼphoIシグナル配列を含む。シグナル配列は、シグナルペプ

50

チダーゼ切断部位をコードする配列を介して、タンパク質コード配列へと直接接続することもでき、短いヌクレオチド架橋を介して接続することもできる。

【0036】

真核生物タンパク質発現系の転写および翻訳を増強するためのエレメントが同定されている。例えば、異種プロモーターの両側1000bpの位置に、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)プロモーターを置くことにより、植物細胞内の転写レベルを、10～400倍高めることができる。発現構築物はまた、適切な翻訳開始配列も含むものとする。適正な翻訳の開始のために、コザックコンセンサス配列を含むように、発現構築物を改変することにより、翻訳レベルを10倍上昇させることができる。

【0037】

発現カセットを、採用される宿主に適合する、適切なベクターへと接続する。ベクターは、発現させる融合タンパク質をコードするDNA配列を含むことが可能でなければならない。適切な宿主細胞は、真核細胞および原核細胞、好ましくは、容易に形質転換することができ、培養培地中で急速な増殖を呈しうる細胞を含む。具体的に、好ましい宿主細胞は、*E. coli*、*Bacillus subtilis*などの原核細胞、ならびに動物細胞および酵母株、例えば、*S. cerevisiae*などの真核細胞を含む。哺乳動物細胞、特に、HEK、J558、NSO、SP2-O、またはCHOが一般に好ましい。他の適する宿主は、例えば、Sf9細胞などの昆虫細胞を含む。従来の培養条件を採用する。Sambrook、前出を参照されたい。次いで、安定に形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞株を選択することができる。また、*in vitro*における

【0038】

所望のIL-2変異体タンパク質をコードする核酸は、細胞にトランスフェクトするための標準的な技法により、宿主細胞へと導入することができる。「～にトランスフェクトすること」または「トランスフェクション」という用語は、核酸を、宿主細胞へと導入するための、従来の全ての技法であって、リン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラ媒介性トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、ウイルスによる形質導入および／または統合を含む技法を包摂することを意図する。宿主細胞にトランスフェクトするのに適する方法は、Sambrookら、前出、および他の実験室用教科書において見出すことができる。

【0039】

代替的に、本明細書で記載されるタンパク質の構築の全部または一部のために、合成遺伝子構築を使用することもできる。これは、目的のポリペプチド分子をコードするようにデザインされたポリヌクレオチド分子の、*in vitro*における合成を伴う。遺伝子合成は、Tianら(Tianら、Nature、432巻：1050～1054頁)により記載されているマルチプレックスマイクロチップベースの技術、ならびにオリゴヌクレオチドを、光プログラム型マイクロ流体チップ上で合成およびアセンブルする、同様の技術など、多数の技法を活用して実施することができる。

【0040】

本発明のIL-2変異体タンパク質は、採取された宿主細胞から単離するか、または培養培地から単離する。標準的なタンパク質精製技法を使用して、目的のタンパク質を培地から単離するか、または採取された細胞から単離する。特に、ローラーボトル、スピナーフラスコ、組織培養プレート、バイオリアクター、または発酵槽を含む、様々な手法に由来する精製技法を使用して、所望のIL-2変異体タンパク質を、大スケールで(すなわち、少なくともミリグラム量で)発現させ、精製することができる。

【0041】

組換えタンパク質への非天然のアミノ酸の組込みを可能とする、タンパク質発現系が開発されている(Kim, C. H. ら、Curr Opin Chem Biol、2013年、S1367-5931(13)00071-9)。これらの発現系は、これらの位置における、タンパク質の部位特異的なPEG化を可能とする化学的反応性を有する、

10

20

30

40

50

非天然のアミノ酸を組み込みうる。遊離システイン残基の使用に対する代替法として、当業者は、循環半減期を延長する目的で、PEGまたは他の非免疫原性ポリマーを、IL-2へと接合させる、同様の目標を達成するのにはまた、本明細書で同定されるIL-2アミノ酸位置を、システインではなく、非天然アミノ酸で置換することもできることを認識する。

【0042】

当業者はまた、本発明のIL2選択的アゴニスト部分を、他の非免疫原性ポリマーともまたコンジュゲートしうることも認識する。2つのこのようなポリマーは、アミノ酸A、E、G、P、S、およびTによる鎖である、XTENポリマー（Schellenberger, V. ら、2009年、Nat Biotechnol.、27巻：1186～90頁）、ならびにアミノ酸残基P、A、およびSによる鎖である、PASポリマー（Schlapschy, M. ら、2007年、Protein Eng Des Sel.、20巻：273～84頁）などの、組換え非免疫原性アミノ酸ポリマーである。

