



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0089516
(43) 공개일자 2018년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/54 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/5443 (2013.01)
A61K 38/2086 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7020534
(22) 출원일자(국제) 2016년12월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년07월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/067042
(87) 국제공개번호 WO 2017/112528
국제공개일자 2017년06월29일
(30) 우선권주장
62/270,447 2015년12월21일 미국(US)

(71) 출원인
아르모 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94603 레드우드 시티 체사피크
드라이브 575
(72) 발명자
맥컬리 스코트 엘런
미국 캘리포니아 94005 브리즈번 샌 베니토 로드
265
멈 존 브라이언
미국 캘리포니아 94022 로스 알토스 힐즈 페이지
밀 로드 12121
찬 이반 호
미국 캘리포니아 94063 레드우드 시티 베라 애비
뉴 124에이
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 인터류킨-15 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 폐길화된 인터류킨-15-관련 분자 및 이의 식별을 기재한다. 상기 폐길화된 인터류킨-15 분자는 이들이 치료학적 사용을 위한 후보로 작용하도록 하는 특성 및 특질을 나타낸다. 본 발명은 또한 약제학적 조성물 및 사용 방법도 기술한다.

대표도 - 도1c

1C. 섬속 인간 IL-15 단백질

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)

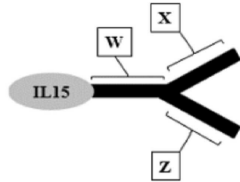
A61K 9/0019 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식을 갖는 다중-아암 PEG IL-15 분자:



(상기 식 중, x, w 및 z는 PEG의 성분을 나타내고, 그리고 IL-15는 선택적으로 링커를 통해 w에 공유적으로 부착된다).

청구항 2

청구항 1에 있어서,

각 x, w 및 z의 MW가 동일한 것인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

각 x, w 및 z 중 적어도 하나의 MW가 상이한 것인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

각 x 및 z의 MW가 동일한 것인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 5

청구항 3에 있어서,

각 x 및 z의 MW가 상이한 것인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 PEG의 MW가 7.5 kDa 내지 80 kDa인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 PEG의 MW가 30 kDa 내지 60 kDa인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 PEG의 MW가 약 50 kDa인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

각 x 및 z의 MW 가 20 kDa이며, w의 MW 가 10 kDa인, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

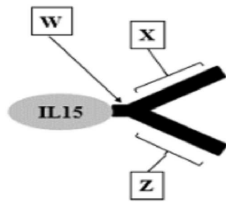
청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 IL-15가 링커를 통해 w에 공유적으로 부착되어 있는, 다중-아암 PEG IL-15 분자.

청구항 11

하기 화학식을 갖는, 분지형 PEG IL-15 분자:



(상기 식 중, x 및 z는 PEG의 성분을 나타내며, 그리고 IL-15는 링커 w를 통하여 상기 PEG에 공유적으로 부착된다).

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 PEG의 MW가 5 kDa 내지 80 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 PEG의 MW가 약 20 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

각 x 및 z의 MW 가 10 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 15

청구항 11에 있어서, 상기 PEG의 MW가 약 40 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

각 x 및 z의 MW 가 20 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 17

청구항 11에 있어서,

상기 PEG의 MW가 약 60 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

각 x 및 z의 MW 가 30 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 19

청구항 11에 있어서,

상기 PEG의 MW가 약 80 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 20

청구항 19에 있어서,

각 x 및 z의 MW가 40 kDa인, 분지형 PEG IL-15 분자.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 IL-15가 인간 IL-15 인, PEG IL-15 분자.

청구항 22

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 IL-15가 IL-15 뮤테인인, PEG IL-15 분자.

청구항 23

청구항 22에 있어서,

a) 나선 A; b) A/B 나선간 접합부; c) 나선 B; d) B/C 나선간 접합부; e) 나선 C; f) C/D 나선간 접합부; 및 g) 나선 D;을 포함하며,

상기 펩티드는 하기를 포함하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함하는, PEG IL-15 분자:

- 아미노산 잔기 2 (W), 4 내지 12 (NVISDLKKI; 서열번호: 7), 또는 16 (I) 이외의 나선 A의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는
- 아미노산 잔기 30 (D) 또는 31 (V) 이외의 A/B 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는
- 아미노산 잔기 32 (H), 35 (C), 40 (M), 42-44 (CFL), 47 (L) 또는 50 (I) 이외의 나선 B의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는
- B/C 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는
- 아미노산 잔기 59 (I), 61-66 (DTVENL; 서열번호: 8), 또는 68-70 (ILA) 이외의 나선 C의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는
- 아미노산 잔기 85 (C) 또는 88 (C) 이외의 C/D 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는
- 아미노산 잔기 99 (F), 100 (L), 103 (F), 또는 105-112 (HIVQMFIN; 서열번호: 9) 이외의 나선 D의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환.

청구항 24

청구항 23에 있어서,

상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 보존적 치환인, PEG IL-15 분자.

청구항 25

청구항 23에 있어서,

상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 위치 1, 3, 13 내지 15, 17 내지 29, 33, 34, 36 내지 39, 41, 45, 48, 49, 51 내지 58, 60, 67, 71 내지 84, 86, 87, 89 내지 98, 101, 102, 104, 113, 또는 114 중 하나에 존재하는, PEG IL-15 분자.

청구항 26

청구항 25에 있어서,

상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 위치 1, 3, 13 내지 15, 17 내지 25, 27 내지 29, 33, 34, 36 내지 39, 41, 45, 48, 49, 51 내지 58, 60, 67, 71 내지 84, 86, 87, 89 내지 98, 101, 102, 104, 113, 또는 114에서의 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한, 티로신의 치환을 포함하는, PEG IL-15 분자.

청구항 27

청구항 25에 있어서,

상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 위치 1, 3, 13 내지 15, 17 내지 25, 27 내지 29, 33, 34, 36 내지 39, 45, 48, 49, 51 내지 56, 58, 60, 67, 72 내지 84, 86, 87, 89 내지 98, 101, 102, 104, 113, 또는 114에서의 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한, 시스테인의 치환을 포함하는, PEG IL-15 분자.

청구항 28

청구항 25에 있어서,

상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 위치 1, 13 내지 15, 17 내지 22, 27 내지 29, 34, 36, 48, 49, 51 내지 58, 60, 72 내지 82, 84, 87, 89 내지 98, 102, 또는 104에서의 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한, N-X-S 글리코실화 모티프의 치환을 포함하고,

상기 N-X-S 글리코실화 모티프의 아스파라긴이 상기 아미노산 위치에 해당하는, PEG IL-15 분자.

청구항 29

청구항 25에 있어서,

상기 적어도 하나의 아미노산 치환은 위치 1, 13 내지 15, 17 내지 22, 29, 34, 36, 48, 49, 51 내지 58, 60, 71 내지 78, 80 내지 82, 84, 87, 89 내지 98, 또는 102에서의 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한, N-X-T 글리코실화 모티프의 치환을 포함하고,

상기 N-X-T 글리코실화 모티프의 아스파라긴이 상기 아미노산 위치에 해당하는, PEG IL-15 분자.

청구항 30

청구항 22 내지 29 중 어느 한 항에 있어서,

상기 IL-15가 재조합 생산된 것인, PEG IL-15 분자.

청구항 31

청구항 1, 11, 22 또는 23의 펩티드, 및 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 32

청구항 31에 있어서,

상기 부형제가 등장성 주사 용액인, 약제학적 조성물.

청구항 33

청구항 31에 있어서,

상기 약제학적 조성물이 인간 투여용으로 적합한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 34

청구항 31에 있어서,

적어도 하나의 추가의 예방제 또는 치료제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 35

청구항 31의 약제학적 조성물을 포함하는, 멸균 용기.

청구항 36

청구항 35 에 있어서, 상기 멸균 용기는 주사기인, 멸균 용기.

청구항 37

청구항 36의 멸균 용기를 포함하는, 키트.

청구항 38

청구항 37에 있어서,

적어도 하나의 추가의 예방제 또는 치료제를 포함하는 제2 멸균 용기를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 39

피험체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법으로서,

청구항 1, 11, 22 또는 23의 펩티드의 치료적 유효량을 상기 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

청구항 39에 있어서,

상기 질환, 장애 또는 병태가 증식성 장애인, 방법.

청구항 41

청구항 40에 있어서,

상기 증식성 장애가 암인, 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서,

상기 암이 고형 종양 또는 혈액학적 장애인, 방법.

청구항 43

청구항 39에 있어서,

상기 질환, 장애 또는 병태가 면역성 또는 염증성 장애인, 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서,

상기 면역성 또는 염증성 장애가 염증성 장 질환, 건선, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증 및 알츠하이머병으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 45

청구항 39에 있어서,

상기 질환, 장애 또는 병태가 바이러스성 장애인, 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서,

상기 바이러스성 장애가 인간 면역결핍 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 사이토메갈로바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 47

청구항 39에 있어서,

상기 피험체가 인간인, 방법.

청구항 48

청구항 39에 있어서,

상기 투여가 비경구 주사에 의한 것인, 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서,

상기 비경구 주사는 피하로 주사되는, 방법.

청구항 50

청구항 39에 있어서,

적어도 하나의 추가의 예방제 또는 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 51

청구항 1, 11, 22 및 23 중 어느 한 항의 PEG IL-15 분자를 제조하는 방법으로서,

활성화된 PEG 링커가 상기 IL-15의 일 아미노산 잔기에 공유적으로 부착되는 조건하에서, IL-15를 상기 링커와 반응시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서,

상기 활성화된 PEG 링커는 숙신이미딜카보네이트-PEG, PEG-부티르알데하이드, PEG-펜트알데하이드, PEG-아미도-프로피온알데하이드, PEG-우레타노-프로피오알데하이드, 및 PEG-프로필알데하이드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 53

하기 화학식을 포함하는, 페길화(pegylated)된 인터류킨-15 분자:

$(IL-15-L)_a-PEG$,

[상기 식 중, a 는 2 내지 4이고, 그리고 각 L은, 존재할 경우, 상기 PEG 분자를, i) 각 IL-15의 단일 아미노산 잔기의 아미노 기 (여기서 상기 단일 아미노산 잔기의 상기 아미노 기는 상기 N-말단 아미노산 잔기의 알파 아미노 기 또는 라이신 아미노산 잔기의 엡실론 아미노 기임), 또는 ii) N-글리코실화 부위에, 공유적으로 부착시키는 링커이다].

청구항 54

청구항 53에 있어서,

a는 2인, 페길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 55

청구항 53에 있어서,

a는 3인, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 56

청구항 53에 있어서,

a는 4인, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 57

청구항 53에 있어서,

상기 단일 아미노산 잔기의 아미노기가 상기 N-말단 아미노산 잔기의 알파 아미노기인, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 58

청구항 53에 있어서,

상기 단일 아미노산 잔기의 아미노기가 라이신 아미노산 잔기의 엡실론 아미노기인, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 59

청구항 53에 있어서,

상기 N-글리코실화 부위가 N-X-S 모티프를 포함하는, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 60

청구항 53에 있어서,

상기 N-글리코실화 부위가 N-X-T 모티프를 포함하는, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 61

청구항 53 내지 60 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEG가 5 kDa 내지 40 kDa의 분자량을 갖는, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 62

청구항 61에 있어서,

상기 PEG가 약 10 kDa의 분자량을 갖는, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 63

청구항 61에 있어서,

상기 PEG가 약 20 kDa의 분자량을 갖는, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 64

청구항 61에 있어서,

상기 PEG가 약 30 kDa의 분자량을 갖는, 폐길화된 인터류킨-15 분자.

청구항 65

폐길화된 인터류킨-15 분자 (PEG-IL-15)로서,

IL-15의 단일 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된, 적어도 하나의 분지형 또는 다중-아암 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 분자를 포함하되,

상기 아미노산 잔기는, i) 상기 N-말단 아미노산 잔기의 알파 아미노기, ii) 라이신 아미노산 잔기의 엡실론

아미노 기, 또는 iii) N-글리코실화 부위이며; 그리고 상기 PEG는 링커를 통하여 상기 IL-15에 선택적으로 공유 부착되는, 폐길화된 인터류킨-15 분자 (PEG-IL-15).

청구항 66

청구항 65에 있어서,

화학식 (PEG)_b-L-NH-IL-15를 갖되,

상기 화학식 중, 상기 PEG는 5 kDa 내지 80 kDa의 분자량의 분지형 폴리에틸렌 글리콜이고; b는 1 내지 9이고; 그리고 L은 상기 PEG를 상기 단일 아미노산 잔기에 부착시키는 선택적으로 존재하는 링커 모이어티인, PEG-IL-15.

청구항 67

청구항 65에 있어서,

화학식 (PEG)_b-L-NH-IL-15를 갖되,

상기 화학식 중, 상기 PEG는 50 kDa 내지 80 kDa의 분자량의 다중-아암 폴리에틸렌 글리콜이고; b는 1 내지 9이고; 그리고 L은 상기 PEG를 상기 단일 아미노산 잔기에 부착시키는 선택적으로 존재하는 링커 모이어티인, PEG-IL-15.

청구항 68

청구항 65 내지 67 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEG가 상기 N-말단 아미노산 잔기의 알파 아미노 기에 부착되는, PEG-IL-15.

청구항 69

청구항 65 내지 67 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEG가 라이신 아미노산 잔기의 엡실론 아미노 기에 부착되는, PEG-IL-15.

청구항 70

청구항 65 내지 67 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEG가 N-글리코실화 부위에 부착된, PEG-IL-15.

청구항 71

청구항 70에 있어서,

상기 N-글리코실화 부위가 N-X-S 모티프를 포함하는, PEG-IL-15.

청구항 72

청구항 70에 있어서,

상기 N-글리코실화 부위가 N-X-T 모티프를 포함하는, PEG-IL-15.

청구항 73

청구항 66 또는 67에 있어서,

상기 링커 모이어티가 상기 단일 아미노산 잔기에 공유적으로 부착되는, PEG-IL-15.

청구항 74

청구항 66 또는 67에 있어서,

b가 1이고, L이 C₂-C₁₂ 알킬인, PEG-IL-15.

청구항 75

청구항 66 또는 67에 있어서,

상기 링커는 숙신이미딜카보네이트-PEG, PEG-부티르알데하이드, PEG-펜트알데하이드, PEG-아미도-프로피온알데하이드, PEG-우레타노-프로피온알데하이드, 및 PEG-프로필알데하이드로 이루어진 군으로부터 선택된 활성화된 PEG 링커인, PEG-IL-15.

청구항 76

청구항 65 내지 75 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PEG가 5 kDa 내지 80.0 kDa의 분자량을 갖는, PEG-IL-15.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 본원에 전문이 참조로서 포함된 미국 가출원 일련번호 제61/270,447호 (2015년 12월 21일 출원)에 대한 이익을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은, 특히 폐길화(pegylated)된 인터류킨-15 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 서문

[0006] 인터류킨-15 (IL-15)는 NK 세포, CD8+ 기억 T-세포 및 천연 CD8+ 세포의 세포 용해 활성화, 사이토카인 분비, 증식 및 생존의 자극에 관여하는 사이토카인이다 [참조: Fehniger, et al., J Immunol 162:4511-20 (1999)]. 이는 다면발현성 사이토카인으로서, 선천성 및 적응성 면역력에서 중요한 역할을 수행한다 [문헌참조: Lodolce, et al., Cytokine Growth Factor Rev 13(6):429-39 (December 2002)) and Alves, et al., Blood 102:2541-46 (2003)].

[0007] IL-15는 대식세포, 단구 세포, 수지상 세포 및 섬유아세포를 포함하는 다수의 세포 유형에 의해 구성적으로 발현된다 [Grabstein, et al., Science 264(5161):965-68 (May 1994)]. IL-15의 발현은 예를 들어, 사이토카인 (예를 들어, GM-CSF), 이중 가닥 mRNA, 메틸화되지 않은 CpG 올리고뉴클레오타이드, 톨형 수용체를 통한 리포폴리사카라이드, 및 인터페론 (예를 들어, IFN- γ)에 의해, 또는 예를 들어, 헤르페스 바이러스, 마이코박테리움 튜버쿨로시스 및 칸디다 알비칸스로 단핵구의 감염 후 자극될 수 있다 [문헌참조: Bamford, et al., J Immunol 160(9):4418-26 (May 1998)].

[0008] IL-15는 T-세포 및 NK 세포 상의 특이적 수용체 복합체에 결합한다. IL-15 및 IL-15R α 는 활성화 수지상 세포에서 함께 발현되고, IL-15는 IL-15R α 와 복합체로 기능한다 [Bergamaschi, et al., J Biol Chem 283:4189-99 (2008)]. IL-15/IL-15 α 는 T-세포 및 NK 세포 상의 두 개의쇄 - IL-2R β (IL-15R β 로서 지칭되기도 함; CD122) 및 γ c (IL-2RG로서 지칭되기도 함; CD132; γ -c; 일반적인 γ -쇄) 분자에 헤테로다имер로서 결합한다. β 및 γ c쇄는 IL-2와 IL-15 간에 공유되고 이들 사이토카인의 신호전달을 위해 필수적이다 [Giri et al., EMBO J. 13:2822-30 (1994) and Giri et al., EMBO J. 14:3654-3663 (1995)].

[0009] IL-2/IL-15 β γ c 수용체 복합체의 공유와 일치하여, IL-15는 시험관내에서 IL-2와 유사한 많은 기능을 매개하는 것으로 나타났다. 그들은 많은 생물학적 활성을 공유하고, T 림프구의 생존에 유사한 기여를 한다 [참조: Waldmann, et al., Annu Rev Immunol 17:19-49 (1999)]. IL-2와 IL-15 사이의 생물학적 차이는, 예를 들어, 그들의 상이한 생산 부위, 각각 IL-2 α 및 IL-15R α 라 지칭되는 막 수용체 단백질과의 그들의 결합 강도 및 이러한 여분의 수용체 분자의 조절에 기인하는 것으로 간주된다. IL-2 및 IL-15는 CD8+ 기억 세포의 수를 조절하는데 역할을 한다.