【0043】

（IL2選択的アゴニスト部分）

置換N88Rを伴うIL-2は、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体に対するIL2選択的アゴニストの例示的な実例である（Shanafelt, A. B. ら、2000年、Nat Biotechnol.、18巻：1197～202頁）。IL2/N88Rは、IL2RB受容体サブユニットおよびIL2R $\beta\gamma$ 受容体複合体への結合が欠損しているが、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受容体複合体に結合し、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 発現PHA活性化T細胞の増殖を、wt IL-2と同程度に効果的に刺激することが可能であるが、一方で、IL2R $\beta\gamma$ 発現NK細胞の増殖を刺激する能力の、3,000分の1への低減を示す。同様の活性プロファイルを伴う他のIL2R $\alpha\beta\gamma$ 選択的アゴニストは、置換N88I、N88G、およびD20Hを伴うIL-2を含み、また、置換Q126LおよびQ126F（IL2RGサブユニットとの接触残基）を伴う他のIL2変異体も、IL2R $\alpha\beta\gamma$ 選択的アゴニスト活性を有する（Cassel, D. J. ら、2002年、Curr Pharm Des.、8巻：2171～83頁）。当業者ならば、Fc融合タンパク質が同様の活性を有することを予測して、これらのIL2選択的アゴニスト分子のうちのいずれかで、IL2/N88R部分を代用しうることを認識する。前述の突然変異の全ては、wt IL-2、または不対合システイン残基を消失させることにより、IL-2の安定性を促進する置換である、置換C125Sを伴うwt IL-2のバックグラウンドで作製することができる。本発明はまた、IL-2受容体活性化活性に著明な影響を及ぼさずに、産生または安定性を改善する、他の突然変異または切断型と共に使用することもできる。

【0044】

本発明の変異体は、任意選択で、アミノ酸配列および核酸配列の両方に当てはまる、保存的に置換された変異体を含む。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された変異体とは、同一なアミノ酸配列もしくは本質的に同一なアミノ酸配列をコードする核酸、または、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、本質的に同一な配列を指す。具体的に、縮重コドンによる置換は、1または複数の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置を、混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換した配列を作出することにより達成することができる（Batzera, J. ら、Nucleic Acids Res.、19巻：5081頁（1991年）；Ohtsuka, J. ら、J. Biol. Chem.、260巻：2605～2608頁（1985年）；Rossolini, M. ら、Mol. Cell. Probes.、8巻：91～98頁（1994年））。遺伝子コードの縮重のために、多数の機能的に同一な核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはいずれも、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによりアラニンが指定されるあらゆる位置において、コードされるポリペプチドを変更せずに、コドンを、記載した対応するコドンのうちのいずれかへと変更することができる。このような核酸変異は、保存的に改変された変異の一種であるサイレント変異である。ポリペプチドをコードする、本明細書におけるあらゆる核酸配列はまた、核

酸の、あらゆる可能なサイレント変異についても記載している。当業者は、核酸内の各コドン（通常、メチオニンの唯一のコドンであるAUGと、通常、トリプトファンの唯一のコドンであるTGGとを除く）を、機能的に同一な分子をもたらすように改変しうること

【0045】

アミノ酸配列の保存的置換に関して、当業者は、核酸、ペプチド、ポリペプチドに対する、個々の置換、欠失、もしくは付加、またはコードされる配列内の、単一のアミノ酸もしくは少数の百分率のアミノ酸を変更するか、これらに付加するか、もしくはこれらを欠失させるタンパク質配列は、その変更が、アミノ酸の、化学的に類似するアミノ酸による置換を生ずる場合、保存的に改変された変異体であることを認識する。当技術分野では、機能的に類似するアミノ酸を提示する保存的置換表が周知である。このような、保存的に改変された変異体は、本発明の多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子に加えてのものであり、これらを除外するものではない。

【0046】

以下の群：

- 1) アラニン（A）、グリシン（G）；
- 2) セリン（S）、トレオニン（T）；
- 3) アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；
- 4) アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；
- 5) システイン（C）、メチオニン（M）；
- 6) アルギニン（R）、リシン（K）、ヒスチジン（H）；
- 7) イソロイシン（I）、ロイシン（L）、バリン（V）；および
- 8) フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）

は各々、互いに対して保存的置換であるアミノ酸を含有する。

【0047】

IL-2において忍容される保存的置換の例は、Y、31F、T51S、Q57N、E100D、およびT111Sを含む。

【0048】

（バイオアッセイ）

候補タンパク質の生物学的活性を特徴付けるためには、頑健かつ定量的なバイオアッセイが必要である。これらのアッセイは、IL2受容体の活性化を測定し、Treg内の活性化の、下流における機能的帰結を測定し、活性化Tregの、治療上意味がある転帰および機能を測定するものとする。これらのアッセイは、IL2 PEGコンジュゲート分子の治療活性および効能を測定するのに使用することができ、また、動物またはヒトにおけるIL2 PEGコンジュゲートの薬力学的特性の測定のためにも使用することができる。1つのアッセイは、リン酸化タンパク質（pSTAT5）に特異的な抗体によるフローサイトメトリーによって測定される、シグナル伝達タンパク質STAT5のリン酸化を測定する。STAT5のリン酸化は、IL-2シグナル伝達経路における不可欠のステップである。STAT5は、Tregの発生に不可欠であり、CD4+CD25+細胞内で発現したSTAT5の構成的な活性化形態は、IL-2の非存在下におけるTreg細胞の産生に十分である（Mahmud, S. A. ら、2013年、JAKSTAT、2巻：e23154頁）。したがって、Treg細胞内のリン酸化STAT5（pSTAT5）の測定は、当業者により、これらの細胞内のIL-2の活性化を反映するものとして認知され、適切な曝露時間および曝露条件を所与とした場合における、IL-2処置の、他の生物学的転帰を予測するものとなる。機能的活性化についての別のアッセイは、IL-2により刺激されるTreg細胞の増殖を測定する。当業者は、Tregの増殖を、精製Treg細胞へのトリチウム化チミジンの取り込みにより測定することもでき、フローサイトメトリーにより測定される、混合細胞集団内のTreg細胞数の増大、およびCD4+CD25+FOX P3+マーカー表現型またはCD4+CD25+CD127-マーカー

10

20

30

40

50

表現型の周波数により測定することもでき、Ki-67など、増殖に関連する細胞周期タンパク質の、Treg細胞内の発現の増大により測定することもでき、Treg細胞内の、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)などの生体蛍光色素の、細胞分裂に関連する希釈の、フローサイトメトリーでの測定により測定することもできることを認識する。IL-2による、Tregの機能的活性化についての別のアッセイは、Tregの安定性の増大である。pTreg細胞は、不安定であり、Th1エフェクターT細胞およびTh17エフェクターT細胞へと分化する潜在的可能性を有すると考える者もいる。IL-2によるTregの活性化は、Tregを安定化させることが可能であり、この分化を防止しうる(Chen, Q. ら、2011年、J Immunol.、186巻: 6329~37頁)。IL-2によるTregの刺激の別の転帰は、CTLA4、GITR、LAG3、TIGIT、IL-10、CD39、およびCD73など、Tregの機能的エフェクター分子であって、Tregの免疫抑制活性に寄与するエフェクター分子のレベルの刺激である。

10

【0049】

(製剤)

本発明の融合タンパク質による医薬組成物は、従来の方法に従う、非経口(特に、静脈内または皮下)送達のために製剤化された組成物として規定される。一般に、医薬製剤は、本発明の融合タンパク質を、食塩水、緩衝食塩水、水中に5%デキストロースなど、薬学的に許容される媒体と組み合わせて含む。製剤はさらに、1または複数の賦形剤、保存剤、可溶化剤、緩衝剤、生体表面上におけるタンパク質の喪失を防止するアルブミンなども含む。当技術分野では、製剤化の方法が周知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、Gennaro編、Mack Publishing Co.、Easton、Pa.、増補19版、1995年において開示されている。

20

【0050】

例示として述べると、医薬製剤は、本発明の融合タンパク質を含む容器を含むキットとして供給することができる。治療用タンパク質は、単回投与または複数回投与のための注射用溶液の形態で提供することもでき、注射前に再構成される滅菌粉末として提供することもでき、あらかじめ充填されたシリンジとして提供することもできる。このようなキットはさらに、医薬組成物の適応および使用法について書かれた情報も含みうる。なおまた、このような情報は、本発明の融合タンパク質は、本発明の融合タンパク質に対する過敏性を伴うことが既知の患者においては禁忌であるという言明も含みうる。

30

【0051】

本発明のIL-2-PEGコンジュゲートは、医薬組成物を含む組成物へと組み込むことができる。このような組成物は、タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含むことが典型的である。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、医薬の投与に適合する、食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むがこれらに限定されない。また、補充的な活性化化合物(例えば、抗生剤)も、組成物へと組み込むことができる。

【0052】

医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように、製剤化される。本発明のIL-2-PEGコンジュゲートは、非経口経路を介して投与される医薬組成物である可能性が高い。非経口投与経路の例は、例えば、静脈内経路、皮内経路、および皮下経路を含む。非経口適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の構成要素: 注射用水、食塩液、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの滅菌希釈剤; ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤; アスコルビン酸または硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤; エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤; アセテート、シトレート、またはホスフェートなどの緩衝剤; および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張性を調整するための薬剤を含みうる。pHは、一塩基性リン酸ナトリウムおよび/もしくは二塩基性リン酸ナトリウム、塩酸、または水酸化ナト

40

50

リウムなどの酸または塩基により調整することができる（例えば、約 7.2～7.8、例えば、7.5 の pH へと）。非経口調製物は、ガラス製またはプラスチック製の、アンプル、ディスポーザブルのシリンジ、または複数回投与用のバイアル内に封入することができる。

【0053】

注射への使用に適する医薬組成物は、滅菌水溶液または滅菌水性分散液、および滅菌注射用溶液または滅菌注射用分散液を即席で調製するための滅菌粉末を含む。静脈内投与では、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、またはリン酸緩衝食塩水（PBS）を含む。いずれの場合にも、組成物は、滅菌組成物であるものとし、容易な注射針通過性が存在する程度の流体であるものとする。組成物は、製造条件下および保管条件下で安定であるものとし、細菌および真菌など、微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、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、および液体のポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物を含有する、溶媒の場合もあり、分散媒の場合もある。分散液の場合、要求される粒子サイズの維持は、界面活性剤、例えば、ポリソルベートまたは Tween（登録商標）を使用することにより、容易とすることができる。微生物の作用の防止は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど、多様な抗菌剤および抗真菌剤により達成することができる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば、糖、多価アルコール（マンニトール、ソルビトールなど）、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。

10

20

【0054】

滅菌注射用溶液は、活性化合物を、上記で列挙された成分のうちの 1 つまたは組合せを含む適切な溶媒中に、必要とされる量で、必要に応じて組み込むことに続いて、滅菌濾過を施すことにより調製することができる。一般に、分散液は、活性化合物を、基本分散媒と、上記で列挙された成分に由来する、必要とされる他の成分とを含有する、滅菌媒体へと組み込むことにより調製する。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分に、さらなる所望の成分を加えた粉末を、あらかじめ滅菌濾過されたその溶液からもたらす、真空乾燥および凍結乾燥である。