[0010] IL-15가, 예를 들어, 특정 바이러스성 장애 및 암성 상태를 포함하는 다수의 질환, 장애 및 병태에 관련되어 있

다는 사실에도 불구하고, IL-15 - 관련 제제는 현재 시판되지 않는다. 따라서, 안전하고 효과적인 IL-15 제제는 지금까지 충족되지 않은 의학적 필요를 해결할 것이다.

발명의 내용

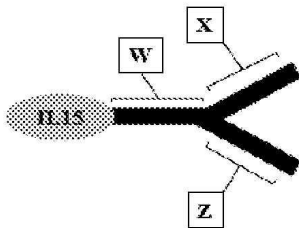
- [0011] 본 발명은 폐길화된 IL-15 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 용어 “IL-15”, “IL-15 폴리펩티드(들),” “IL-15-제제(들),” “IL-15 분자(들)” 등은 광범위하게 해석되도록 의도되고, 예를 들어, 상동체, 변이체 (뮤테인 포함) 및 이의 단편을 포함하는 인간 및 비인간 IL-15 - 관련 폴리펩티드 뿐만 아니라, 예를 들어, 리더 서열 (예: 신호 펩티드)를 갖는 IL-15 폴리펩티드를 포함한다. 보다 특히, 본원의 개시내용은 폐길화된 IL-15 제제에 대한 것이고 이들은 이들이 다른 IL-15 분자보다 우수하게 하여 치료학적 관점에서 더욱 이롭게 하는 적어도 하나의 성질 또는 다른 특징 (예를 들어, 연장된 반감기)를 갖는다.
- [0012] 성숙한 인간 IL-15는 114개의 아미노산 단량체성 폴리펩티드이다. 두 개의 전사물이 보고되었고, 하나는 48개의 아미노산 신호 펩티드 (긴 신호 펩티드; LSP) (도 1a; 서열번호: 1), 및 나머지는 21개의 아미노산 신호 펩티드 (짧은 신호 펩티드; SSP) (도 1b; 서열번호: 2), 이들 둘 다는 동일한 성숙 단백질을 생성한다 (도 1c; 서열번호: 3). 본원의 개시내용은 성숙한 hIL-15 단백질이 본원에 기재된 하나 이상의 PEG 모이어티로 폐길화된 구현 예를 기재한다. 특정 구현예에서, PEG 모이어티는 hIL-15의 N-말단에 부착되고 다른 구현예에서는 C-말단에 부착되고 또 다른 추가의 구현예에서 N-말단 및 C-말단과는 다른 하나 이상의 잔기에, (즉, hIL-15의 잔기 2 내지 113 번 중 하나 이상의 잔기에) 부착된다.
- [0013] 본원의 개시내용의 특정 구현예는 본원에 기재된 PEG 모이어티 중 하나 이상으로 폐길화되어 재조합적으로 제조될 수 있는 IL-15 뮤테인을 포함한다. 본원에 나타난 바와 같이, 성숙한 인간 IL-15는 3개의 상이한 아미노산 절편 (A/B 루프; B/C 턴; 및 C/D 루프)에 의해 연결된 4개의 나선 (A-D) [또한 나선간 접합부(inter-helices junction)들로 지칭됨]을 포함하는 것으로 기재된다. PEG 모이어티의 부착을 촉진시키도록 돌연변이되고/되거나 변형될 수 있는 IL-15 나선구조 및 나선간 접합부의 아미노산 잔기 및 영역은 이후 상세하게 기재된다. 특정 구현예에서, PEG 모이어티는 IL-15 뮤테인의 N-말단에 부착되고, 다른 구현예에서는 IL-15 뮤테인의 C-말단에 부착되고, 그리고 또 다른 추가의 구현예에서 IL-15 뮤테인의 N-말단 및 C-말단이 아닌 하나 이상의 잔기에 부착된다.
- [0014] 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단, 리신 잔기, 시스테인 잔기, 히스티딘 잔기, 아르기닌 잔기, 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기, 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 티로신 잔기 및 C-말단의 폐길화를 위한 화학물질이 현재 존재한다.
- [0015] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 도 1c (서열번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 폐길화된 IL-15 펩티드를 고려한다. 이때, 상기 펩티드는 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 포함하고, 상기 치환(들), 결실(들) 또는 첨가(들)는, 예를 들어, 용해도 또는 면역원성에 악영향을 미치지 않는다. 본 개시내용은 도 1c (서열 번호: 3)의 아미노산 서열에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 펩티드를 고려한다. 추가로, 폐길화된 IL-15 분자는 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 95, 적어도 100, 적어도 101, 적어도 102, 적어도 103, 적어도 104, 적어도 105, 적어도 106, 적어도 107, 적어도 108, 적어도 109, 적어도 110, 적어도 111, 적어도 112 또는 적어도 113개 아미노산 잔기를 갖는다.
- [0016] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 도 1c (서열 번호: 3)의 생체활성 보다 큰 생체활성을 갖는 폐길화된 IL-15 펩티드를 고려한다. 기타 특정 구현예에서, 본 개시내용은 도 1c (서열 번호: 3)의 생체활성에 필적하는 생체활성을 갖는 폐길화된 IL-15 펩티드를 고려한다. 또 다른 추가의 특정 구현예에서, 본 개시내용은 도 1c (서열 번호: 3)의 생체활성보다 낮은 생체활성을 갖는 폐길화된 IL-15 펩티드를 고려한다. 생체활성은 본원에서 고려되는 폐길화된 IL-15 펩티드의 유용성을 평가하기 위해 사용될 수 있는 여러 변수 및 특징 중 하나일 뿐이다. 예를 들어, 폐길화된 IL-15 펩티드의 EC50, 최대 활성화 및 면역원성과 같은 변수는 이들이 실행가능한 치료학적 후보물인지를 결정하는데 중요할 수 있다. 일부 구현예에서, 폐길화된 IL-15 펩티드의 하나 이상의 변수는 야생형 IL-15에서의 변수보다 덜 선호될 수 있지만, 전체로 취해진 폐길화된 IL-15 펩티드의 변수는 펩티드가 실행가능한 치료학적 후보물이 되도록 한다.
- [0017] 생체활성은 케모카인 방출 검정, TNF α 생산 검정, CTLL-2 세포 증식 검정, M07e 세포 증식 검정, 또는 T-세포 IFN γ 분비 검정을 포함하는, 당해 분야에 공지된 어떠한 방법으로도 결정될 수 있다. T-세포 스크리닝은 CD4+ 세포, CD8+ 세포 또는 NK 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 숙련가는 이러한 검정에 친숙하고, 그들 다수에 대

한 예시적 프로토콜이 본원에 기재된다. 마찬가지로, 폐길화된 IL-15 펩티드의 면역원성은 T-세포 에피토프 또는 B-세포 에피토프 중 적어도 하나에 대한 스크리닝에 의한 예측을 포함하여 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 예측되거나 결정될 수 있다. 일 양태에서, 면역원성은 인 실리코 시스템 및/또는 생체의 면역검정 시스템에 의해 예측된다.

[0018] 본원에 고려되는 폐길화된 IL-15 펩티드는 링커를 통해 IL-15의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단 폐길화) 적어도 하나의 PEG 분자를 포함할 수 있다. 링커는 이후에 상세히 기재된다. 일부 구현예에서, IL-15 상의 둘 이상의 상이한 부위는 하나 이상의 돌연변이를 도입한 다음 그들 각각을 변형시킴으로써 폐길화될 수 있다. 추가의 구현예에서, N-말단은 하나 이상의 돌연변이의 도입, 및 IL-15 단백질 내의 다른 곳에서의 이의 폐길화와 함께 폐길화될 수 있다. 또 다른 추가의 구현예에서, C-말단은 하나 이상의 돌연변이의 도입, 및 IL-15 단백질 내의 다른 곳에서의 이의 폐길화와 함께 폐길화될 수 있다. IL-15의 티로신 26은 N-말단의 폐길화와 함께 폐길화될 수 있다. 추가의 구현예에서, IL-15 펩티드는 N-말단 및 C-말단에서의 폐길화를 포함할 수 있다. 예시적 폐길화 조건은 숙련자에게 공지되어 있다. 추가의 구현예에서, N-말단은 하나 이상의 돌연변이의 도입, 및 IL-15 단백질 내의 다른 곳에서의 이의 폐길화와 함께 폐길화될 수 있다. PEG 성분은 상기 펩티드에 용인되는 임의의 PEG일 수 있다.

[0019] IL-15의 비교적 작은 크기 때문에, PEG의 분자 질량은 많은 다른 단백질 치료제에 사용된 것보다 클 수 있다. 예로서, 변형된 펩티드의 PEG 성분은 일부 구현예에서 5kDa 내지 20kD의 분자 질량을, 다른 구현예에서는 20kDa 초과인 분자 질량을, 특정 구현예에서는 25kDa 초과인 분자 질량을, 또 다른 구현예에서는 30kDa 초과인 분자 질량을, 추가의 구현예에서는 35 kDa 초과인 분자 질량을, 또 다른 구현예에서는 적어도 40kD의 분자 질량을 갖는다. 특정 구현예에서, PEG는 20 내지 40kDa의 분자 질량을 갖는다. 다른 분자 질량 값을 갖는 PEG가 본원에 기재되어 있다.

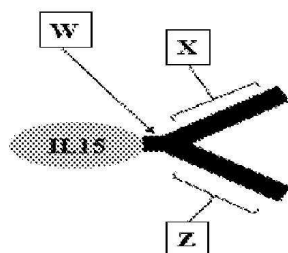
[0020] 본 개시내용의 특정 구현예는 하기 화학식을 갖는 다중-아암 PEG IL-15 분자를 포함한다:



[0021]

[0022] 상기 식 중, x, w 및 z는 PEG의 성분을 나타내고, IL-15는 선택적으로 링커를 통해 w에 공유적으로 부착된다. x, w 및 z 각각의 MW가 동일하고, x, w 및 z 중 적어도 하나의 MW가 상이하고, x 및 z 각각의 MW가 동일하고 x 및 z 각각의 MW가 상이한 구현예를 고려한다. 본원의 개시내용은 PEG의 MW가 7.5 kDa 내지 80 kDa이거나, 15 kDa 내지 45 kDa이거나, 15 kDa 내지 60 kDa이거나, 15 kDa 내지 80 kDa이거나, 20 kDa 내지 30 kDa이거나, 20 kDa 내지 40 kDa이거나, 20 kDa 내지 60 kDa이거나, 20 kDa 내지 80 kDa이거나, 30 kDa 내지 40 kDa이거나, 30 kDa 내지 50 kDa이거나, 30 kDa 내지 60 kDa이거나, 30 kDa 내지 80 kDa이거나, 40 kDa 내지 60 kDa이거나, 40 kDa 내지 80 kDa인, 구현예를 고려한다. 특정 구현예에서, x 및 z 각각의 MW는 20 kDa이고, w의 MW는 10 kDa이다. 다른 크기의 PEG, PEG 분포 등이 이후에 기재되고 본원에서 고려된다.

[0023] 추가의 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 하기 화학식을 갖는 분지형 PEG IL-15 분자를 고려한다:



[0024]

[0025] 상기 식 중, x 및 z는 PEG의 성분을 지칭하며, IL-15는 링커 w를 통하여 PEG에 공유적으로 부착된다. 특정 구현예에서, PEG의 MW는 약 20 kDa, 약 30 kDa, 약 40 kDa, 약 50 kDa, 약 60 kDa, 약 70 kDa, 또는 약 80 kDa 이

상이다. 특정 구현예는, 각각의 x 및 z의 MW가 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 또는 40 kDa인 것으로 고려된다.

[0026] 본원의 개시내용은 PEG IL-15 분자가 다음을 포함하는 구현예를 고려한다: a) 나선 A, b) A/B 나선간 접합부, c) 나선 B, d) B/C 나선간 접합부, e) 나선 C, f) C/D 나선간 접합부 및 g) 나선 D; 여기서, 상기 펩티드는 하기를 포함하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함한다: 아미노산 잔기 2 (W), 4-12 (NVISDLKKI; 서열번호: 7), 또는 16 (I) 이외의 나선 A의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 아미노산 잔기 30 (D) 또는 31 (V) 이외의 A/B 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 아미노산 잔기 32 (H), 35 (C), 40 (M), 42-44 (CFL), 47 (L) 또는 50 (I) 이외의 나선 B의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 B/C 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 아미노산 잔기 59 (I), 61-66 (DTVENL; 서열번호: 8), 또는 68-70 (ILA) 이외의 나선 C의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 아미노산 잔기 85 (C) 또는 88 (C) 이외의 C/D 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 아미노산 잔기 99 (F), 100 (L), 103 (F), 또는 105-112 (HIVQMFIN; 서열번호: 9) 이외의 나선 D의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환. 아미노산 치환(들)은 특정 구현예에서 보존성 치환이다.

[0027] 본 개시내용은 추가로, 하기를 고려한다: PEG IL-15 분자가, 위치 1, 3, 13-15, 17-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114 중 하나에서의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 구현예; PEG IL-15 분자가 위치 1, 3, 13-15, 17-25, 27-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114에서의 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한, 티로신의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 구현예; 및 PEG IL-15 분자가 위치 1, 3, 13-15, 17-25, 27-29, 33, 34, 36-39, 45, 48, 49, 51-56, 58, 60, 67, 72-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114에서의 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한, 시스테인의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 구현예.

[0028] 본원의 개시내용의 또 다른 추가의 구현예에서, PEG IL-15 분자에는 위치 1, 13-15, 17-22, 27-29, 34, 36, 48, 49, 51-58, 60, 72-82, 84, 87, 89-98, 102, 또는 104에서 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한 N-X-S 글리코실화 모티프의 적어도 하나의 아미노산 치환이 있으며, 이때 N-X-S 글리코실화 모티프의 아스파라긴은 상기 아미노산 위치에 해당한다. 본원의 개시내용의 또 다른 추가의 구현예에서, PEG IL-15 분자에는 위치 1, 13-15, 17-22, 29, 34, 36, 48, 49, 51-58, 60, 71-78, 80-82, 84, 87, 89-98, 또는 102에서 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한 N-X-T 글리코실화 모티프의 적어도 하나의 아미노산 치환이 있으며, 이때 N-X-T 글리코실화 모티프의 아스파라긴은 상기 아미노산 위치에 해당한다.

[0029] 본 개시내용은, 본원에 기술된 PEG IL-15 분자를 제조하기 위한 방법을 고려하며, 이는 링커가 IL-15의 일 아미노산 잔기에 공유적으로 부착되는 조건 하에서 IL-15를 활성화 PEG 링커와 반응시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 활성화된 PEG 링커는 숙신이미딜카보네이트-PEG, PEG-부티르알데하이드, PEG-펜트알데하이드, PEG-아미도-프로피온알데하이드, PEG-우레타노-프로피오알데하이드, 및 PEG-프로필알데하이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0030] 본원의 개시내용의 추가의 특정 구현예는 화학식 (IL-15-L)_a-PEG을 포함하는 폐결화된 인터류킨-15 분자를 고려하며; 여기서 a 는 2-4이고, 그리고 각 L은 존재할 경우 PEG 분자를 하기에 공유적으로 부착시키는 링커이다: i) 각 IL-15의 단일 아미노산 잔기의 아미노 기 (여기서 상기 단일 아미노산 잔기의 아미노 기는 N-말단 아미노산 잔기의 알파 아미노 기 또는 라이신 아미노산 잔기의 엡실론 아미노 기임), 또는 ii) N-글리코실화 부위 (예컨대, N-X-S 모티프 또는 N-X-T 모티프). 특정 구현예에서, a = 2, a = 3, 또는 a = 4이다.

[0031] 본 개시내용의 추가 구현예는 IL-15의 단일 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된, 적어도 하나의 분지형 또는 다중-아암 PEG 분자를 포함하는 PEG-IL-15 분자를 고려하며, 여기서 상기 아미노산 잔기는, i) N-말단 아미노산 잔기의 알파 아미노 기, ii) 라이신 아미노산 잔기의 엡실론 아미노 기, 또는 iii) N-글리코실화 부위 (예컨대, N-X-S 모티프 또는 N-X-T 모티프)이며; 그리고 상기 PEG는 링커를 통하여 IL-15에 선택적으로 공유 부착된다. 상기 구현예의 일부에서, PEG-IL-15는 하기 화학식을 포함한다: (PEG)_b-L-NH-IL-15, 상기 식 중, PEG는 5 kDa 내지 80 kDa의 분자량의 분지형 폴리에틸렌 글리콜이고; b는 1 내지 9이고; L은 PEG를 단일 아미노산 잔기에 부착시키는, 선택적으로 존재하는 링커 모이어티이다. 상기 구현예의 기타에서, PEG-IL-15는 화학식 (PEG)_b-L-NH-IL-15를 포함하는데; 상기 식 중, PEG는 50 kDa 내지 80 kDa의 분자량의 다중-아암 폴리에틸렌 글리콜이고; b는 1 내지 9이고; L은 PEG를 단일 아미노산 잔기에 부착시키는, 선택적으로 존재하는 링커 모이어티이다. 특정 구현예에서, b는 1이고 L은 C₂-C₁₂ 알킬이다.

- [0032] 본 발명은 본원에 기재된 펩티드, 및 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 부형제는 등장성 주사 용액이다. 약제학적 조성물은 피험체(예: 인간)에게 투여하기에 적합할 수 있고, 하나 이상의 추가의 예방적 또는 치료적 제제를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 멸균 용기(예: 단일- 또는 다용도 바이알 또는 주사기)에 함유된다. 키트는 멸균 용기(들)를 함유할 수 있고, 키트는 또한 적어도 하나의 예방적 또는 치료적 제제 또는 약물학적 요법에 사용될 수 있는 임의의 다른 제제를 포함하는 하나 이상의 추가의 멸균 용기를 함유할 수 있다. 이러한 국면의 예는 본원에 기재된다.
- [0033] 본 발명의 추가의 구현예는 본원에 기재된 펩티드의 치료적 유효량을 투여함을 포함하여, 피험체(예: 인간)의 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 포함한다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 암 또는 암 관련 장애(예: 고형 종양 또는 혈액학적 장애); 면역 또는 염증성 장애(예: 염증성 장 질환, 건선, 류마티스성 관절염, 유육종증, 다발성 경화증 및 알츠하이머병); 바이러스 장애(예: 인간 면역결핍 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 사이토메갈로 바이러스)를 포함하는 증식성 장애이다.
- [0034] 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법에서, 본원에 기재된 펩티드의 치료적 유효량의 투여는 비경구 주사(예: 피하)를 포함하여 펩티드에 적합한 선택적으로 경로에 의해서일 수 있다. 하나 이상의 추가의 예방적 또는 치료적 제제는 펩티드와 함께(예: 이전에, 동시에 또는 이후에) 투여될 수 있고/있거나, 이는 펩티드와 개별적으로 투여되거나 배합될 수 있다.
- [0035] 추가의 구현예는 본원의 교시를 검토한 후 당업자에게 자명하게 된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1a는 IL-15 긴 신호 펩티드(LSP) 단백질(162개의 아미노산 잔기; 서열번호: 1)을 도시한다. 신호 펩티드(밑줄침)는 잔기 1-48을 포함한다.
- 도 1b는 IL-15 짧은 신호 펩티드(SSP) 단백질(135개의 아미노산 잔기; 서열번호: 2)를 도시한다. 신호 펩티드(밑줄침)는 잔기 1-21을 포함한다.
- 도 1c는 성숙한 인간 IL-15 단백질(114개의 아미노산 잔기) (서열번호: 3)을 도시한다.
- 도 2a는 긴 신호 펩티드(LSP) cDNA 오픈 리딩 프레임(ORF)(162개의 아미노산 잔기를 암호화하는 489개의 염기쌍(서열번호: 4))을 도시한다. 신호 펩티드(밑줄침)는 첫번째 48개의 아미노산을 암호화하는 염기쌍 1-144를 포함한다.
- 도 2b는 짧은 신호 펩티드(SSP) cDNA 오픈 리딩 프레임(ORF)(135개의 아미노산 잔기를 암호화하는 408개의 염기쌍(서열번호: 5))을 도시한다. 신호 펩티드(밑줄침)는 첫번째 21개의 아미노산을 암호화하는 염기쌍 1-63를 포함한다.
- 도 2c는 성숙한 인간 IL-15 단백질(114개의 아미노산 잔기를 암호화하는 345개의 염기쌍(서열 번호: 6))을 암호화하는 핵산 서열을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명이 추가로 기재되기 전에, 본 발명이 본원에 기재된 특별한 구현예에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 하고, 또한 본원에 사용된 용어는 특별한 구현예만을 기재하기 위한 것이며, 제한적이지는 않음이 이해되어야 한다.
- [0038] 값의 범위가 제공되는 경우, 맥락이 명확히 달리 지시하지 않는 한 하한의 단위의 십분의 일까지, 그 범위 및 임의의 다른 언급된 범위의 상한과 하한 사이 각 개입 값 및 그 언급된 범위에서 개입 값이 본 발명 내에 포함되는 것이 이해된다. 이들 더 작은 범위의 상한과 하한은 독립적으로 더 작은 범위 내에 포함될 수 있으며 또한 본 발명의 범위 내에 포괄되어, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 범위로 제한될 수 있다. 상기 진술된 값이 제한치 중 하나 또는 둘다를 포함하는 경우, 이들 포함된 제한의 둘다를 배제하는 범위가 또한 본 발명에 포함된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자 중 일인에게 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다.
- [0039] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥상 명확하게 다르게 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다는 것을 유의해야 한다. 청구범위가 임의의 선택적인 성분을 배제하도록 작성

될 수 있다는 것이 추가로 주목된다. 그러한 경우, 이러한 명시는 청구 요소들의 언급시 "단독으로", "오직" 등과 같은 배타적인 용어의 사용, 또는 "부정적" 한정부사를 선행구로 사용하여 나타낸다.

[0040] 본원에서 논의된 공보는 본원의 출원일 전에 이들의 기재에 대해 단독으로 제공된다. 추가로, 제공된 공개일은 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.

[0041] **개요**

[0042] 본원의 개시내용은 본원에 기재된 바와 같이 폐길화된 변이체, 뮤테인 및 다른 IL-15-관련 분자를 포함하는, 폐길화된 IL-15 분자를 고려한다. 당업자는 상기 분자가 덜 빈번한 투여를 가능하게 하는 연장된 반감기를 포함하는, 선회될 수 있는 특정 및 성질을 가질 수 있음을 인지한다. 본원에 기재된 IL-15 분자 및 이의 조성물(예: 약제학적 조성물)은, 예를 들어, 염증성- 및 면역-관련 장애, 및 암 및 암-관련 장애를 포함하는 다양한 질환, 장애 및 병태 및/또는 이의 증상을 치료하고/하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 폴리펩티드 및 핵산 분자와 관련된 “인간”에 대한 임의의 참조는 폴리펩티드 또는 핵산이 수득되는 방식 또는 공급원에 대해 제한하려는 것이 아니라 오히려 서열이 천연 발생 인간 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 서열에 상응할 수 있기 때문에 단지 서열에 관한 것임을 주의해야 한다. 이들을 암호화하는 인간 폴리펩티드 및 핵산 분자에 부가하여, 본 개시내용은 다른 종으로부터의 IL-15 - 관련된 폴리펩티드 및 상응하는 핵산 분자를 고려한다.

[0044] **정의**

[0045] 다르게 명시되지 않는 한, 다음 용어는 이하 기재된 의미를 갖는 것으로 의도된다. 다른 용어는 명세서 전반에 걸쳐 다른 곳에서 정의된다.

[0046] 용어 “환자” 또는 “피험체(subject)”는 인간 또는 비-인간 동물 (예를 들면, 포유동물)을 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0047] 용어 “투여”, “투여하다” 등은, 그들이, 예를 들어, 피험체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에 적용될 때, 예를 들어, 폐길화된 IL-15, 이후 폐길화될 수 있는 IL-15 분자를 암호화하는 핵산, 상기를 포함하는 약제학적 조성물 또는 진단제의 상기 피험체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에의 접촉을 의미한다. 세포의 맥락에서, 투여는 시약의 상기 세포에의 접촉(예: 시험관내 또는 생체외) 뿐만 아니라 시약의 유체에의 접촉을 포함하고, 여기서 유체는 세포에 접촉한다.

[0048] 용어 “치료하다”, “치료하는”, “치료” 등은 피험체를 괴롭히는 질환, 장애 또는 병태의 근본 원인 중의 적어도 하나 또는 피험체를 괴롭히는 질환, 장애 또는 병태의 증상 중의 적어도 하나를 일시적으로 또는 영구적으로 제거하고, 감소시키고, 억제하고, 완화시키거나 개선시키기 위해 질환, 장애 또는 병태, 또는 이의 증상이 진단된 후 개시되고, 관찰된 등의 작용(예: 폐길화된 IL-15 또는 폐길화된 IL-15를 포함하는 약제학적 조성물을 투여)의 과정을 의미한다. 따라서, 치료는 활성 질환을 억제함(예: 질환, 장애 또는 병태 또는 이와 관련되는 임상 증상의 발병 또는 추가 발병을 억제함)을 포함한다. 용어는 PEG-IL-15가, 예를 들어, 유체 상 또는 콜로이드 상 중의 IL-15 수용체와 접촉하는 상황과 같은 다른 맥락에서 사용될 수도 있다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 “이의 치료를 요하는”은 피험체가 치료를 요구하거나 치료로부터 이점이 있는 의사 또는 다른 간병인에 의해 행해지는 판단을 지칭한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 인자를 기반으로 행해진다.

[0050] 용어 “예방하다”, “예방하는”, “예방” 등은 일반적으로 특정 질환, 장애 또는 병태를 가질 성향이 있는 피험체의 맥락에서 질환, 장애, 상태 등(예를 들어, 임상 증상의 부재로 측정됨)을 발병시키거나 이의 발병을 지연시키는 피험체의 위험을 일시적으로 또는 영구적으로 예방하고, 억압하고, 억제하거나 감소시키는 방식으로 (예: 질환, 장애 또는 병태 또는 이의 증상의 발병 전에) 개시된 작용의 과정(예: 폐길화된 IL-15 또는 폐길화된 IL-15를 포함하는 약제학적 조성물의 투여)을 의미한다. 특정 사례에서, 용어들은 또한 질환, 장애 또는 병태의 진행을 늦추는 것 또는 유해한 또는 달리 원하지 않는 상태로 이들의 진행을 억제하는 것을 지칭한다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 “이의 예방을 요하는”은 피험체가 예방을 요구하거나 예방적 관리로부터 이점이 있는 의사 또는 다른 간병인에 의해 행해지는 판단을 지칭한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 요소를 기반으로하여 내려진다.

[0052] “치료적 유효량”이란 어구는 피험체에게 투여될 경우, 질환, 장애 또는 병태의 임의의 증상, 국면 또는 특정

에 대한 임의의 검출 가능한 긍정적인 효과를 가질 수 있는 양으로 단독으로 또는 약제학적 조성물의 일부로서, 단일 용량 또는 일련의 용량의 일부로서 피험체에게 제제의 투여를 의미한다. 치료적 유효량은 관련 생리학적 효과를 측정함으로써 확인될 수 있으면, 이는 투여 레지멘 및 피험체 상태의 진단 분석 등과 관련하여 조정될 수 있다. 예로서, 투여 후 생성된 염증성 사이토카인의 양의 측정은 치료적 유효량이 사용되었는지의 여부를 나타낼 수 있다.

[0053] “변화에 영향을 미치기에 충분한 양”이란 어구는 특정 요법의 투여 전(예: 기준선 수준) 및 투여 후 측정된 지시제의 수준 사이의 검출 가능한 차이가 존재함을 의미한다. 지시제는 임의의 객관적인 변수(예: IL-15의 혈청 농도) 또는 주관적인 변수(예: 피험체의 웰빙(well-being) 느낌)를 포함한다.

[0054] 용어 “소분자”는 약 10kDa 미만, 약 2kDa 또는 약 1kDa 미만의 분자량을 갖는 화학적 화합물을 의미한다. 소분자는 무기 분자, 유기 분자, 무기 성분을 함유하는 유기 분자, 방사성 원자를포함하는 분자, 및 합성 분자를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 치료적으로, 소분자는 세포에 보다 더 침투성일 수 있고, 분해에 덜 민감할 수 있고, 큰 분자보다 면역 반응을 발취하기가 더 어려울 수 있다.

[0055] 용어 “리간드”는, 예를 들어, 수용체의 작용제 또는 길항제로서 작용할 수 있는 펩티드, 폴리펩티드, 막-관련 또는 막-결합 분자, 또는 이의 복합체를 의미한다. “리간드”는 천연 및 합성 리간드, 예를 들어, 사이토카인, 사이토카인 변이체, 유사체, 뮤테인, 및 항체로부터 유도된 결합 조성물 뿐만 아니라 사이토카인의 펩티드 모방체 및 항체의 펩티드 모방체를 포함한다. 상기 용어는 또한 작용제도 길항제도 아니지만, 이의 생물학적 특성, 예를 들어, 신호전달 또는 접착에 크게 영향을 미치지 않고 수용체에 결합할 수 있는 제제를 포함한다. 또한, 상기 용어는, 예를 들어, 화학적 또는 재조합 방법에 의해 막-결합 리간드의 가용성 버전으로 변화된 막-결합 리간드를 포함한다. 리간드 또는 수용체는 완전히 세포내 일 수 있고, 즉 이는 세포질, 핵 또는 일부다른 세포내 구획에 존재할 수 있다. 리간드와 수용체의 복합체는 “리간드-수용체 복합체”로서 명명된다.

[0056] 용어 “억제제” 및 “길항제” 또는 “활성화제” 및 “작용제”는, 예를 들어, 각각, 예를 들어, 리간드, 수용체, 공동인자, 유전자, 세포, 조직 또는 기관의 활성화를 위한 억제 또는 활성화 분자를 의미한다. 억제제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 감소시키고, 차단하고, 방지하고, 활성화 지연시키고, 불활성화시키고, 탈감각화하거나 하향 조절하는 분자이다. 활성화제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 증가시키고, 활성화시키고, 촉진시키고, 활성화 개선시키고, 민감하게 하거나 상향 조절하는 분자이다. 억제제는 또한 구성적 활성을 감소시키고, 차단하거나 불활성화시키는 분자로서 정의될 수 있다. “작용제”는 표적의 활성화의 증가를 일으키거나 촉진시키기 위해 표적과 상호작용하는 분자이다. “길항제”는 작용제의 작용(들)에 대항하는 분자이다. 길항제는 작용제의 활성을 방지하고, 감소시키고, 억제하거나 중화시키고, 길항제는 또한 식별된 작용제가 존재하지 않는 경우에도 표적, 예를 들어, 표적 수용체의 구성적 활성을 방지하고, 억제하거나 감소시킬 수 있다.

[0057] 용어 “조절하다”, “조절” 등은 IL-15 분자 (또는 그들을 암호화하는 핵산 분자)의 기능 또는 활성을 직접 또는 간접적으로 증가시키거나 감소시키는 분자(예: 활성화제 또는 억제제)의 능력 또는 IL-15 분자에 필적하는 효과를 생성하는 분자의 능력을 향상시킴을 의미한다. 용어 “조절제”는 광범위하게 상기한 활성화에 영향을 미칠 수 있는 분자를 의미한다. 예로서, 예를 들어, 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 조절제는 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 활성을 변경하는 분자이고, 이때 활성은 이의 조절 특성에서 활성화되고, 억제되거나 변경될 수 있다. 조절제는 단독으로 작용할 수 있거나, 이는 공동인자, 예를 들어, 단백질, 금속 이온 또는 소분자를 사용할 수 있다. 용어 “조절제”는 IL-15와 동일한 작용 메커니즘을 통해 작동하는 제제(즉, 이와 유사한 방식으로 IL-15와 동일한 신호전달 경로를 조절하는 제제) 및 IL-15에 필적하고 (또는 이보다 더 큰) 생물학적 반응을 유발할 수 있는 제제를 포함한다.

[0058] 조절제의 예는 소분자 화합물 및 다른 생체유기 분자를 포함한다. 소분자 화합물의 다수의 라이브러리(예: 조합 라이브러리)는 시판되고, 조절제를 식별하기 위한 출발점으로서 작용할 수 있다. 당업자는, 이러한 화합물 라이브러리가 목적하는 특성을 갖는 하나 이상의 화합물을 식별하기 위해 스크리닝될 수 있는 하나 이상의 검정(예: 생화학적 또는 세포 기반 검정)을 개발할 수 있고; 이후, 숙련된 의학 화학자는, 예를 들어, 이의 유사체 및 유도체를 합성하고 평가함으로써 그러한 하나 이상의 화합물을 최적화할 수 있다. 합성 및/또는 분자 모델링 연구는 또한 상기한 분자의 식별에 사용될 수 있다.

[0059] 분자의 “활성”은 리간드 또는 수용체에 대한 분자의 결합; 촉매적 활성; 유전자 발현 또는 세포 신호 전달, 분화 또는 성숙을 자극하는 능력; 항원성 활성; 다른 분자의 활성의 조절 등을 기재하거나 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 세포-대-세포 상호작용(예: 접착)을 조절하거나 유지하는데 있어서의 활성 또는 세포(예: 세포

막)의 구조를 유지하는데 있어서의 활성을 의미할 수 있다. “활성”은 또한 비활성, 예를 들어, [촉매 활성]/[mg 단백질], 또는 [면역학적 활성]/[mg 단백질], 생물학적 격실내 농도 등을 의미할 수 있다. 용어 “증식성 활성”은 암, 종양, 형성 장애, 세포 형질전환, 전이 및 혈관 신생 뿐만 아니라, 예를 들어, 정상 세포 분열을 촉진하거나, 즉 이를 위해 필요하거나 또는 특이적으로 이와 관련되는 활성을 포함한다.

[0060] 본원에 사용되는 “필적할 만한(comparable)”, “필적할 만한 활성”, “에 필적할 만한 활성”, “필적할 만한 효과”, “에 필적할 만한 효과” 등은 정량적 및/또는 정성적으로 관찰될 수 있는 상대적인 용어이다. 상기 용어의 의미는 흔히 그들이 사용되는 맥락에 의존한다. 예로서, 모두 수용체를 활성화시키는 두 제제는 정성적인 관점에서 필적할 만한효과를 갖는 것으로 볼 수 있지만, 두 제제는 하나의 제제가 당해 분야에서 허용되는 검정(예: 용량-반응 검정) 또는 당해 분야에서 허용되는 동물 모델에서 측정된 다른 제제의 활성의 20%만을 달성할 수 있는 경우 정량적인 관점에서 필적할 만한 효과가 결여된 것으로 볼 수 있다. 하나의 결과를 다른 결과(예: 참조 표준에 대한 하나의 결과)와 비교할 때, “필적할 만한”은 흔히 (항상은 아니지만) 하나의 결과가 참조 표준으로부터 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만으로 벗어나는 것을 의미한다. 특정 구현예에서, 하나의 결과는, 그것이 참조 표준으로부터 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 벗어나는 경우, 참조 표준에 필적할 만하다. 예로서, 제한적이지는 않지만, 활성 또는 효과는 효능, 안정성, 용해도 또는 면역원성을 의미할 수 있다. 이미 기술된 바와 같이, 당업자는 상이한 방법론의 사용이 hIL-15 참조 표준보다 - 단백질 농도를 계산하는데 있어서의 차이에 기인하는 겉보기 활성 또는 실제 활성에서 - 다소 활성인 IL-15를 유도할 수 있음을 인식한다. 당업자는 IL-15 분자 대 hIL-15의 상대적인 생체활성을 결정하는데 있어서 이러한 차이를 고려할 수 있을 것이다.