【0055】

一実施形態では、IL-2-PEG コンジュゲートは、IL-2-PEG コンジュゲートを、体内からの急速な消失に対して保護する担体であって、インプラント送達系およびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤などの担体と共に調製される。生体分解性で生体適合性のポリマーであって、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などのポリマーを使用することができる。このような製剤は、標準的な技法を使用して調製することができる。

30

【0056】

医薬組成物は、投与のための指示書と併せて、容器内、パック内、または分注器内に組み入れることができる。

【0057】

（投与）

本発明の IL-2-PEG コンジュゲートは、非経口経路により投与することが好ましい。皮下経路は、好ましい経路であるが、また、静脈内投与、筋内投与、および真皮下投与も使用することができる。皮下経路または筋内経路のためには、デポ剤およびデポ製剤を使用することができる。ある特定の疾患には、特化された投与経路を使用することができる。例えば、炎症性眼疾患には、眼内注射を使用することができる。融合タンパク質は、総容量に対して約 0.1～10 mcg/ml の濃度で使用しうるが、0.01 mcg/ml～100 mcg/ml の範囲内の濃度も使用することができる。

40

【0058】

用量の決定は、当技術分野における技術レベルの範囲内にある。投薬は、処置期間にわたり、毎日または毎週の投薬であるが、別の間欠的な頻度の投薬でもありうる。静脈内投

50

与は、1～数時間の典型的な時間にわたる、ボーラス注射またはボーラス注入によるものとなる。また、持続放出製剤も、採用することができる。一般に、本発明の I L - 2 - P E G コンジュゲートの治療有効量とは、循環 T r e g 細胞の臨床的に有意義な変化、疾患組織内に存在する T r e g 細胞の臨床的に有意義な変化、または疾患症状の臨床的に有意義な変化など、処置される状態の臨床的に有意義な変化をもたらすのに十分な量である。

【0059】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための投与量の範囲を処方するときに使用することができる。このような化合物の投与量は、最大半量有効濃度（E C 5 0；すなわち、T r e g 細胞の最大半量刺激を達成する、被験化合物の濃度）を含み、毒性をほとんどまたは全く伴わない、循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、採用される剤形および活用される投与経路に応じて、この範囲内で変動しうる。本発明の方法で使用される任意の化合物について、まず、細胞培養アッセイから、治療有効用量を推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養物中で決定される E C 5 0 を含む、循環血漿濃度範囲を達成するように処方することができる。このような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量を、より正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、酵素免疫測定アッセイにより測定することができる。

10

【0060】

本明細書で規定される通り、I L - 2 - P E G コンジュゲートの治療有効量（すなわち、有効投与量）は、選択されるポリペプチドおよび投与頻度に依存する。例えば、患者の体重 1 k g 当たりおよそ 0 . 0 0 1 ～ 0 . 1 m g の範囲内の単回投与量を投与することができ、一部の実施形態では、1 k g 当たり約 0 . 0 0 5、0 . 0 1、0 . 0 5 m g を投与することができる。組成物は、毎日 1 回～毎週 1 回または複数回投与することもでき、毎月 1 回または複数回投与することもでき、隔日の投与も含む。当業者は、疾患または障害の重症度、処置の既往歴、対象の全般的健康状態および／または年齢、患者において存在する T r e g 細胞のレベル、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、ある特定の因子が、対象を効果的に処置するのに必要とされる投与量および投与回数に影響を及ぼしうることを察知する。なおまた、治療有効量の、本発明の I L - 2 選択的アゴニスト P E G コンジュゲートによる対象の処置は、一連の処置となる可能性が高い。

20

【0061】

（自己免疫疾患）

本発明の治療から利益を得うる疾患の一部について言及してきた。しかし、自己免疫疾患における T r e g 細胞の役割は、極めて活発な研究領域であり、さらなる疾患が、本発明により処置可能な疾患として同定される可能性が高い。自己免疫疾患とは、免疫系が、ヒト自身のタンパク質、細胞、および組織を攻撃するヒト疾患として定義される。自己免疫疾患についての包括的な列挙および総説は、The Autoimmune Diseases（Rose および Mackay、2014 年、Academic Press）において見出すことができる。

30

【0062】

本明細書において引用される、全ての刊行物および特許出願は、各個別の刊行物または特許出願が、参照により、具体的、かつ、個別に組み込まれることが指し示された場合と同様に、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0063】

前出の本発明について、理解の明確さを目的とする例示および例として、ある程度詳細に記載してきたが、本発明の教示に照らして、当業者には、付属の特許請求の範囲の主旨および範囲から逸脱しない限りにおいて、ある特定の変化および改変をこれに施しうるものがたやすく明らかとなる。

【実施例】

【0064】

以下の実施例は、例示としてだけ提示されるものであり、限定として提示されるもので

50

はない。当業者は、それほど重要でない様々なパラメータは、本質的に同様の結果をもたらすように、変化または改変しうることを、たやすく認識する。

【0065】

(1. IL-2内の候補PEG接合部位の予測)