[0061] 예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 유기체의 “반응”이라는 용어는 생화학적 또는 생리학적 거동, 예를 들어, 생물학적 구획 내의 농도, 밀도, 접착 또는 이동, 유전자 발현율, 또는 분화 상태의 변화를 포함하고, 이때 상기 변화는 활성화, 자극 또는 처리, 또는 유전적 프로그래밍과 같은 내부 메커니즘과 상관관계가 있다. 특정 맥락에서, 용어 “활성화”, “자극” 등은 외부 또는 환경적 메커니즘 뿐만 아니라 내부 메커니즘에 의해 조절되는 세포 활성화를 의미하는 반면, 용어 “억제”, “하향 조절” 등은 반대의 효과를 의미한다.

[0062] 본원에 상호교환적으로 사용된 용어 “폴리펩티드”, “펩티드” 및 “단백질”은 유전적으로 암호화된 및 비유전적으로 암호화된 아미노산, 화학적으로 또는 비화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산을 포함할 수 있는 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태 및 변형된 폴리펩티드 골격을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 본 용어들은, 비제한적으로, 이중성 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질, N-말단 메티오닌 잔기를 갖거나 갖지 않는, 이중성 및 상동성 선도 서열을 갖는 융합 단백질을 포함하는 융합 단백질; 면역학적으로 표지된 단백질 등을 포함한다.

[0063] 본원에 사용된 용어 “변이체” 및 “동족체”는 각각 참조 아미노산 또는 핵산 서열과 유사한 아미노산 또는 DNA 서열을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 천연 발생 변이체 및 비천연 발생 변이체를 포함한다. 천연 발생 변이체는 동족체(하나의 종에서 다른 종으로 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 상이한 폴리펩티드 및 핵산), 및 대립유전자 변이체(한 종 내의 하나의 개체로부터 다른 개체로 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 상이한 폴리펩티드 및 핵산)을 포함한다. 따라서, 변이체 및 동족체는 천연 발생 DNA 서열 및 이에 의해 암호화되는 단백질 및 이들의 동형체 뿐만 아니라 단백질 또는 유전자의 스플라이스 변이체를 포함한다. 상기 용어는 또한 천연 발생 DNA 서열로부터 하나 이상의 염기가 변하지만, 유전 코드의 축퇴에 기인하여 천연 발생 단백질에 상응하는 아미노산 서열로 번역되는 핵산 서열을 포함한다. 비-천연적으로 존재하는 변이체 및 동족체는 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에서 변화를 포함하는 폴리펩티드 및 핵산을 포함하고, 여기서, 서열 내 상기 변화는 인위적으로 도입되고 (예를 들어, 뮤테인); 예를 들어, 상기 변화는 연구소에서 인간 중재 (“인간의 손”)에 의해 생성된다. 따라서, 비-천연적으로 존재하는 변이체 및 동족체는 또한 하나 이상의 보존성 치환 및/또는 태그 및/또는 접합체에 의해 천연적으로 존재하는 서열과 상이한 것들을 지칭할 수 있다.

[0064] 본원에 사용된 용어 “뮤테인(mutein)”은 광범위하게 돌연변이된 재조합 단백질을 의미한다. 이러한 단백질은 일반적으로 단일 또는 다중 아미노산 치환을 수반하고, 부위-지시된 또는 랜덤 돌연변이 생성을 경험한 클로닝 유전자 또는 완전 합성 유전자로부터 유래된다. 다르게 지시되지 않는 한, “IL-15의 돌연변이체”와 같은 용어의 사용은 IL-15 뮤테인을 의미한다.

[0065] 용어들 “DNA”, “핵산”, “핵산 분자”, “폴리뉴클레오티드” 등은 데옥시리보뉴클레오티드이거나 또는 리보뉴클레오티드, 또는 그것의 유사체인, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 언급하기 위해 본 명세서에서 상

호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예는 선형 및 원형 핵산, 메신저 RNA (mRNA), 상보적 DNA (cDNA), 재조합 폴리뉴클레오티드, 벡터, 프로브, 프라이머 등을 포함한다.

[0066] 본 개시내용 전체에 걸쳐, 단일 문자 또는 세 문자 코드에 따른 아미노산이 지칭됨을 알 수 있을 것이다. 독자의 편리를 위해, 단일 및 세 문자 아미노산 코드가 아래에 제공된다:

G	글라이신	Gly	P	프롤린	Pro
A	알라닌	Ala	V	발린	Val
L	류신	Leu	I	이소류신	Ile
M	메티오닌	Met	C	시스테인	Cys
F	페닐알라닌	Phe	Y	티로신	Tyr
W	트립토판	Trp	H	히스티딘	His
K	라이신	Lys	R	아르기닌	Arg
Q	글루타민	Gln	N	아스파라긴	Asn
E	글루탐산	Glu	D	아스파르트산	Asp
S	세린	Ser	T	트레오닌	Thr

[0067]

[0068] 천연 인간 IL-15 또는 IL-15 뮤테인을 참조하여 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “변형된(modified)”, “변형” 등은 인간 IL-15 또는 IL-15 뮤테인의 목적한 특성을 향상시키는 하나 이상의 변화를 의미한다. 이러한 목적하는 특성은, 예를 들어, 순환 반감기를 연장시키고, 안정성을 증가시키고, 청소율을 감소시키고, 면역원성 또는 알레르기원성을 변경하고, 검출 검정에 사용하기 위한 (예: 독특한 에피토프의 도입에 의한) 특정 항체의 상응을 가능하게 하는 것을 포함한다. 하기에 상세히 논의된 바와 같이, 수행될 수 있는 인간 IL-15 또는 IL-15 뮤테인에 대한 변형은 비제한적으로 하기를 포함한다: 폐길화 (폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 또는 이의 유도체 중 하나 이상의 분자의 공유 결합); 글리코실화 (예를 들면, N-글리코실화), 폴리시알릴화 및 헤실화; 말토오스 결합 단백질 융합; 알부민 융합; 예를 들면, 접합된 지방산 사슬을 통한 알부민 결합 (아실화); Fc-융합; 및 PEG 모방체와의 융합. 일부 구현예에서, 링커가 이러한 변형에 사용되고, 이후 기재된다. 본원의 개시내용의 특정 구현예에서, 변형된 IL-15 분자는 폐길화된 IL-15이다.

[0069] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 폴리펩티드의 구조의 맥락에서, "N-말단(N-terminus)" (또는 "아미노 말단") 및 "C-말단(C-terminus)" (또는 "카복실 말단")은 각각 폴리펩티드의 극단의 아미노 및 카복실 말단을 언급하는 반면, 용어들 "N 말단의(N-terminal)" 및 "C-말단의(C-terminal)"는 각각 N-말단 및 C-말단을 향한 폴리펩티드의 아미노산 서열에서의 상대적 위치를 지칭하고, 이들은 N-말단 및 C-말단에서의 잔기를 각각 포함할 수 있다. “바로(Immediately) N-말단” 또는 “바로(Immediately) C-말단”은, 제1 및 제2 아미노산 잔기가 공유 결합되어 인접하는 아미노산 서열을 제공하도록 하는, 제2 아미노산 잔기에 대한 제1 아미노산 잔기의 위치를 의미한다.

[0070] 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열(예: IL-15 폴리펩티드"로부터 유래된" 아미노산 서열)의 맥락에서, “로부터 유래된”은 폴리펩티드 또는 핵산이 참조 폴리펩티드 또는 핵산(예: 천연 발생 IL-15 폴리펩티드 또는 IL-15-암호화 핵산)의 것을 기본으로 하는 서열을 갖는다는 것을 의미하고, 단백질 또는 핵산이 제조되는 공급원 또는 방법에 대해 제한적인 것으로 의미하지 않는다. 예로서, 용어 “로부터 유래된”은 참조 아미노산 또는 DNA 서열의 동족체 또는 변이체를 포함한다.

[0071] 폴리펩티드의 맥락에서, 용어 "단리된(isolated)"은, 천연 발생일 경우, 이것이 자연적으로 발생할 수 있는 것과 상이한 환경에 있는 관심 대상의 폴리펩티드를 지칭한다. “단리된”은 목적하는 폴리펩티드가 실질적으로 풍부한 샘플 내에 존재하고/하거나 목적하는 폴리펩티드가 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 폴리펩티드를 포함하는 것으로 지칭된다. 폴리펩티드가 천연 발생하지 않는 경우, “단리된”은 폴리펩티드가 그것이 합성 또는 재조합 수단에 의해 제조된 환경으로부터 분리되었음을 나타낸다.

[0072] “풍부한”이란 샘플이 비천연 조작되어(예: 과학자에 의해) 관심 있는 폴리펩티드가 a) 생물학적 샘플과 같은 출발 샘플(예: 폴리펩티드가 천연 발생하거나 그것이 투여 후에 존재하는 샘플) 중의 폴리펩티드의 농도보다 큰 농도(예; 적어도 3배 초과, 적어도 4배 초과, 적어도 8배 초과, 적어도 64배 초과 또는 그 이상) 또는 b) 폴리

펩티드가 제조된 환경(예: 세균성 세포에서와 같이)에서보다 큰 농도로 존재함을 의미한다.

[0073] "실질적으로 순수한(substantially pure)"이란 성분 (예 : 폴리펩티드)이 조성물의 총 함량의 약 50% 이상, 통상적으로 총 폴리펩티드 함량의 약 60% 이상으로 구성됨을 나타낸다. 더욱 통상적으로, "실질적으로 순수한"은 전체 조성물의 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 그 이상이 관심 성분인 조성물을 의미한다. 일부의 경우에, 폴리펩티드는 조성물의 총 함량의 약 90% 초과, 또는 약 95% 초과를 구성할 것이다.

[0074] 리간드/수용체, 항체/항원 또는 다른 결합 쌍을 지칭할 때, 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "선택적으로 결합한다"는 단백질의 이중 집단 및 다른 생물체제 중에 단백질의 존재의 결정인자인 결합 반응을 나타낸다. 따라서, 지정된 조건하에, 특정 리간드는 특별한 수용체에 결합하고, 샘플 중에 존재하는 다른 단백질에 상당량으로 결합하지 않는다. 고려된 방법의 항체, 또는 항체의 항원 결합 부위로부터 유래된 결합 조성물은 임의의 다른 항체 또는 이로부터 유래된 결합 조성물과의 친화도보다 적어도 2배 초과, 적어도 10배 초과, 적어도 20배 초과 또는 적어도 100배 초과하는 친화도로 이의 항원 또는 이의 변이체 또는 뮤테인에 결합한다. 특정 구현예에서, 항체는 하기에 의해 결정된 바와 같이, 약 10^9 리터/mol을 초과하는 친화도를 가질 것이다: 예를 들어, 스캐처드(Scatchard) 분석 (Munsen, et al.1980 Analyt.Biochem.107:220-239).

[0075] IL-15

[0076] MGC9721로도 지칭되는 IL-15는 염색체 4q31 상의 34 kb 영역에 의해 암호화된 12.8kDa 단량체 당단백질인 것으로 예측된다. IL-15는 4개의 α -나선 번들 계통에 속하고, 이의 다른 구성원은 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함한다. 인간 IL-15의 게놈 구조는 9개의 엑손(1-8 및 4A) 및 8개의 인트론을 함유한다. 인간 및 마우스는 유사한 인트론/엑손 구조를 공유한다. 성숙 단백질을 암호화하는 IL-15 유전자의 부분의 전반적인 인트론/엑손 구조는 IL-2 유전자 및 다른 4 α -나선 번들 사이토카인의 구조와 유사하다.

[0077] 당업자는 IL-15 핵산 및 아미노산 서열이 유전자 데이터베이스(예: 유전자은행(GenBank))에서 공개적으로 이용 가능하다는 것을 인식할 것이다. 도 1c (서열번호: 3)에 도시된 바와 같이, 성숙한 인간 IL-15 단백질은 114개 아미노산 잔기(12.8kDa)를 포함한다. 대장균(*E. coli*)에서 생성된 재조합 인간 IL-15는 단일 비글리코실화 폴리펩티드쇄(N-말단 메티오닌을 포함하는, 분자 질량 12.9 kD를 갖는 115개 아미노산 잔기)이다. 두 개의 전사물이 보고되었고, 둘 다 동일한 성숙 단백질을 생산한다고 한다. 도 1a (서열 번호: 1)을 참조하면, 상기 IL-15 긴 신호 펩티드 (LSP) 단백질 (수탁 번호 BC018149.2)은, 48개 잔기 신호 펩티드 (밑줄로 표시됨)를 포함하는, 162개 아미노산 잔기를 포함한다. 도 1b (서열 번호: 2)를 참조하면, 상기 IL-15 짧은 신호 펩티드 (SSP) 단백질 (수탁 번호 BC100962.1)은, 21개 잔기 신호 펩티드 (밑줄로 표시됨)를 포함하는, 135개 아미노산 잔기를 포함한다. LSP는 분비 단백질로서 기재되어 왔고, SSP는 세포 내에 잔류하는 것으로 기재되어 왔다.

[0078] 도 2a는 긴 신호 펩티드 (LSP) cDNA ORF (162개 아미노산 잔기 (수탁 번호 BC018149.2)를 암호화하는, 489개 염기쌍 (서열 번호: 4))을 도시하며; 신호 펩티드 (밑줄로 표시됨)는 첫번째 48개 아미노산을 암호화하는 염기쌍 1-144를 포함한다. 도 2b는 짧은 신호 펩티드 (SSP) cDNA ORF [135개 아미노산 잔기 (수탁 번호 BC100962.1)를 암호화하는 408개 염기쌍 (서열 번호: 5)]을 도시하며; 신호 펩티드 (밑줄로 표시됨)는 첫번째 21개 아미노산을 암호화하는 염기쌍 1-63를 포함한다. 도 2c는 성숙한 인간 IL-15 단백질(114개 아미노산 잔기)를 암호화하는 345개 염기쌍(서열 번호: 6)을 암호화하는 핵산 서열을 도시한다.

[0079] 비인간 예시된 포유동물 IL-15 핵산 또는 아미노산 서열은, 예를 들어, 영장류, 개과, 고양이과, 돼지, 말, 소, 양, 설치류, 뿔, 랫트, 햄스터 및 기니 피그로부터 유래될 수 있다. 예시적인 비인간 포유동물 IL-15 핵산 서열에 대한 수탁 번호는 U19843 (마카크); DQ021912 (마카크); AB000555 (마카크); NM_214390 (돼지); DQ152967 (양); NM_174090 (소); NM_008357 (뿔); NM_013129 (랫트); DQ083522 (물소); XM_844053 (개); DQ157452 (토끼); 및 NM_001009207 (고양이)을 포함한다. 예시적인 비인간 포유동물 IL-15 아미노산 서열에 대한 수탁 번호는 AAB60398 (마카크); AAY45895 (마카크); NP_999555 (돼지); NP_776515 (소); AAY83832 (물소); ABB02300 (양); XP_849146 (개); NP_001009207 (고양이); NP_037261 (랫트); 및 NP_032383 (뿔)을 포함한다. 인간 IL-15 ("hIL-15")와 비교한 성숙한 시노물구스 원숭이 IL-15 ("cIL-15")의 동일성은 96%인 반면, 성숙한 마우스 IL-15 ("mIL-15")와 성숙한 hIL-15의 동일성은 75%이다.

[0080] 인간 IL-15는 위치 C42-C88 및 C35-C85에 두 개의 이황화 결합을 함유하고, 전자는 IL-2 내의 C-C와 상동성이다. N79와 N112에 두 개의 N-연결된 글리코실화 부위가 존재한다(사용된 분석 방법에 따라, N71은 세번째 글리코실화 부위로 간주될 수 있다). 성숙한 IL-15 단백질은 아미노산 잔기 1 내지 15, 18 내지 57, 65 내

지 78, 및 97 내지 114에서 강한 나선형 모멘트를 갖는 것으로 예측되어, 이의 4개의 α -나선 변들 구조를 지지한다 [Fehniger, et al., Blood 97(1) (Jan 1, 2001)].

[0081] 이전에 나타난 바와 같이, 연관성(nexus)이 IL-15와 IL-2 사이에 존재한다. IL-15 및 IL-15R α 발현의 복잡한 조절 및 차별 패턴에 기초하여, 이 수용체/리간드 쌍의 중요한 생체내 기능은 IL-2 및 IL-2R α 의 기능과 상이하다. IL-15는 천연 킬러(NK) 세포, NK-T 세포 및 장 상피내 림프구 발생 및 기능 동안의 이의 중요성을 포함하여 몇몇 핵심 비중복 역할을 나타낸다. IL-15는 보고에 따르면 자가면역 방법(예를 들어, 류마티스 관절염) 및 악성 종양(예를 들어, T-세포 백혈병)에서 역할을 수행하기 때문에, 정상의 IL-15 기능에서의 파괴는 피험체에서 원치 않는 효과에 관련되었다.

[0082] 두 신호가 수용체 서브유닛 IL-2R β 및 일반적인 γ -쇄($\gamma(c)$)를 통해 발생하지만, IL-15 및 IL-2는 동일한 생물학적 기능 모두를 공유하지 않는다. IL-15-IL-15R α -IL-2R β - $\gamma(c)$ 4차 복합체의 구조에서, IL-15는 IL-2-IL-2R α -IL-2R β - $\gamma(c)$ 복합체의 구조와 닮은 헤테로다имер에서 IL-2R β 및 $\gamma(c)$ 에 결합한다. IL-15R α 는 IL-2R β 에 대한 IL-15의 친화도를 실질적으로 증가시키는 것으로 나타났고, 이는 또한 IL-15 트랜스-신호전달에 필요하다. IL-15 및 IL-2는 유사한 신호를 유도하고, IL-2R α 대 IL-15R α 의 특이성은 세포 반응성을 결정하는 것으로 나타났다. [참고: Ring et al., Nat. Immunol. 13(12):1187-95 (Dec. 13, 2012)].

[0083] IL-15는 주로 막-결합 형태로서 존재하지만 이것은 또한 가용성 분자[Jakobisiak, et al., Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109 (April 2011)]로서 존재하고, 2개의 독특한 신호전달 기작과 관련된다. 주요 메커니즘은 막-결합된 복합체 IL-15/IL-15R α 에 의해 매개되는 트랜스-제시(trans-presentation)이다. 이 신호전달 메커니즘에서, IL-15는 IL-15R α 수용체에 결합하고, 이어서 그들 세포 표면 상에 IL-15R β γc 복합체를 갖는 주변 세포에 제시한다. 제2 메커니즘은 시스-제시(cis-presentation)이고, 여기서 IL-15는 IL-15R α 에 의해 동일 세포 상의 15R β γc 신호전달 복합체에 제시된다.

[0084] 1차 신호전달 메커니즘을 참조하면, IL-15R α 수용체에 IL-15의 결합 및 IL-15R β γc 복합체를 포함하는 주위 세포에의 후속적인 제시의 경우, IL-15 β 서브유닛은 야누스 키나제 1(Jak1)을 활성화시키고, γc 서브유닛은 야누스 키나제 2 (Jak2)를 활성화시키고, 이는 전사 3 (STAT3) 및 STAT5의 신호 변환기 및 활성화제의 인산화 및 활성화를 유도한다. IL-15 및 IL-2는 수용체 서브유닛을 공유하기 때문에, 그들은 세포 증식 및 성숙을 유도하는, B-세포 림프종(Bcl-2)의 유도; 미토젠 활성화 단백질 키나제(MAP) 경로, 및 림프구 활성화 단백질 티로신 키나제(Lck) 및 비장 티로신 키나제(Syk)의 인산화를 포함하는 유사한 다운스트림 효과를 갖는다 [Schluns, et al., Int J Biochem Cell Biol 37(8):1567-71 (Aug 2005)].

[0085] 대조적으로, 비만 세포에서 IL-15R 신호전달 경로는 Jak1/3 및 STAT3/5 대신 Jak2 및 STAT5를 포함한다. STAT의 인산화는 전사 인자를 형성하고, 적합한 유전자의 전사를 활성화시킨다. IL-15R의 β 쇄는 Lck, Fyn 및 Lyn 키나제를 포함하는 Src 계통의 단백질 티로신 키나제를 모집하고 또한 활성화시킨다. β 쇄는 또한 포스포티딜 이노시톨 3-키나제(PI3K) 및 AKT 신호전달 경로를 활성화시키고, c-Fos, c-Jun, c-Myc 및 NF- κ B를 포함하는 다양한 전사 인자의 발현을 유도한다 [Jakobisiak, et al., Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109 (April 2011)].

[0086] 폐결화된 IL-15

[0087] 재조합 인간 IL-15의 유용성은 흔히, 예를 들면, 신장 청소율 또는 단백질 가수분해 분해에 기인할 수 있는 이의 비교적 짧은 반감기에 의해 제한된다. 결과적으로, 구조를 불리하게 파괴시키지 않고 따라서 활성에 대한 바람직하지 않은 영향을 미치지 않고 IL-15의 약동학적 프로파일을 개선시키기 위해 다양한 접근법이 탐구되었다. IL-15의 폐결화는, 예를 들어, CN102145178에 보고된 바와 같이, 특정 약동학적 변수(예: 혈청 반감기)의 개선을 유도한다.

[0088] IL-15의 폐결화는 N-말단, C-말단 또는 내부 중 하나 이상에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 N-말단에서 폐결화를 고려한다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 하나 이상의 아미노산 잔기에 부착될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 용어 “폐결화 IL-15” 및 “PEG-IL-15”는 부착이 안정하도록 일반적으로 링커를 통해 IL-15 단백질의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유 결합된 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 갖는 IL-15 분자를 의미한다. 용어 “모노폐결화 IL-15” 및 “모노-PEG-IL-15”는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 일반적으로 링커를 통해 IL-15의 단일 아미노산 잔기에 공유 결합된다는 것을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 용어 “디폐결화 IL-15” 및 “디-PEG-IL-15”는 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 하나의 아미노산 잔기에 공유 결합되고, 또 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 상이한 아미

노산 잔기에 공유 결합되는 IL-15 단백질을 기재하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자는 성숙한 IL-15의 N-말단 아미노산 잔기에 공유 결합될 수 있고, 또 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자는 C-말단 잔기에 공유 결합될 수 있다. 폴리에틸렌 분자가 둘 이상의 아미노산 잔기에 공유 결합된 단백질을 생성하는 것도 또한 가능하고, 당업자는 이러한 분자를 생산하기 위한 방법에 친숙하다.

[0089] 특정 구현예에서, 본 발명에 사용된 PEG-IL-15는 1 내지 9개의 PEG 분자가 링커를 통해 N-말단에서 아미노산 잔기의 알파 아미노 기 또는 라신 잔기의 측쇄 상의 엡실론 아미노 기에 공유되는 모노-PEG-IL-15이다. 링커는 이후 추가로 기재된다. 일반적으로 폐길화가 일어나지 않는 성숙한 IL-15 내의 부위에서 폐길화를 수행하기 위해, IL-15 상의 하나 이상의 상이한 부위는 하나 이상의 돌연변이를 도입한 다음, 그들 각각을 변형(즉, 폐길화)시킴으로써 변형될 수 있다. 예시적인 폐길화 조건은 본원의 다른 곳에 기재된다.

[0090] 특정 구현예에서, PEG 잔기의 평균 분자량은 약 5kDa 내지 약 80kDa이다. 예를 들어, PEG 모이어티는 약 5 kDa 초과, 약 10 kDa 초과, 약 15 kDa 초과, 약 20 kDa 초과, 약 25 kDa 초과, 약 30 kDa 초과, 약 35 kDa 초과, 약 40 kDa 초과, 약 45 kDa 초과, 약 50 kDa 초과, 약 55 kDa 초과, 약 60 kDa 초과, 약 65 kDa 초과, 약 70 kDa 초과, 약 75 kDa 초과, 또는 약 80 kDa 초과인 분자 질량을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 분자 질량은 약 5 kDa 내지 약 10 kDa, 약 5 kDa 내지 약 15 kDa, 약 5 kDa 내지 약 20 kDa, 약 10 kDa 내지 약 15 kDa, 약 10 kDa 내지 약 20 kDa, 약 10 kDa 내지 약 25 kDa 또는 약 10 kDa 내지 약 30 kDa이다. 기타 구현예에서, 분자 질량은 약 15 kDa 내지 약 20 kDa, 약 15 kDa 내지 약 25 kDa, 약 15 kDa 내지 약 30 kDa, 약 15 kDa 내지 약 35 kDa, 약 15 kDa 내지 약 40 kDa, 또는 약 15 kDa 내지 약 45 kDa이다.

[0091] IL-15의 크기 때문에, 20kDa 초과(예: 20 내지 40kDa 범위)의 PEG가 특정 구현예에서 고려된다. 일부 구현예에서, 분자 질량은 약 20 kDa 내지 약 25 kDa, 약 20 kDa 내지 약 30 kDa, 약 20 kDa 내지 약 35 kDa, 약 20 kDa 내지 약 40 kDa, 약 20 kDa 내지 약 45 kDa, 또는 약 20 kDa 내지 약 50 kDa이다. 일부 구현예에서, 분자 질량은 약 25 kDa 내지 약 30 kDa, 약 25 kDa 내지 약 35 kDa, 약 25 kDa 내지 약 40 kDa, 약 25 kDa 내지 약 45 kDa, 또는 약 25 kDa 내지 약 50 kDa이다. 일부 구현예에서, 분자 질량은 약 30 kDa 내지 약 35 kDa, 약 30 kDa 내지 약 40 kDa, 약 30 kDa 내지 약 45 kDa, 또는 약 30 kDa 내지 약 50 kDa이다. 추가 구현예에서, 분자 질량은 약 35 kDa 내지 약 40 kDa, 약 35 kDa 내지 약 45 kDa, 약 35 kDa 내지 약 50 kDa, 약 40 kDa 내지 약 45 kDa, 약 40 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 45 kDa 내지 약 50 kDa이다. 또 다른 추가 구현예에서, 분자 질량은 약 50 kDa 내지 약 60 kDa, 약 50 kDa 내지 약 70 kDa, 약 50 kDa 내지 약 80 kDa, 약 60 kDa 내지 약 70 kDa, 약 60 kDa 내지 약 80 kDa, 또는 약 70 kDa 내지 약 80 kDa이다. 본원의 개시내용은 5 kDa 증분에서 80kDa 초과인 분자 질량(예를 들어, 85 kDa, 90 kDa, 95 kDa, 등)을 갖는 PEG를 고려한다.

[0092] 본 발명은 IL-15에 대한 PEG 부착의 특정 방법 또는 부위의 사용을 필요로 하지 않지만, 폐길화가 IL-15 분자의 활성을 개선시키거나 변경하지 않거나 단지 명목상 감소시키는 것이 종종 유리하다. 특정 구현예에서, 반감기의 임의의 증가의 영향은 생물학적 활성의 임의의 감소의 영향보다 크다. PEG-IL-15의 생물학적 활성은 흔하게 세균성 항원 (리포폴리사카라이드 (LPS))이 유발되고 PEG-IL-15로 치료된 피험체의 혈청 중 염증 사이토킨 (예를 들어, IFN- γ)의 수준을 평가함에 의해 측정된다. 생체활성을 측정하기 위한 다른 수단은 본원의 다른 곳에 기재된다.

[0093] 본원의 개시내용에 의해 고려되는 특정 폐길화된 IL-15 분자의 포괄적 논의는 본원에 제시된다.

[0094] IL-15 변이체

[0095] IL-15 변이체는 혈청 반감기를 증가시키고, IL-15에 대한 면역 반응을 감소시키고, 정제 또는 제조를 촉진시키고, 분해를 감소시키고, 치료적 효능을 개선시키고, 치료적 사용 동안 부작용의 심각성 또는 발생을 감소시킴을 포함하는 다양한 목적을 염두에 두고 제조할 수 있다. 아미노산 서열 변이체는 일반적으로 자연에서 발견되지 않는 소정의 변이체이지만, 일부는 번역 후 변이체, 예를 들어, 글리코실화 변이체일 수 있다. IL-15의 임의의 변이체는 적절한 수준의 IL-15 활성을 유지한다면 사용될 수 있다. IL-15 활성은 본원의 다른 곳에서 기재된다 (예: T 세포 및 천연 킬러(NK) 세포 활성화 및 증식의 조절).

[0096] “보존적 아미노산 치환”이란 어구는 단백질 중의 아미노산(들)을 유사한 산도, 염기도, 전하, 극성 또는 크기의 측쇄를 갖는 아미노산으로 치환함으로써 단백질의 활성을 보존하는 치환을 의미한다. 보존적 아미노산 치환은 일반적으로 다음 그룹 내의 아미노산 잔기의 치환을 수반한다: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; 및 6) D, E. 치환, 삽입 또는 결실에 대한 가이드는 상이한 변이체 단백질 또는 상이한 종 기원의 단백질의 아미노산 서열의 정렬을 기준으로 할 수 있다. 따라서, 임의의 천연 발생 IL-15 폴

리펩티드 이외에, 본 발명은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 통상적으로 20, 10 또는 5개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것을 고려하고, 이때 치환은 일반적으로 보존적 아미노산 치환이다. 하나 이상의 비천연 아미노산이 부위 특이적 접합을 촉진시키는 수단으로서 IL-15에 도입될 수 있다는 것을 유의해야 한다.

[0097] 본 발명은 또한 성숙한 IL-15로부터 유래된 인접한 아미노산 잔기를 함유하는 성숙한 IL-15의 활성 단편(예: 부서열)을 고려한다. 펩티드 또는 폴리펩티드 서열의 인접한 아미노산 잔기의 길이는 서열이 유래되는 특정 천연 발생 아미노산 서열에 의존한다. 일반적으로, 펩티드 및 폴리펩티드는 약 20개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 약 41개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 약 51개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 약 61개 아미노산 내지 약 70개 아미노산, 약 71개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 약 81개 아미노산 내지 약 90개 아미노산, 약 91개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 약 101개 아미노산 내지 약 105개 아미노산, 약 106개 아미노산 내지 약 110개 아미노산, 또는 약 111개, 112개 또는 113개 아미노산 내지 최대 전장의 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다.

[0098] 추가적으로, IL-15 폴리펩티드는 인접 아미노산의 정의된 길이에 대해 참조 서열과 비교하여 정의된 서열 동일성을 가질 수 있다 (예를 들면, "비교 윈도우"). 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은, 예를 들어, 하기에 의해 수행될 수 있다: 하기 문헌의 국소 상동성 알고리즘: Smith & Waterman, Adv.Appl.Math.2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), 하기 문헌의 유사성 방법의 검색: Pearson & Lipman, Proc.Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), 이러한 알고리즘(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.)의 컴퓨터화된 구현 또는 수동 정렬 및 육안 검사(참조: 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

[0099] 예로서, 적합한 IL-15 폴리펩티드는 약 20개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 약 41개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 약 51개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 약 61개 아미노산 내지 약 70개 아미노산, 약 71개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 약 81개 아미노산 내지 약 90개 아미노산, 약 91개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 약 101개 아미노산 내지 약 105개 아미노산, 약 106개 아미노산 내지 약 110개 아미노산, 또는 약 111개, 112개, 또는 113개 아미노산 내지 최대 전장의 펩티드 또는 폴리펩티드의 인접한 스트레치에 대해, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0100] 이하 추가로 논의된 바와 같이, IL-15 폴리펩티드는 천연 공급원(예: 이의 천연 발생 환경 이외의 환경)으로부터 단리될 수 있고, (예를 들어, 세균, 효모, 피키아, 곤충 세포 등과 같은 유전적으로 변형된 숙주 세포에서) 재조합 제조될 수도 있고, 여기서 유전적으로 변형된 숙주 세포는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 변형된다. IL-15 폴리펩티드는 또한 (예를 들어, 무세포 화학적 합성에 의해) 합성적으로 생성될 수 있다.

[0101] IL-15 단편을 포함하는 다른 IL-15 분자; 이중 단백질과 복합체화된 IL-15 폴리펩티드를 포함하는 분자; 및 핵산 수준에서 하나 이상의 치료제(예: 항염증성 생물학적 제제)에 융합된 IL-15를 포함하는 IL-15 융합 단백질도 또한 본원에 포함된다. 이러한 분자는 본원에 기재된 접근법 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 접근법을 사용하여 변형될 수 있다.

[0102] 본 발명의 합리적인 약물 설계 접근법은 다수의 공급원으로부터 결정학적 및 유사한 데이터를 이용할 수 있다. 예로서, IL-15R 알파의 스시(sushi) 도메인과의 복합체 중의 IL-15의 결정 구조가 기재되어 있다. Olsen, et al., J. Biol. Chem. 282(51): 37191-204 (Dec. 21 2007). 또한, 문헌(Pettit, et al., J. Biol. Chem. 272:2312-18 (1997))은 부위 특이적 돌연변이 생성, 폴리에틸렌 글리콜 접합 및 상동성 모델링을 사용하는 IL-15의 구조-기능 연구를 기재한다. 상기 정보 및 데이터는 바람직할 수 있는 특징을 갖는 폐결화된 IL-15 분자의 식별 및 선택에서 영향 받을 수 있다.

[0103] **IL-15의 변형된 형태의 면역원성 고려**

[0104] 항원이 피험체에서 체액성 (B-세포) 및/또는 세포 매개된 (T-세포) 면역 반응을 유발하는 능력인 면역원성이 ‘바람직할 수 있거나’ ‘바람직하지 않을 수 있는’ 것으로서 분류될 수 있다. 바람직한 면역원성은 통상적으로 백신 주사에 의해 유발되는, 병원체 (예를 들어, 바이러스 또는 세균)에 대해 증가된 피험체의 면역 반응을 지칭한다. 이러한 맥락에서, 면역 반응은 유리하다. 역으로, 바람직하지 않은 면역원성은 통상적으로 치료학적 단백질 (예를 들어, IL-15)과 같은 항원에 대해 증가된 피험체의 면역 반응을 언급하고; 상기 면역 반응은 예를

들어, 항-약물-항체 (ADA)를 유도할 수 있고 이는 치료학적 단백질의 효과 또는 약동학적 변수에 안좋은 영향을 주고/주거나 다른 부작용에 기여한다. 이러한 맥락에서, 면역 반응은 불리하다.