PEGをIL-2にコンジュゲートするための候補部位を選択するために、溶媒へと露出され、IL-2の、IL-2 R α β γ への結合に直接的または立体的に干渉しないと考えられるアミノ酸残基を同定した。戦略を、図2に概略的に示す。IL-2 R α β γ 受容体の細胞外ドメインと複合したIL-2についての、公表された結晶構造(Wang, X. ら、2005年、Science、310巻:1159~63頁; Stauber, D. J. ら、2006年、Proc Natl Acad Sci、103巻:2788~93頁)を精査することにより、以下の残基:S6、K8、K48、K49、T51、E52、K54、K97、G98、F103、M104、E106、D109、およびT133(図3)を同定した。結晶構造中に見ることはできないが、近傍の残基についての情報に基づく、基準を満たす可能性が高いさらなるアミノ酸残基は、A1、P2、T3、S4、S5、S99、E100、T101、およびT102である。この候補のリストに基づき、表示の位置においてシステイン置換を伴う12の変異体(T3C、S6C、K8C、K48C、K49C、T51C、K97C、G98C、F103C、M104C、E106C、およびD109C)を構築し、産生した(表I)。

【0066】

(2. IL2選択的アゴニスト変異体タンパク質の、E. coli内のクローニング、発現、および精製)

ヒトIL-2(配列番号1)のバックグラウンドで施された、置換N88RおよびC126Sを含有する表1に列挙される置換の各々を伴うタンパク質をコードするcDNAを、制限部位NCOIおよびBAMHIをそれぞれ5'端および3'端に組み込むDNA合成(Genescript、Piscataway、NJ)により調製し、pUC57にクローニングした。次いで、NcoI部位およびBamHI部位を使用して、cDNAインサートを、pET3dベクター(EMD Millipore、Billerica、Massachusetts)にクローニングした。構築物を、BL21(DE3)細胞へと形質転換し、アンピシリン耐性について選択した。形質転換された細胞は、50 μ g/mlのアンピシリンおよび1%のグルコースを含有するLB培地による0.5Lの培養物中、37°Cで、0.6~1.0の間のABS280まで増殖させた。次いで、IPTGを、0.5mMまで添加して、タンパク質の発現を誘導し、誘導の3時間後において、培養物を採取した。

【0067】

10,000 $\times$ gで10分間にわたる遠心分離により、細胞をペレット化させた。製造元の指示書に従い、Bugbuster(EMD Millipore、Billerica、Massachusetts)を使用して、封入体(IB)を、細胞ペレットから抽出および精製し、SDS-PAGEによる解析のための試料を取り出した。IBは、0.1%(vol/vol)の2-メルカプトエタノールを含有する、0.1MのTris/HCL(pH8.0)中に8Mの塩化グアニジン中、室温で2時間にわたり溶解および変性させた。次いで、タンパク質を、室温で12時間にわたる、20倍容量の10mM Tris/HCL(pH8.0)/1mM EDTAに対する透析により、リフォールディングさせた。次いで、トリフルオロ酢酸(TFA)を、試料へと、0.1%まで添加し、遠心分離により試料を清明化させて、沈殿物を除去し、0.2 μ Mのフィルターによって濾過し、逆相クロマトグラフィーにより精製した。IL-2変異体を、Vydac 208TP54 C-8カラムへと、0.1%のTFA中、1ml/分の流量でロードし、0.1%のTFA中に0~75%のアセトニトリルの勾配で45分間にわたって溶出させた。SDS-PAGEにより画分をスクリーニングしたところ、IL-2変異体タンパク質は、典型的にはおよそ60%のアセトニトリルで溶出した。

【0068】

これらの産生研究の結果を、表 I にまとめる。産生のために選択された 12 の変異体のうち、7 つだけが、逆相クロマトグラフィーの後で、検出可能な IL-2 タンパク質ピークをもたらした。これらの 7 つのタンパク質のうち、5 つは、極めて低い収率を呈し、実施されたスケールでは、さらなる研究に不十分な材料をもたらした。残りの 2 つのタンパク質のうち、最高レベルで産生された方である、D109C 変異体を、PEG 化し、調べた。これらの結果は、単一の不対合システイン残基を伴う、これらの変異体タンパク質を産生する能力は、ばらつきが大きく、多くは、容易に産生できないことを示す。これは、E. coli 宿主に対する組換えタンパク質の毒性、封入体を形成する能力の欠如、またはリフォールディング効率の低さなど、様々な因子に起因しうるのであろう。産生工程を改変すること、または分泌タンパク質として、哺乳動物細胞などの他の発現系においてタンパク質を発現させることにより、他の変異体の一部の生産性が改善する可能性がある。しかし、本発現系では、産生レベルに基づく、D109C 変異体が、明らかな優位性を呈する。

【表 1-1】

表I: E. coliにおけるIL-2変異体タンパク質の産生についての概要

IL-2選択的 アゴニスト変異体	ピーク高(mAU) (280nM)
-	1
T3C	nd
S6C	nd
K8C	nd
K48C	1
K49C	11

【表 1-2】

IL-2選択的 アゴニスト変異体	ピーク高(mAU) (280nM)
T51C	nd
K97C	1
G98C	1
F103C	nd
M104C	2
E106C	nd
D109C	26

ピーク高とは、逆相クロマトグラフィーでの、変異体タンパク質の相対最終収率を表す。

nd=ピークの検出なし

【0069】

(3. IL2/N88R/C125S/D109CのPEG化)