[0105] 단백질 치료제에 대한 피험체의 면역 반응에 영향을 미치는 다수의 피험체 특이적 및 제품 특이적 인자가 존재한다. 피험체 특이적 인자는 피험체의 면역학적 상태 및 능력; 사전 감작/알레르기의 병력; 투여 경로; 용량 및 투여 빈도; 피험체의 유전 상태; 및 내인성 단백질에 대한 면역 내성의 피험체 상태를 포함한다. 면역원성에 영향을 미치는 제품-특이적 인자는 제품 기원(외래 또는 내인성); 제품의 1차 분자 구조/번역 후 변형, 3차 및 4차 구조 등; 제품 집합체의 존재; 접합/변형(예: 글리코실화 및 페길화); 보조제 활성을 갖는 불순물; 제품의 면역 조절성; 및 제형화를 포함한다.

[0106] 자가 조직 또는 인간형 폴리펩티드 치료제는 일부 용도에서 놀랍게도 면역원성이고, 다른 분야에서는 놀랍게도 비면역원성인 것으로 입증되었다. 특정 페길화된 IL-15 분자는 특정 범위의 체액성 및 세포-매개된 면역 반응을 유발할 가능성이 있다. 특정 내용에서, 하나 이상의 아미노산 잔기와 PEG 모이어티의 접합은 다른 고도의 면역원성 단백질의 면역원성을 급격히 감소시킬 수 있다.

[0107] IL-15의 생산 방법

[0108] 본 발명의 폴리펩티드는 비제조합(예; 화학적 합성) 및 재조합 방법을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0109] 화학적 합성

[0110] 폴리펩티드가 화학적으로 합성되는 경우, 합성은 액체 상 또는 고체 상을 통해 진행될 수 있다. 고체 상 펩티드 합성 (SPPS)은 비천연 아미노산의 도입 및/또는 펩티드/단백질 골격 변형을 가능하게 한다. 다양한 형태의 SPPS, 예를 들어, 9-플루오렌메톡시카보닐(Fmoc) 및 3급-부틸옥시카보닐(Boc)이 본 발명의 폴리펩티드를 합성하기 위해 이용 가능하다. 본 화학적 합성의 자세한 사항은 당해 기술에 공지되어 있다 (예를 들면, Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10; 및 Camarero J.A. et al., (2005) Protein Pept Lett. 12: 723-8).

[0111] 고체 상 펩티드 합성은 이후 기재되는 바와 같이 수행될 수 있다. 알파 작용기 (N α) 및 임의의 반응성 측쇄는 산 불안정성 또는 염기 불안정성 그룹으로 보호된다. 보호 기는 아미드 결합을 연결시키기 위한 조건하에 안정하지만, 형성된 펩티드 쇄를 손상시키지 않고 쉽게 절단될 수 있다. α -아미노 작용기에 적합한 보호 기는 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: Boc, 벤질옥시카보닐 (Z), 0-클로르벤질옥시카보닐, 바이-페닐이소프로필옥시카보닐, 3급-아밀옥시카보닐 (Amoc), α , α -디메틸-3,5-디메톡시-벤질옥시카보닐, o-니트로설페닐, 2-시아노-3급-부톡시-카보닐, Fmoc, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde) 등.

[0112] 적합한 측쇄 보호 기는 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 아세틸, 알릴 (Al1), 알릴옥시카보닐 (Al1oc), 벤질 (Bzl), 벤질옥시카보닐 (Z), 3급-부틸옥시카보닐 (Boc), 벤질옥시메틸 (Bom), o-브로모벤질옥시카보닐, 3급-부틸 (tBu), 3급-부틸디메틸실릴, 2-클로로벤질, 2-클로로벤질옥시카보닐, 2,6-디클로로벤질, 사이클로헥실, 사이클로펜틸, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde), 이소프로필, 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤질설포닐 (Mtr), 2,3,5,7,8-펜타메틸크로만-6-설포닐 (Pmc), 피발릴, 테트라하이드로피란-2-일, 토실 (Tos), 2,4,6-트리메톡시벤질, 트리메틸실릴 및 트리틸 (Trt).

[0113] 고체 상 합성에서, C-말단 아미노산은 적합한 지지체 재료에 결합된다. 적합한 지지체 재료는 합성 공정의 단계별 축합 및 절단 반응을 위한 시약 및 반응 조건에 대해 불활성이고 사용되는 반응 매질에 용해되지 않는 것들이다. 시판되는 지지체 재료의 예는 반응성 그룹 및/또는 폴리에틸렌 글리콜로 변형된스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 클로로메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 하이드록시메틸화 또는 아미노메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체 등을 포함한다.

[0114] 펩티드산의 제조가 목적시 되는 경우, 4-벤질옥시벤질-알코올(Wang-앵커) 또는 2-클로로트리틸 클로라이드로 유도체화된 폴리스티렌 (1%) 디비닐벤젠 또는 TentaGel®이 사용될 수 있다. 펩티드 아미드의 경우, 5-(4'-아미노메틸)-3',5'-디메톡시페녹시)발레르산 (PAL-앵커) 또는 p-(2,4-디메톡시페닐-아미노 메틸)-페녹시 그룹 (Rink 아미드 앵커)으로 유도체화된 폴리스티렌 (1%) 디비닐벤젠 또는 TentaGel®이 사용될 수 있다.

[0115] 중합성 지지체에 대한 연결은 실온 또는 승온(예: 40°C~60°C)에서, 예를 들어, 2 시간 내지 72시간의 반응 시간으로 에탄올, 아세트니트릴, N,N-디메틸포름아미드 (DMF), 디클로로메탄, 테트라하이드로푸란, N-메틸피롤리돈 또는 유사한 용매에 활성화 시약을 첨가하여 C-말단 Fmoc-보호된 아미노산을 지지체 재료와 반응시킴으로써 달성될 수 있다.

- [0116] PAL, Wang 또는 Rink 앵커에의 N α -보호된 아미노산(예: Fmoc 아미노산)의 커플링은, 예를 들어, 1-하이드록시벤조트리아졸 또는 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸의 존재 또는 부재하에 커플링제, 예를 들어, N,N'-디사이클로헥실카보디이미드 (DCC), N,N'-디이소프로필카보디이미드 (DIC) 또는 다른 카보디이미드, 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TBTU) 또는 다른 우로늄 염, O-아실-우레아, 벤조트리아졸-1-일-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP) 또는 다른 포스포늄 염, N-하이드록시석신이미드, 다른 N-하이드록시이미드 또는 옥심의 도움으로, 예를 들어, HOBt의 첨가하고, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민 (DIEA), 트리에틸아민 또는 N-메틸모르폴린, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민과 같은 염기를 첨가하거나 첨가하지 않고 TBTU의 도움으로 2 내지 72시간(예: 아미노산 및 커플링 시약의 1.5배 내지 3배 과량으로, 예를 들어, 2배 과량으로, 디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈 또는 디클로로메탄, 예를 들어, 디메틸포름아미드와 같은 용매 중에서 약 10℃ 내지 50℃의 온도, 예를 들어, 25℃에서 3시간)과 같은 반응 시간으로 수행될 수 있다.
- [0117] 커플링 시약 대신에, 활성 에스테르(예: 펜타플루오로페닐, p-니트로페닐 등), N α -Fmoc-아미노산의 대칭성 무수물, 이의 산 클로라이드 또는 산 플루오라이드를 상기한 조건하에 사용하는 것도 또한 가능하다.
- [0118] N α -보호된 아미노산 (예를 들어, Fmoc 아미노산)은 DIEA의 부가 및 10 내지 120분의 반응 시간, 예를 들어, 20분의 반응 시간과 함께 디클로로메탄 중 2-클로로트리틸 수지에 커플링될 수 있고, 상기 용매 및 상기 염기의 사용에 제한되지 않는다.
- [0119] 보호된 아미노산의 연속 커플링은 통상적인 방법에 따라서 펩티드 합성으로, 통상적으로 자동화 펩티드 합성화기에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 5 내지 20분 동안, 예를 들어 2 x 2분 동안, DMF 중 50% 피페리딘과 함께 및 DMF 중 20% 피페리딘으로 1 x 15분 동안 디메틸포름아미드 중 피페리딘 (10% 내지 50%)과의 처리에 의해 고체상에서 커플링된 아미노산의 N α -Fmoc 보호 그룹의 절단 후, 3 내지 10배 과량, 예를 들어, 10배 과량의 이후 보호된 아미노산은 불활성, 비-수성, 극성 용매, 예를 들어, 디클로로메탄, DMF 또는 2개의 혼합물 중에서 및 약 10℃ 내지 50℃의 온도에서, 예를 들어, 25℃의 온도에서 이전의 아미노산에 커플링된다. 제1 N α -Fmoc 아미노산의 PAL, Wang 또는 Rink 앵커의 커플링을 위해 이전에 언급된 시약은 커플링 시약으로서 적합하다. 보호된 아미노산의 활성 에스테르, 또는 이의 클로라이드 또는 플루오라이드 또는 대칭성 무수물이 대안으로서 사용될 수도 있다.
- [0120] 고체 상 합성의 종결시, 펩티드는 측쇄 보호 기를 동시에 절단하면서 지지체 재료로부터 절단된다. 절단은 0.5 내지 3시간 이내, 예를 들어, 2시간 이내 5% 내지 20% V/V의 스캐빈저, 예를 들어, 디메틸설파이드, 에틸메틸설파이드, 티오아니졸, 티오크레졸, m-크레졸, 아니졸 에탄디티올, 페놀 또는 물, 예를 들어, 15% v/v 디메틸설파이드/에탄디티올/m-크레졸 1:1:1의 첨가와 함께 트리플루오로아세트산 또는 다른 강산 매질로 수행될 수 있다. 완전 보호된 측쇄를 갖는 펩티드는 2-클로로트리틸 앵커를 빙초산/트리플루오로에탄올/디클로로메탄 2:2:6으로 절단시킴으로써 수득된다. 보호된 펩티드는 실리카 겔 상에서 크로마토그래피로 정제될 수 있다. 펩티드가 Wang 앵커를 통해 고체 상에 연결되는 경우 및 C-말단 알킬아미드화로 펩티드를 수득하고자 하는 경우, 절단은 알킬아민 또는 플루오로알킬아민을 사용하는 아미노분해에 의해 수행될 수 있다. 아미노분해는 약 -10℃ 내지 50℃의 온도(예: 약 25℃) 및 약 12 내지 24의 반응 시간(예: 약 18시간)으로 수행된다. 또한, 펩티드는, 예를 들어, 메탄올을 사용하는 재에스테르화에 의해 지지체로부터 절단될 수 있다.
- [0121] 수득된 산성 용액은 펩티드를 침전시키고 따라서 에테르에 잔류하는 스캐빈저와 절단된 보호 기를 분리하기 위해 3 내지 20배량의 차가운 에테르 또는 n-헥산, 예를 들어, 10배 과량의 디에틸 에테르와 혼합할 수 있다. 추가의 정제는 펩티드를 빙초산으로부터 수회 재침전시킴으로써 수행될 수 있다. 수득된 침전을 물 또는 tert-부탄올 또는 두 용매의 혼합물, 예를 들어, tert-부탄올/물의 1:1 혼합물에 용해시키고, 동결 건조시킬 수 있다.
- [0122] 수득된 펩티드는 아세테이트 형태로 약염기 수지 상의 이온 교환; 비-유체화된 폴리스티렌/디비닐벤젠 공중합체(예를 들어, Amberlite[®] XAD) 상의 소수성 흡착 크로마토그래피; 실리카 겔 상의 흡착 크로마토그래피; 예를 들어, 카복시메틸 셀룰로스 상의 이온 교환 크로마토그래피; 예를 들어, Sephadex[®] G-25 상의 분배 크로마토그래피; 역류 분배 크로마토그래피; 또는 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 예를 들어, 옥틸 또는 옥타데실실릴 실리카 (ODS) 상의 역상 HPLC를 포함하는, 다양한 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다.
- [0123] 재조합 생산
- [0124] IL-15 (예: 뮤린 및 인간 IL-15)는 본원에 기재된 것들과 같은 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하는 다수의 방식으로 합성될 수 있다. IL-15는 바이러스 기원일 수 있고, Epstein Barr

virus)(BCRF1 단백질)로부터의 바이러스 IL-15의 클로닝 및 발현은 다음 문헌에 개시되어 있다: Moore et al., (1990) Science 248:1230. 추가로, 재조합 IL-15는 다수의 공급원 (예를 들어, Life Technologies, Grand Island, NY and BioLegend, San Diego, CA)으로부터 시판된다.

[0125] 부위 특이적 돌연변이 생성(또한, 부위 지시된 돌연변이 생성 및 올리고뉴클레오타이드 지시된 돌연변이 생성으로도 지칭됨)은 개선되거나 바람직한 특성을 갖는 본 발명의 합리적으로 설계된 단백질(예: 특별한 IL-15 뮤테인 및 이의 도메인을 포함하는 IL-15의 다른 변형된 버전)을 생성하기 위해 DNA에서 특정 돌연변이를 생성하는데 사용될 수 있다. 부위 특이적 돌연변이 생성 기술은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 초기 부위 특이적 돌연변이 생성 방법(예: 쿤켈의 방법(Kunkel's method); 카세트 돌연변이 생성; PCR 부위 지시된 돌연변이 생성; 및 SPRINP를 포함하는 전체 플라스미드 돌연변이 생성)은 하기를 포함하는 다양한 생체내 방법과 같은 보다 정확하고 효율적인 방법으로 대체되었다: 델리토 페르페토(Delitto perfetto) [참조: Storici F. and Resnick MA, (2006) Methods in Enzymology 409:329-45]; 트랜스플레이스먼트(transplacement) "팝-인 팝-아웃(pop-in pop-out)"; PCR 및 하나의 재활용 가능한 마커를 사용하는 직접 유전자 결실 및 부위 특이적 돌연변이 생성; PCR 및 긴 상동성 영역을 사용하는 하나의 재활용 가능한 마커를 사용하는 직접 유전자 결실 및 부위 특이적 돌연변이 생성; 및 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 생체내 부위 지시된 돌연변이 생성 (참조: 예를 들어, In Vitro Mutagenesis Protocols (Methods in Molecular Biology), 2nd Ed. ISBN 978-0896039100). 추가로, 부위-특이적 돌연변이유발을 위한 도구가 시판되고 있다 (예를 들어, Stratagene Corp., La Jolla, CA).

[0126] 폴리펩티드가 재조합 기술을 사용하여 생산되는 경우, 본 폴리펩티드는, 각각 원핵 또는 진핵 세포, 예컨대 박테리아 (예를 들면, E. 콜리) 또는 효모 숙주세포일 수 있는, 임의의 적합한 숙주세포 및 임의의 적합한 작제물을 사용하여 세포내 단백질 또는 분비된 단백질로서 생산될 수 있다. 숙주 세포로서 사용될 수 있는 진핵 세포의 다른 예는 곤충 세포, 포유동물 세포, 및/또는 식물 세포를 포함한다. 포유동물의 숙주세포가 사용되는 경우, 이들은 인간 세포 (예를 들면, HeLa, 293, H9 및 저켓 세포); 마우스 세포 (예를 들면, NIH3T3, L 세포, 및 C127 세포); 영장류 세포 (예를 들면, Cos 1, Cos 7 및 CV1) 및 햄스터 세포 (예를 들면, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포)를 포함할 수 있다.

[0127] 폴리펩티드의 발현에 적합한 다양한 숙주-벡터 시스템은 당해 분야에 공지된 표준 절차에 따라 사용될 수 있다 [참고: 예를 들어, Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; and Ausubel et al. 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons]. 유전학적 물질의 숙주 세포로의 도입을 위한 방법은 예를 들어, 형질전환, 전기천공, 큰주게이트, 인산칼슘 방법 등을 포함한다. 전달 방법은 도입된 폴리펩티드-암호화 핵산의 안정한 발현을 제공하기 위해 선택될 수 있다. 상기 폴리펩티드-암호화 핵산은 유전성 에피솜 요소(예를 들어, 플라스미드)로서 제공되거나 게놈에 통합될 수 있다. 관심 폴리펩티드 생산에서의 사용을 위한 다양한 적합한 벡터가 상업적으로 이용가능하다.

[0128] 벡터는 숙주 세포에서 염색체의 유지를 제공할 수 있거나 숙주 세포 게놈으로의 통합을 제공할 수 있다. 상기 발현 벡터는 전사 및 해독 조절 서열을 제공하고 유도성 또는 항상성 발현을 제공할 수 있고, 여기서, 상기 암호화 영역은 전사 개시 영역, 및 전사 및 해독 종결 영역의 전사 조절하에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 전사 및 번역 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 정지 서열, 번역 개시 및 정지 서열, 및 인핸서 또는 활성화제 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 프로모터는 항상성이거나 유도성일 수 있고 강한 항상성 프로모터(예를 들어, T7)일 수 있다.

[0129] 발현 작제물은 일반적으로, 목적하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 삽입을 제공하기 위해 프로모터 서열 근처에 위치한 간편한 제한 부위를 갖는다. 발현 숙주에서 작동하는 선택가능한 마커는 벡터를 함유하는 세포의 선택을 촉진시키기 위해 존재할 수 있다. 또한, 발현 작제물은 추가의 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 발현 벡터는 1개 또는 2개의 복제 시스템을 가질 수 있고, 이것이 유기체, 예를 들어, 발현을 위한 포유동물 또는 곤충 세포, 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 숙주에 유지되도록 한다. 추가로, 발현 작제물은 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하기 위해 선택가능한 마커 유전자를 함유할 수 있다. 선택가능한 유전자는 당업자에게 널리 공지되어 있고 사용되는 숙주 세포에 따라 다양하다.

[0130] 단백질의 분리 및 정제는 당업계에 공지된 방법에 따라 성취될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 구성적으로 및/또는 유도성 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 용해물로부터 또는 일반적으로 샘플을 항-단백질 항체와 접촉시키는 단계, 비특이적으로 결합된 재료를 제거하기 위해 세척하는 단계 및 특이적으로 결합된 단백질을 용출시키는 단계를 포함하는 면역친화도 정제에 의해 합성 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다. 분리된 단백질은 투석 및 단백질 정제에 통상적으로 사용되는 다른 방법에 의해 추가로 정제될 수 있다. 일 구현예에서, 단백질

은 금속 킬레이트 크로마토그래피 방법을 사용하여 분리될 수 있다. 단백질은 분리를 촉진시키기 위한 변형을 함유할 수 있다.

[0131] 폴리펩티드는 실질적으로 순수하거나 분리된 형태(예: 다른 폴리펩티드를 함유하지 않음)로 제조될 수 있다. 폴리펩티드는 존재할 수 있는 다른 성분(예: 다른 폴리펩티드 또는 다른 숙주 세포 성분)에 비해 폴리펩티드가 풍부한 조성물에 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제된 폴리펩티드는 폴리펩티드가 다른 발현 단백질이 실질적으로 함유되지 않는, 예를 들어, 약 90% 미만, 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만 또는 약 1% 미만인 조성물에 존재하도록 제공될 수 있다.

[0132] IL-15 폴리펩티드는 당해 기술 분야에 공지된 상이한 IL-15-관련 핵산을 조작하기 위한 재조합 기술을 사용하여, IL-15 폴리펩티드를 암호화할 수 있는 작제물을 제공하기 위해 생성될 수 있다. 특별한 아미노산 서열이 제공될 때, 당업자는, 예를 들어, 분자 생물학에서 그의 배경 및 경험의 견지에서 이러한 아미노산 서열을 암호화하는 다양한 상이한 핵산 분자를 인식할 것이라는 것이 이해될 것이다.

[0133] 아미드 결합 치환

[0134] 일부의 경우에, IL-15는 펩티드 결합 이외의 하나 이상의 결합을 포함하고, 예를 들어, 적어도 두 개의 인접 아미노산은 아미드 결합 이외의 결합을 통해 결합된다. 예를 들어, 목적하지 않은 단백질 분해 또는 다른 분해 수단을 감소시키거나 제거하고/하거나 혈청 안정성을 증가시키고/시키거나 형태 가요성을 제한하거나 증가시키기 위해, IL-15의 골격 내의 하나 이상의 아미드 결합이 치환될 수 있다.

[0135] 또 다른 예에서, IL-15에서 하나 이상의 아미드 연결체 (-CO-NH-)는 아미드 연결체의 등배전자체(isostere)인 연결체, 예를 들어 -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH- (시스 및 트랜스), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- 또는 -CH₂SO-로 대체될 수 있다. IL-15 중 하나 이상의 아미드 연결체는 또한 예를 들어, 환원된 등배전자체 슈도펩티드 결합에 의해 대체될 수 있다. 다음을 참조한다: Couder et al.(1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41:181-184. 이러한 대체 및 그들을 수행하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0136] 아미노산 치환

[0137] 하나 이상의 아미노산 치환이 IL-15 폴리펩티드에서 수행될 수 있다. 다음은 비제한적인 예이다:

[0138] a) 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 노르류신, (S)-2-아미노부틸산, (S)-시클로헥실알라닌을 포함하는 알킬-치환된 소수성 아미노산의 치환, 또는 분기형, 환형 및 직쇄 알킬, 알케닐 또는 알킬닐 치환이 포함된 C₁-C₁₀ 탄소로부터 지방족 측쇄에 의해 치환된 기타 단순 알파-아미노산;

[0139] b) 상기 나열된 방향족 아미노산의 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 아자, 할로젠화(플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도) 또는 알콕시(C₁-C₄)-치환된 형태를 포함하여 페닐알라닌, 트립토판, 티로신, 설포티로신, 비페닐알라닌, 1-나프틸알라닌, 2-나프틸알라닌, 2-벤조티에닐알라닌, 3-벤조티에닐알라닌, 히스티딘을 포함하는 방향족 치환된 소수성 아미노산의 치환, 이의 예시적 예는 하기와 같다: 2-, 3- 또는 4-아미노페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-클로로페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메틸페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메톡시페닐알라닌, 5-아미노-, 5-클로로-, 5-메틸- 또는 5-메톡시트립토판, 2'-, 3'- 또는 4'-아미노-, 2'-, 3'- 또는 4'-클로로-, 2, 3 또는 4-비페닐알라닌, 2'-, 3'- 또는 4'-메틸-, 2-, 3- 또는 4-비페닐알라닌 및 2- 또는 3-피리딜알라닌;

[0140] c) 치환체가 헤테로원자(예: 알파 질소, 또는 원위 질소 또는 질소들, 또는, 예를들어, 프로-R 위치에서 알파 탄소 상에 존재하는지의 여부에 관계 없이 이전 아미노산의 알킬, 알케닐 또는 아릴 치환된(C₁-C₁₀ 분지형, 선형 또는 환형) 유도체를 포함하여, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 오르니틴, 2,3-디아미노프로피온산, 호모아르기닌을 포함하는 염기성 측쇄를 함유하는 아미노산의 치환. 예시적인 예로서 작용하는 화합물은 하기를 포함한다: N-엡실론-이소프로필-리신, 3-(4-테트라하이드로피리딜)-글리신, 3-(4-테트라하이드로피리딜)-알라닌, N,N-감마, 감마'-디에틸-호모아르기닌. 알킬 그룹이 알파-탄소의 프로-R 위치를 차지하는 알파-메틸-아르기닌, 알파-메틸-2,3-디아미노프로피온산, 알파-메틸-히스티딘, 알파-메틸-오르니틴과 같은 화합물도 또한 포함된다. 알킬, 방향족, 헤테로방향족(여기서, 헤테로방향족 그룹은 단독으로 또는 조합하여 하나 이상의 질소, 산소 또는 황 원자를 갖는다), 카복실산 또는 임의의 다수의 익히 공지된 활성화 유도체, 예를 들어, 산 클로라이드, 활성 에스테르, 활성 아졸리드 및 관련 유도체, 및 리신, 오르니틴 또는 2,3-디아미노프로피온산으로부터 형성된 아미드도 또한 포함된다;

[0141] d) 아스파르트산, 글루탐산, 호모글루탐산, 티로신, 2,4-디아미노프로피온산의 알킬, 아릴, 아릴알킬, 및 헤테

로아릴 설폰아미드, 오르니틴 또는 리신 및 테트라졸 치환된 알킬 아미노산을 포함하는 산성 아미노산의 치환;

[0142] e) 아스파라긴, 글루타민, 및 아스파라긴 또는 글루타민의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 측쇄 아미드 잔기의 치환; 및

[0143] f) 세린, 트레오닌, 호모세린, 2,3-디아미노프로피온산, 및 세린 또는 트레오닌의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 하이드록실 함유 아미노산의 치환.

[0144] 일부 경우에, IL-15는 아미노산의 하나 이상의 천연 발생되는 비유전적으로 암호화된 L-아미노산, 합성 L-아미노산, 또는 D-에난티오머를 포함한다. 일부 구현예에서, IL-15는 D-아미노산만을 포함한다. 예를 들어, IL-15 폴리펩티드는 하기 잔기 중의 하나 이상을 포함할 수 있다: 하이드록시프롤린, β -알라닌, o-아미노벤조산, m-아미노벤조산, p-아미노벤조산, m-아미노메틸벤조산, 2,3-디아미노프로피온산, α -아미노이소부티르산, N-메틸글리신 (사르코신), 오르니틴, 시트룰린, 3급-부틸알라닌, 3급-부틸글리신, N-메틸이소류신, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, 노르류신, 나프틸알라닌, 피리딜알라닌, 3-벤조티에닐 알라닌, 4-클로로페닐페닐알라닌, 2-플루오로페닐알라닌, 3-플루오로페닐알라닌, 4-플루오로페닐알라닌, 페니실라민, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, β -2-티에닐알라닌, 메티오닌 설폭사이드, 호모아르기닌, N-아세틸 리신, 2,4-디아미노 부티르산, rho-아미노페닐알라닌, N-메틸발린, 호모시스테인, 호모세린, ϵ -아미노 헥산산, ω -아미노헥산산, ω -아미노헵탄산, ω -아미노옥탄산, ω -아미노데칸산, ω -아미노테트라데칸산, 사이클로헥실알라닌, α , γ -디아미노부티르산, α , β -디아미노프로피온산, δ -아미노 발레르산, 및 2,3-디아미노부티르산.

[0145] **추가적 변형**

[0146] 시스테인 잔기 또는 시스테인 유사체는 이황화 결합을 통해 또 다른 펩티드에 대한 결합을 제공하거나 IL-15 폴리펩티드의 고리화(cyclization)를 제공하기 위해 IL-15 폴리펩티드에 도입될 수 있다. 시스테인 또는 시스테인 유사체를 도입하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다 (참조: 예를 들어, 미국 특허 번호 8,067,532). 고리화의 다른 수단은 옥심 링커 또는 란티오닌 링커의 도입을 포함하고; 다음을 참조한다: 예를 들어, 미국 특허 번호 8,044,175. 고리화 결합을 형성할 수 있는 아미노산 (또는 비아미노산 잔기)의 임의의 조합이 사용될 수 있고/있거나 도입될 수 있다. 고리화 결합은 가교의 도입을 가능하게 하는 작용성 그룹과 아미노산의 임의의 조합으로 (또는 아미노산 및 $-(CH_2)_n-CO-$ 또는 $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$ 으로) 생성될 수 있다. 일부 예는 이황화, 이황화 모방체, 예를 들어, $-(CH_2)_n-$ 카바(carba) 가교, 티오아세탈, 티오에테르 가교(시스타티오닌 또는 란티오닌) 및 에스테르 및 에테르를 함유하는 가교이다. 이러한 예에서, n은 임의의 정수일 수 있지만, 흔히 10 미만이다.

[0147] 다른 변형은, 예를 들면, N-알킬 (또는 아릴) 치환 (ψ [CONR]), 또는 락탐 및 다른 환형 구조물을 작제하기 위한 골격 가교결합을 포함한다. 다른 유도체는 C-말단 하이드록시메틸 유도체, o-변형된 유도체 (예를 들어, C-말단 하이드록시메틸 벤질 에테르), 알칼아미드 및 하이드라지드와 같은 치환된 아미드를 포함하는 N-말단 변형된 유도체를 포함한다.

[0148] 일부 경우에, IL-15 폴리펩티드 중의 하나 이상의 L-아미노산은 하나 이상의 D-아미노산으로 대체된다.

[0149] 일부 경우에, IL-15 폴리펩티드는 레트로인버소(retroinverso) 유사체이다(참조: 예를 들어, Sela and Zisman (1997) FASEB J. 11:449). 레트로-인버소 펩티드 유사체는 아미노산 서열의 방향이 역전되고(레트로), 내부의 하나 이상의 아미노산의 키랄성 D- 또는 L-이, 예를 들어, L-아미노산보다 오히려 D-아미노산을 사용하여 반전되는(인버소) 선형 폴리펩티드의 이성질체이다. [참조: 예를 들면, Jameson et al.(1994) Nature 368:744; and Brady et al.(1994) Nature 368:692].

[0150] IL-15 폴리펩티드는 지질 이중층, 미셀, 세포 막, 유기 막 또는 소포 막을 가로지르는 것을 용이하게 하는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 탄수화물 또는 유기 또는 무기 분자를 의미하는 “단백질 형질도입 도메인”(PTD)을 포함할 수 있다. 또 다른 분자에 부착된 PTD는 분자가 막을 가로지르는 것, 예를 들어, 세포외 공간으로부터 세포내 공간으로, 또는 세포질에서 세포 기관 내로 이동하는 것을 촉진시킨다. 일부 구현예에서, PTD는 IL-15 폴리펩티드의 아미노 말단에 공유 결합되는 반면, 다른 구현예에서, PTD는 IL-15 폴리펩티드의 카복실 말단에 공유 결합된다. 예시적인 단백질 형질도입 도메인은 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 최소의 운데카펩티드 단백질 형질도입 도메인(YGRKKRRQRRR을 포함하는 HIV-1 TAT의 잔기 47-58에 상응; 서열번호: 10); 하기를 포함하는 폴리아르기닌 서열: 세포에 직접 도입하기에 충분한 아르기닌 잔기의 수(예: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10~50개 아르기닌); VP22 도메인 (Zender et al.(2002) Cancer Gene Ther.9(6): 489-96); 초파리 안테나페디아 단백질 형질도입 도메인 (Noguchi et al.(2003) Diabetes 52(7):1732-1737); 절단된 인간 칼시토닌

펩티드 (Trehin et al.(2004) Pharm. Research 21:1248-1256); 폴리리신 (Wender et al.(2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13003-13008); RRQRRTSKLMKR (서열 번호: 11); 트랜스포탄(Transportan) GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열 번호: 12); KALAWAEKALAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (서열 번호: 13); 및 RQIKIWFQNRRMKWKK (서열 번호: 14). 예시적인 PTD는 YGRKKRRQRRR (서열번호: 10), RKKRRQRRR (서열번호: 15); 3개의 아르기닌 잔기 내지 50개의 아르기닌 잔기의 아르기닌 단독중합체를 포함하지만, 이에 한정되지 않고; 예시적인 PTD 도메인 아미노산 서열은 하기 중의 어느 하나를 포함하나, 이에 한정되지 않는다: YGRKKRRQRRR (서열 번호: 10); RKKRRQRR (서열 번호: 16); YARAAARQARA (서열 번호: 17); THRLPRRRRRR (서열 번호: 18); 및 GGRRARRRRRR (서열 번호: 19).

[0151] IL-15 폴리펩티드의 C-말단 말단에서 아미노산의 카복실 기 COR_3 은 유리 형태 ($\text{R}_3 = \text{OH}$)로 또는 예를 들면, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염과 같은 생리학적으로 허용되는 알칼리성 또는 알칼리 토금속 염의 형태로 존재할 수 있다. 카복실 기는 또한 1차, 2차 또는 3차 알코올, 예를 들어, 메탄올, 분지되거나 비분지형 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -알킬 알코올, 예를 들어, 에틸 알코올 또는 tert-부탄올로 에스테르화될 수 있다. 카복실 기는 또한 1급 또는 2급 아민, 예를 들어, 암모니아, 분지되거나 비분지형 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -알킬아민 또는 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 디-알킬아민, 예를 들어, 메틸아민 또는 디메틸아민으로 아미드화될 수 있다.

[0152] IL-15 폴리펩티드의 N-말단에서 아미노산의 아미노 기 NR_1R_2 은 유리 형태 ($\text{R}_1 = \text{H}$ 그리고 $\text{R}_2 = \text{H}$)로 또는, 예를 들어, 클로라이드 또는 아세테이트와 같은 생리학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다. 아미노 기는 또한 $\text{R}_1 = \text{H}$ 이고, 그리고 $\text{R}_2 =$ 아세틸, 트리플루오로아세틸 또는 아다만틸이도록 산으로 아세틸화될 수 있다. 아미노 기는 펩티드 화학에 통상적으로 사용되는 아미노 보호 그룹, 예를 들어, 하기로 보호된 형태로 존재할 수 있다: 상기 제공된 것들(예: Fmoc, 벤질옥시-카보닐 (Z), Boc, 및 Alloc). 아미노 기는 N-알킬화될 수 있으며, 여기서 R_1 및/또는 $\text{R}_2 = \text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 또는 $\text{C}_2\text{-C}_8$ 알켄일 또는 $\text{C}_7\text{-C}_9$ 아르알킬이다. 알킬 잔기는 직쇄, 측쇄 또는 사이클릭(예를 들어, 각각, 에틸, 이소프로필 및 사이클로헥실)일 수 있다.

[0153] IL-15의 폐길화 및 다른 비-단백질성 중합체와 IL-15의 접합

[0154] 폴리펩티드 서열에의 접합에 적합한 PEG는 일반적으로 실온에서 물에 가용성이고, 화학식 $\text{R}(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_n\text{-O-R}$ 을 갖고, 상기 식 중, R은 수소 또는 보호 그룹, 예를 들어, 알킬 또는 알칸올 그룹이고, n은 1 내지 1000의 정수이다. R이 보호 기이면, 이는 일반적으로 1 내지 8개의 탄소를 갖는다. 폴리펩티드 서열에 접합된 PEG는 선형이거나 분지될 수 있다. 분지형 PEG 유도체, “스타-PEG” 및 다중-암 PEG가 본 발명에 의해 고려된다. 본 발명에 사용된 PEG의 분자량(분자 질량)은 임의의 특정 범위로 제한되지 않는다. 특정 구현에는 5kDa 내지 20kDa의 분자량을 갖는 반면, 다른 구현에는 5kDa 내지 10kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 분자량을 갖는 PEG를 기재하는 추가의 구현에는 본원의 다른 곳에 기재된다.

[0155] 본 발명은 또한 PEG가 상이한 n 값을 갖고, 따라서 다양한 상이한 PEG가 특정비율로 존재하는 접합체의 조성물을 고려한다. 예를 들어, 일부 조성물은 n=1, 2, 3 및 4인 접합체의 혼합물을 포함한다. 일부 조성물에서, n=1인 접합체의 비율은 18 내지 25%이고, n=2인 접합체의 비율은 50 내지 66%이고, n=3인 접합체의 비율은 12 내지 16%이고, n=4인 접합체의 비율은 5% 이하이다. 이러한 조성물은 당해 분야에 공지된 반응 조건 및 정제 방법에 의해 생성될 수 있다. 예시적인 반응 조건은 명세서 전반에 걸쳐 기재된다. 양이온 교환 크로마토그래피는 접합체를 분리하는데 사용될 수 있고, 이어서, 예를 들어, 비변형된 단백질 서열 및 다른 수의 PEG가 부착된 접합체를 함유하지 않고 정제된, 목적하는 수의 PEG가 부착된 접합체를 함유하는 분획이 식별된다.