精製された IL2/N88R/C125S/D109C を、20 kDa の PEG とコンジュゲートして、コンジュゲートの生物活性について調べた。IL2/N88R/C125S/D109C を、0.1 M の MES (pH 6.0) へと透析し、タンパク質濃度は、0.655 の吸光係数を使用する OD280 (0.1% のときの Abs 280nm) により決定し、50 倍モル過剰のマレイミド-PEG (20,000 g/M; NOF Am

erica、White Plains、NY)と、室温で30分間にわたり反応させた。L-システインを、マレイミド-PEGに対する2倍モル過剰まで添加することにより、反応を停止させた。SDS-PAGEによる、10ugの反応混合物についての解析は、検出可能な残留未反応IL-2タンパク質を示さなかった。

【0070】

(4. PEG化されたIL2/N88R/C125S/D109Cの、T細胞に対する活性)

PEG化されたIL2/N88R/C125S/D109Cの、T細胞に対する活性は、CD4+ T細胞サブセット内のホスホSTAT5 (pSTAT5) レベルの刺激を測定することにより決定した。IL-2の、IL2RBおよびIL2RGによるヘテロ二量体への結合を介する、IL-2受容体の活性化は、JAK1タンパク質およびJAK3タンパク質のそれぞれの、IL2RB細胞質ドメインおよびIL2RG細胞質ドメインとの相互作用を促進することから、STAT5タンパク質 (pSTAT5) のリン酸化を刺激し、次いで、これにより、IL-2シグナルが、核へと伝達される。STAT5は、Treg細胞の発生に必要であり、IL-2の非存在下における、CD4+ T細胞内の、STAT5の人工的な活性化でも、Treg細胞の産生に十分である (Mahmud, S. A. ら、2013年、JAKSTAT、2巻: e23154頁)。pSTAT5のレベルは、透過化された細胞内の蛍光活性化細胞分取 (FACS) によって、リン酸化STAT5ペプチドに対する抗体により測定した。Treg細胞は、CD25を構成的に発現し、CD25の発現レベルで上位1%の細胞は、Treg細胞について高度に濃縮されている (Jailwala, P. ら、2009年、PLoS One、2009、4巻: e6527頁; Long, S. A. ら、2010年、Diabetes、59巻: 407~15頁)。したがって、FACSデータをゲーティングし、CD25^{high} (CD25発現細胞のうちの上位1~2%) 群およびCD25^{low} 群とした。

【0071】

低温保存されたヒトPBMC (Astarte Biologics、Seattle、WA) を、解凍し、1%のヒトAB血清 (Mediatech、Manassas、VA) を含有するX-VIVO 15 (Lonza、Allendale、NJ) 培地中で洗浄し、37℃で2時間にわたり回復させた。次いで、細胞を、15×75mmの試験管内に0.1mlずつ、1ml当たりの細胞5×10⁶個の濃度で分配した。細胞を、4nMのIL-2、40nMのPEG-IL2/N88R/D109C、もしくはIL2/N88R/D109C、または、37℃で10分間にわたりL-システインと反応させた、等量のマレイミド-PEGで処置し、次いで、Cytifix Fixation Bufferにより、37℃で10分間にわたり固定した。固定された細胞を、Perm Buffer III (BD Biosciences、Santa Clara、CA) により、氷上で30分間にわたり透過処理し、洗浄し、次いで、抗CD4-Pacific Blue抗体 (BD Biosciences、Santa Clara、CA)、抗CD25-AF488抗体 (eBioscience、San Diego、CA)、および抗pSTAT5-AF547抗体 (BD Biosciences) の混合物により、20℃で30分間にわたり染色し、洗浄し、LSRII flow cytometer (BD Biosciences) でFACSにより解析した。

【0072】

この実験の結果は、IL2/N88R/C125S/D109CおよびIL2/N88R/C125S/D109C-PEGのいずれも、Treg細胞について濃縮された、CD4+CD25^{high}細胞の小垂集団を、IL-2と比較して選択的に活性化させることを示した (図2)。IL-2は、4nMのIL-2でCD4+ T細胞のうちの80%超を活性化させたが、活性化した細胞のうちの高い比率は、CD25の発現が低レベルであるか、またはCD25の発現がみられなかった。これらの結果は、PEG化されたIL2/N88R/C125S/D109Cが、Tregを活性化させる選択的能力を保持することを示す。

10

20

30

40

50

【0073】

(5. ヒトPBMC中の、IL2選択的アゴニスト-PEGコンジュゲートタンパク質の選択性)

IL2/N88R/C125S/D109C-PEGの選択性を、より広範な生物学的コンテキストにおいて決定するために、STAT5活性化を、画分化されていない粗ヒトPBMC中の、全ての鍵となる免疫細胞型にわたり測定するアッセイを開発した。ヒトPBMCを、Ficoll-Hypaque遠心分離により、正常ボランティアから単離した。PBMC 10^6 個を、グルコース (Lonza) および10%のFBS (Omega) を含むX-VIVO15培地中に懸濁させ、 10^{-8} Mの被験タンパク質と共に37℃で20分間にわたり処置した。次いで、細胞を、製造元の指示書に従い、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (EBIO) で処置した。次いで、細胞を、Cytifix bufferで固定し、実施例3で記載した通り、Perm Buffer IIIで透過処理した。次いで、固定および透過処理された細胞を、1%のFBS/PBSで洗浄し、暗所内、室温で60分間にわたり、抗体混合物で染色した。次いで、染色された細胞を、1%のFBS/PBS中で洗浄し、PBS中に再懸濁させ、Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) で解析した。抗体ミックスは、抗CD4-PerCP-Cy5.5 (BD、#560650)、抗pSTAT5-AF-488 (BD、#612598)、抗CD25-PE (BD、#560989)、抗CD56-PE-CF594 (BD、#562328)、抗FOX P3-AF647 (BD、#560889)、抗CD3-V450 (BD、560366)、および抗CD8-BV650 (Biolegend、#301041) からなった。この染色手順は、7つの鍵となる免疫細胞型内の、pSTAT5レベルのモニタリングを可能とした。

【0074】

細胞表現型は、以下の通りに規定した：Treg細胞：CD3+、CD4+、Foxp3+、CD25^{high}、CD8-、CD56-；活性化CD4 Tef f細胞：CD3+、CD4+、Foxp3-、CD25^{high}、CD8-、CD56-；CD4 Tef f細胞：CD3+、CD4+、Foxp3-、CD25^{low}、CD8-、CD56-；NK T細胞：CD3+、CD4-、Foxp3-、CD25^{low}、CD8-、CD56+；NK細胞：CD3-、CD4-、Foxp3-、CD25^{low}、CD8-、CD56+；B細胞：CD3-、CD4-、Foxp3-、CD25^{low}、CD8-、CD56-。

【0075】

このアッセイでは、タンパク質を、 10^{-8} Mの濃度で調べた。図5に示される結果は、全ての細胞集団の大部分においてpSTAT5を活性化させたwt IL2と比較して、IL2/N88R/C125S/D109CおよびIL2/N88R/C125S/D109C-PEGのいずれもが目覚ましい選択性を呈したことを示す。IL2/N88R/C125S/D109C-PEGは、Treg集団内のpSTAT5シグナルを、wt IL-2によるレベルと本質的に同じレベルで刺激した。さらなる解析 (図示しない) は、pSTAT5+ NK細胞がCD25^{high}であることを示したが、CD25^{high}は、これもまた免疫調節活性を有するNK細胞亜集団であるNK-CD56^{bright}細胞 (Poli, Aら、2009年、Immunology、126巻 (4号) : 458~65頁) の特徴である。これらの結果は、複雑な生物学的環境における、IL2/N88R/C125S/D109C-PEGの活性およびTregに対する高度な選択性を裏付ける。

【化 1】

配列表

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 配列番号1

<211> 長さ : 133

<212> 型 : FRT

<213> 生物 : ヒト

<400> 配列 : 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

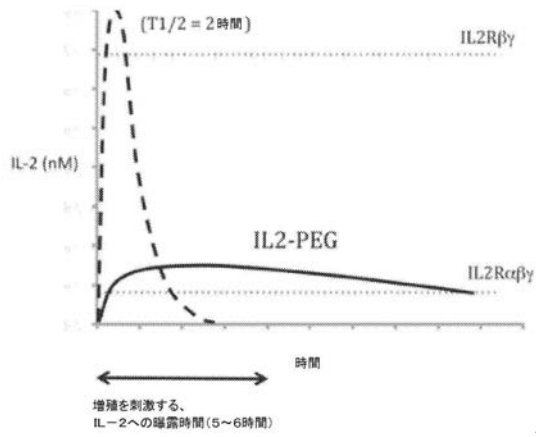
10

20

30

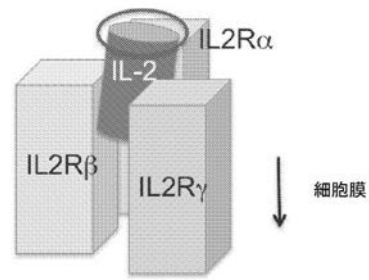
【図 1】

FIGURE 1



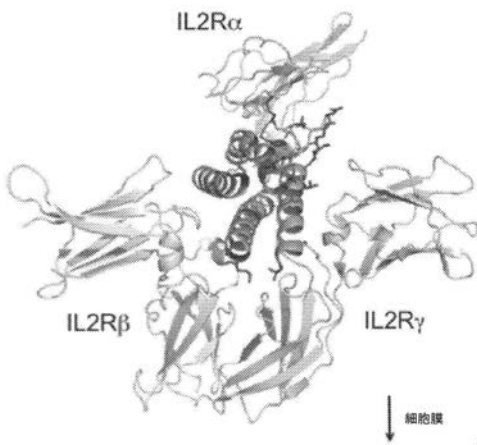
【図 2】

FIGURE 2



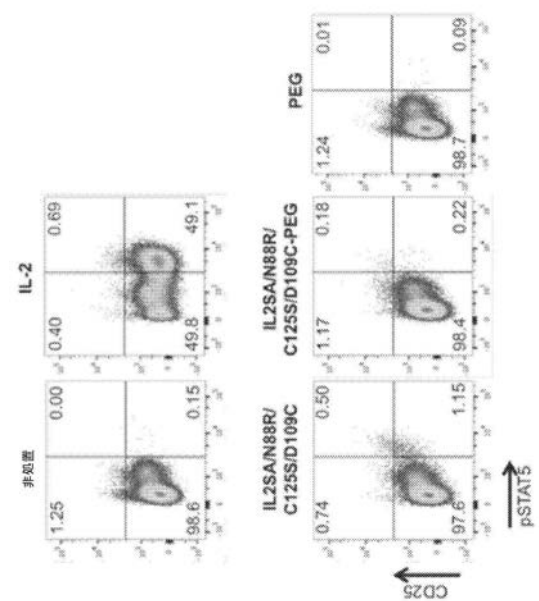
【図 3】

FIGURE 3



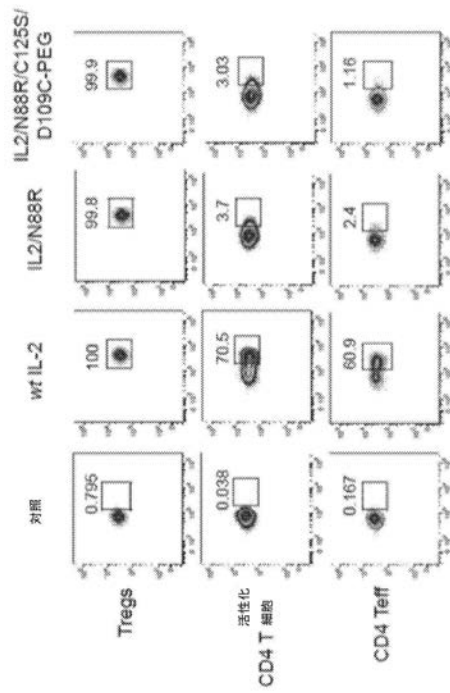
【図 4】

FIGURE 4



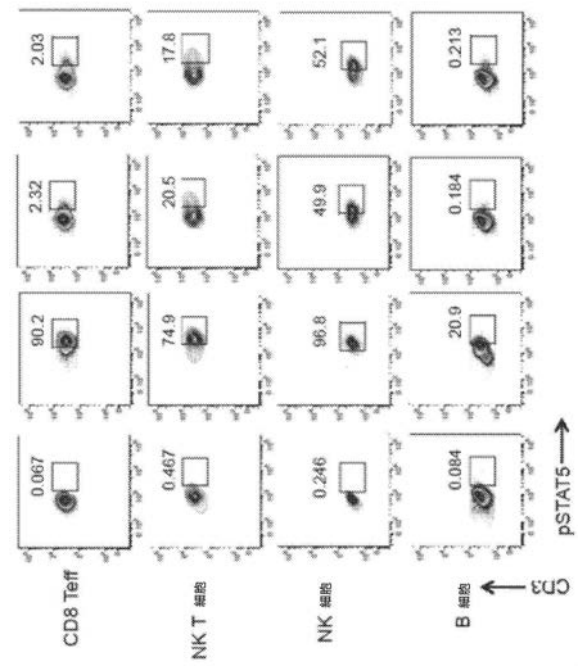
【図 5 - 1】

FIGURE 5



【図 5 - 2】

FIGURE 5 (続き)



【配列表】

[2017528444000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/44462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/20; C07K 14/55, 17/08 (2015.01) CPC - A61K 38/2013; C07K 14/55, 17/08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 38/20, 38/19, 38/17, 38/16, 38/00; C07K 14/55, 14/54, 14/46, 14/435, 14/00, 17/08, 17/02, 17/00 (2015.01); CPC: A61K 38/2013, 38/20, 38/19, 38/17, 38/16, 38/00; C07K 14/55, 14/54, 14/46, 14/435, 14/00, 17/08, 17/02, 17/00; Y10S 930/141 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/85.2, 85.1; 930/141; 435/69.52, 69.5, 69.1, 41; 530/351.350 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patseer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC, RU, AT, CH, TH, BR, PH); Lens.org PatSeq; Pubmed/NCBI Blast; EBSCO; Google; Google Scholar; Google Patents; 'interleukin 2,' 'IL-2,' 'D109C,' 'asp109cys,' 'amino acid,' 'residue, cys, cysteine,' 'polyethylene glycol,' 'PEG,' 'PEGylated,' 'substitution, mutation, polymorphism, circulation, 'in vivo,' serum, 'half life'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/023752 A1 (ROCHE GLY CART AG) February 13, 2014; page 4, lines 3-14; page 5, lines 19-23; page 23, lines 1-4	1-16
A	US 5206344 A (KATRE, N et al.) April 27, 1993; column 3, lines 38-51; column 4, lines 9-13; column 15, lines 4-28; column 16, lines 14-25	1-16
A	US 2011/0020266 A1 (NISSEN, TL et al.) January 27, 2011; paragraphs [0012]-[0014], [0043], [0071]	1-16
A	STRAUSBERG, RL et al. Generation And Initial Analysis Of More Than 15,000 Full-Length Human And Mouse cDNA Sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 24 December 2002, Vol. 99, No. 26; pages 16899-16903; DOI: 10.1073/pnas.242603899.	1-16
A	GUJAR, SA et al. Characterization Of Bioactive Recombinant Woodchuck Interleukin-2 Amplified By RLM-RACE And Produced In Eukaryotic Expression System. Vet Immunol Immunopathol. 15 August 2006, Vol. 112, No. 34; pages 183-198; DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.02.011.	1-16
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 November 2015 (06.11.2015)		Date of mailing of the international search report 08 DEC 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/60 (2017.01) A 6 1 K 47/60

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 グレーブ, ジェフリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 8, バークレー, パーク ヒルズ ロード 1 0
6 6

Fターム(参考) 4C076 CC07 CC41 EE23Q EE59Q FF31 FF36 FF63

4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA21 BA23 BA42 CA18 DA14 NA03

NA12 NA13 ZB081 ZB082 ZB221 ZB222

4H045 AA20 AA30 BA10 BA57 CA40 DA04 EA22 FA74