[0156] 폐길화는 폴리펩티드의 N-말단의 알파 아미노 기, 리신 잔기의 측쇄 상의 엡실론 아미노 기 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이미다졸 기에서 가장 빈번하게 발생한다. 대부분의 재조합 폴리펩티드가 단일 알파 및 다수의 엡실론 아미노 및 이미다졸 기를 포함하기 때문에, 다수의 위치 이성질체가 링커 화학에 따라 생성될 수 있다. 당해 분야에 공지된 일반적인 폐길화 전략이 본원에서 적용될 수 있다. PEG는 하나 이상의 폴리펩티드 서열의 유리 아미노 또는 카복실 기와 폴리에틸렌 글리콜 사이의 결합을 매개하는 말단 반응성 그룹(“스페이서”)을 통해 본 발명의 폴리펩티드에 결합될 수 있다. 유리 아미노 기에 결합될 수 있는 스페이서를 갖는 PEG는 폴리에틸렌 글리콜의 석신산 에스테르를 N-하이드록시석시닐이미드로 활성화시킴으로써 제조될 수 있는 N-하이드록시석시닐이미드 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 유리 아미노 기에 결합될 수 있는 또 다른 활성화 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 시아누르산 클로라이드와 반응시킴으로써 제조될 수 있는 2,4-비스(0-메톡시폴리에틸렌글리콜)-6-클로로-s-트리아진이다. 유리 카복실 기에 결합된 활성화 폴리에틸렌 글리콜은 폴리옥

시에틸렌디아민을포함한다.

- [0157] 스페이서를 갖는 PEG에 대한 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 서열의 접합은 다양한 통상적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 접합 반응은 5 내지 10의 pH에서, 4℃ 내지 실온의 온도에서 30분 내지 20시간 동안 시약 대 단백질의 몰 비 4:1 내지 30:1을 사용하여 용액 중에서 수행될 수 있다. 반응 조건은 주로 목적하는 치환도를 생성하도록 반응을 지시하도록 선택될 수 있다. 일반적으로 저온, 낮은 pH(예: pH=5), 및 짧은 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 감소시키는 경향이 있는 반면, 고온, 중성 내지 높은 pH(예: pH≥7), 및 긴 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 증가시키는 경향이 있다. 당해 분야에 공지된 다양한 수단이 반응을 종결시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 반응은 반응 혼합물을 산성화시키고 예를 들어, -20℃에서 동결시킴에 의해 종결된다. 다양한 분자의 폐길화는, 예를 들어, 미국 특허 제5,252,714호; 제5,643,575호; 제5,919,455호; 제5,932,462호; 및 제5,985,263호에 검토되어 있다.
- [0158] 상기 나타낸 바와 같이, 폐길화는 N-말단, 리신 잔기의 측쇄, 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이미다졸 기에서 가장 빈번하게 발생한다. 이러한 폐길화의 유용성은, 예를 들어, 반응 조건의 최적화 및 정제 공정의 개선에 의한 개선에 의해 향상되었다. 보다 최근의 잔기 특이적 화학은 아르기닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 세린, 트레오닌 및 티로신 뿐만 아니라, 카복시 말단의 폐길화를 가능하게 하였다. 이러한 아미노산 잔기 중 일부는 특이적으로 폐길화될 수 있는 반면, 나머지는 더욱 난잡하거나 특정 조건하에 부위 특이적 폐길화만을 초래한다.
- [0159] 추가의 아미노산 잔기의 폐길화를 가능하게 하는 현재의 접근법은 가교 폐길화(이황화 가교), 효소적 폐길화(글루타민 및 C-말단) 및 글리코폐길화(O- 및 N-글리코실화 부위 또는 당단백질의 글리칸) 및 헤테로이작용성 폐길화를 포함한다. 비천연 아미노산을 함유하는 단백질의 폐길화, C-말단 폐길화를 위한 인테인융합단백질, 트랜스글루타미나제 매개된 폐길화, 소르타제 A 매개된 폐길화, 및 방출가능한 비공유 폐길화에 대한 추가의 접근법이 기재되어 있다. 또한, 특정 폐길화 접근법과 유전 공학 기술의 조합은 폴리에틸렌 글리칸 중합체가, 예를 들어, 직교 반응성 그룹을 포함하는 천연 또는 비천연 아미노산에 의한 폴리펩티드 내의 특정 아미노산 잔기의 치환으로 인해 단백질 표면 상의 임의의 위치에서 본질적으로 결합할 수 있게 한다. 참고: 일반적으로, 예를 들어, Pasut, G. and Veronese, F.M., (2012) J. Controlled Release 161:461-72; Roberts, M.J. et al., (2012) Advanced Drug Delivery Rev. 64:116-27; Jevsevar, S. et al., (2010) Biotechnol.J. 5:113-28; 및 Yoshioka, Y. (2011) Chem.Central J. 5:25.
- [0160] 폐길화 분자의 치료적 가치는 충분히 입증되어 있다. 임상적으로 사용된 PEG 접합체는 하기를 포함한다: OMONTYS (Affymax/Takeda); CIMZIA (Nektar/UCB Pharma); MACUGEN (Pfizer); DOXIL (Ortho Biotech); ADAGEN (아데노신 데아미나제 당 mPEG; Enzon); ONCASPAR (mPEG-L-아스파라기나제; Enzon); MICERA (연속 에리트르포이에시스 수용체 활성화제 또는 메톡시 폴리에틸렌 글리콜-에포에틴 베타; Roche); PEGASYS (페그인터페론 알파-2a; Roche); 페그-인트론(PEG-INTRON) (페그인터페론 알파-2b; Schering-Plough); SOMAVERT (페그비소만트; Pfizer); NEULASTA (Pegfilgrastim; Amgen); 및 KRYSTEXXA (페글로티카제; Savient). 추가로, 다수의 PEG 저분자량 약물 후보물은 임상 시험에 진입하였고, PROTHECAN (PEG-캄프토테신; Enzon) 및 NKTR-102 (PEG-이리노테칸; Nektar)를 포함한다.
- [0161] 본 발명은 또한 PEG 모방체의 사용을 고려한다. PEG의 특성(예: 향상된 혈청 반감기)을 유지하면서 몇 가지 추가적인 유리한 특성을 부여하는 재조합 PEG 모방체가 개발되었다. 예로서, PEG와 유사한 확장된 형태를 형성할 수 있는 (예를 들어, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser 및 Thr을 포함하는) 단순한 폴리펩티드쇄는 관심 있는 펩티드 또는 단백질 약물(예: Amunix' XTEN technology; Mountain View, CA)에 이미 재조합적으로 융합되어 생성될 수 있다. 이는 제조 공정 동안 추가의 접합 단계의 필요성을 제거한다. 또한, 확립된 분자 생물학 기술은 폴리펩티드쇄의 측쇄 조성의 제어를 가능하게하여 면역원성 및 제조 특성의 최적화를 허용한다.
- [0162] 링커: 링커 및 그들의 용도는 상기 기재되었다. 본 개시내용의 폴리펩티드 서열을 변형하기 위해 사용된 임의의 전술한 성분 및 분자는 링커를 통해 선택적으로 접합될 수 있다. 적합한 링커는 일반적으로 변형된 폴리펩티드 서열과 연결된 성분 및 분자 사이의 일부 이동을 허용하기에 충분한 길이의 “가요성 링커”를 포함한다. 링커 분자는 일반적으로 약 6 내지 50 원자 길이이다. 링커 분자는 또한, 예를 들면, 아릴 아세틸렌, 2-10 모노머 단위를 함유하는 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민, 이산, 아미노산, 또는 이들의 조합일 수 있다. 적합한 링커는 쉽게 선택될 수 있고 그리고 임의의 적합한 길이, 예컨대 1개 아미노산 (예컨대, Gly), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50개, 또는 50개 초과 아미노산일 수 있다.
- [0163] 예시적 가요성 링커는 글리신 중합체 (G)_n, 글리신-세린 중합체 (예를 들어, (GS)_n, GSGGS_n (서열 번호: 20),

GGGS_n (서열 번호: 21), (G_mS_o)_n, (G_mS_oG_m)_n, (G_mS_oG_mS_oG_m)_n (서열 번호: 22), (GSGGS_m)_n (서열 번호: 23), (GSGS_mG)_n (서열 번호: 24) 및 (GGGS_m)_n (서열 번호: 25), 및 이의 조합을 포함하고, 여기서, m, n, 및 o는 각각 독립적으로 적어도 하나의 정수로부터 선택된다), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 폴리머는 상대적으로 비구조화되어 있고, 그리고 따라서 성분 사이에서 중성 연결기로 작용할 수 있다. 예시적인 가요성 링커는, 비제한적으로 GSGG (서열 번호: 26), GGS GG (서열 번호: 27), GSGSG (서열 번호: 22), GSGGG (서열 번호: 28), GGGSG (서열 번호: 20), 및 GSSSG (서열 번호: 29)를 포함한다.

[0164] **활성화된 링커:** 본 발명의 특정 구현예에서, PEG는 하나 이상의 PEG 분자에 공유 결합된 활성화된 링커를 통해 IL-15에 접합된다. 링커는, 화학적으로 반응성이고 펩티드 상의 반응성 그룹에 공유 결합할 준비가되어 있는 경우, “활성화”된다. 활성화된 PEG는 PEG 쇄를 약물, 효소, 인지질 및 다른 생물학적 제제로 도입할 수 있는 다양한 작용성 그룹을 포함한다.

[0165] 본 발명은, 적합한 반응 조건하에 하나 이상의 PEG 분자를 수용할 수 있고 아미노산 잔기와 공유 결합을 형성할 수 있다면, 임의의 활성화된 링커의 사용을 고려한다. 특별한 국면에서, 활성화된 링커는 다른 부착 부위(예: 리신의 엡실론 아미노 기 또는 히스티딘의 이미노 그룹)에 비해 매우 선택적인 방식으로 알파 아미노 기에 부착한다.

[0166] 일부 구현예에서, 활성화된 링커는 화학식 (PEG)_b-L'으로 나타낼 수 있다: 여기서, 하나 이상의 PEG는 링커의 탄소 원자에 공유적으로 부착되어 에테르 결합을 형성하고, b는 1 내지 9이고 (즉, 1 내지 9개 PEG 분자는 링커에 부착될 수 있다), L'는 예를 들어, 아미노산 잔기 상의 아미노 또는 이미노 그룹과 반응하여 PEG의 IL-15로 공유적 부착을 제공하는 반응성 그룹 (활성화된 모이어티)을 함유한다. 다른 구현예에서, 활성화된 링커(L')는 화학식 RCHO의 알데하이드를 함유하고, 여기서 R은 선형 또는 분지형 C₁₋₁₁ 알킬이고; IL-15에 활성화된 링커의 공유 결합 후, 링커는 2 내지 12개의 탄소원자를 함유한다. 본 발명은 PEG-프로피온알데하이드가 예시적인 활성화된 링커인 구현예를 고려한다. PEG-프로피온알데하이드 (CH₂CH₂CHO)는 미국 특허 제5,252,714호에 기재되어 있고 시판되고 있다(예를 들어, Shearwater Polymers (Huntsville, AL)). 다른 활성화된 PEG-링커는 예를 들어, 제조원 [Shearwater Polymers and Enzon, Inc. (Piscataway, N.J.)]으로부터 시판되어 구입할 수 있다.

[0167] 본 개시내용의 특정 구현예에서, 활성화된 링커는 숙신이미딜카보네이트-PEG, PEG-부티르알데하이드, PEG-펜트알데하이드, PEG-아미도-프로피온알데하이드, PEG-우레타노-프로피온알데하이드, 및 PEG-프로필알데하이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0168] 하기 부문은 폐길화 기술의 사용에 대해 더욱 자세히 기술하며, [전체적으로, Shashwat, S. et al.(2012) Journal of Drug Delivery Vol. 2012, Article ID 103973 (17 pp)를 참고하라).

[0169] 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 단백질의 폐길화

[0170] 생분자는 또 다른 분자와 공유적 결합을 통해 보호될 수 있고 이러한 방법은 생접합으로서 언급된다. 생물학적 및 합성 기원 둘 다로부터의 많은 중합체를 사용하여 생분자를 보호한다. 상기 수득한 중합체 생접합체는 감소된 면역원성, 감소된 항체 인지, 증가된 생체내 체류 시간, 증가된 약물 표적화 특이성 및 개선된 약력학과 같은 개선된 성질을 특징으로 한다. 약물 전달 적용에 통상적으로 사용되는 중합체는 폴리(N-(2-하이드록시프로필) 메타크릴아미드) (PHPMA), 폴리(올리고에틸렌 글리콜 메틸 에테르 메타크릴레이트) (POEGMA), 폴리(D,L-락틱-코-글리콜산) (PLGA), 폴리(글루탐산) (PGA), 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드) (PNIPAM), 폴리(N,N'-디에틸 아크릴아미드) (PDEAM), 폴리스티렌 및 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)를 포함한다.

[0171] 폴리에틸렌 글리콜[폴리(에틸렌 글리콜)]에 대해 가장 통상적인 약어인 PEG는 반복하는 에틸렌 글리콜 유닛으로 구성되는 화학적 화합물을 지칭한다. 구성 단량체 또는 모 분자(에틸렌 글리콜, 에틸렌 옥사이드 또는 옥시에틸렌)를 어떻게 선택하는지에 의존하여), PEG 화합물은 또한 PEO (폴리에틸렌 옥사이드) 및 POE (폴리옥시에틸렌)로서 공지되어 있다. 폐길화의 적용은 펩티드, 효소, 항체 단편, 뉴클레오티드 및 작은 유기 분자로 연장될 수 있다. PEG는 에폭사이드 환 상의 수산화 이온의 친핵성 공격에 의해 개시되는 에틸렌 옥사이드의 음이온 중합에 의해 합성된다. 폴리펩티드 변형을 위해 가장 유용한 것은 모노메톡시 PEG (mPEG)이다.

[0172] PEG는 생체적합성이고, 면역원성, 항원성 및 독성이 부재이고, 수용성이고 다른 유기 용매는 용이하게 신체로부터 제거되고 용액 중 높은 이동성을 가져 중합체가 생접합을 위해 선택되게 한다(문헌참조: Pasut, G., et

al.(2006) Polymer Therapeutics I, 192, 95-134). PEG와 생분자의 성공적인 접합은 중합체 뿐만 아니라 화학적 구조, 분자량, 입체 장애 및 생분자의 반응성에 의존한다. 생접합체 합성은 -COOH, -OH, -SH, 또는 -NH₂와 같은 반응성 또는 작용성 그룹을 소유하기 위해 화학적 실체 둘다 (즉, 생체활성제 및 중합체)를 요구하고; 따라서, 접합체를 형성하기 위한 합성 방법은 그룹의 보호 또는 탈보호를 포함한다. 생분자와 PEG의 접합은 이의 생리화학적 성질, 특히 크기의 변형을 유도하고 신체 중 치료학적 제제의 시스템 체류를 증가시킨다. 이것은 또한 특정 세포내 표적에 도달하도록 하는 세포내이입에 의해 모이어티가 세포막을 통과하도록 할 수 있다 [Khandare, J. and Minko, T. (2006) Progress in Polymer Science 31(4):359-97]. 더욱이, PEG는 내부 투여 용에 대해 US FDA에 의해 안전한 것으로서 일반적으로 간주되는 소수의 합성 중합체 중 하나이다[참조: Bhattarai, N. et al.(2005) Macromolecular Bioscience 5(2):107-11].

[0173] 상기 주지된 바와 같이, 폐길화는 비변형된 형태 보다 여러 유의적이고 독특한 약리학적 이점을 부여할 수 있고, 이는 개선된 약물 용해도; 감소된 투여 횟수, 독성 및 신장 제거율; 연장된 순환계 수명, 증가된 약물 안정성; 단백질용해 분해로부터 증진된 보호; 감소된 면역원성 및 항원성; 및 생물학적 활성의 최소 상실을 포함한다 [문헌참조: 예를 들어, Kozlowski, A. and Harris, J. M. (2001) Journal of Controlled Release 72(1-3):217-24]. 폐길화된 단백질의 감소된 신장 제거는 단백질 표면 전하의 명백한 차폐 및 단량체 유닛 당 2개 내지 3개의 물 분자와 협력하는 PEG 분자의 능력으로 인한 접합된 생성물의 증가된 수력학적 부피에 기여할 수 있다.

[0174] 이들 약리학적 이점에 추가로, 폐길화는 이의 정전기 및 소수성 성질을 포함하는, 모 단백질의 생리화학적 성질을 실질적으로 변형시킬 수 있다. 폐길화는 신장으로부터 간 경로로 전환시킴에 의해 분자의 제거 경로에 상당히 영향을 준다. 분자의 조직-기관 분포 프로파일은 또한 폐길화에 의해 크게 영향을 받고, 여기서, 폐길화된 단백질은 바람직하게 주변 분배에 따른다 (Hamidi, M. et al.(2006) Drug Delivery 13(6): 399-4090).

[0175] 단백질 접합

[0176] 폐길화 과정은 "제1 세대 폐길화"로서 언급되는, 비-특이적 무작위 접합으로부터 "제2 세대 폐길화"로서 언급되는 부위 특이적 접합 방법으로 개발되었다. 폐길화 특이성에서 증가는 주로 단백질 내 특정 작용성 모이어티와 반응할 수 있는 PEG 분자의 보다 특이적 작용화의 가용성에 기여할 수 있다. 상기 결과는 비-특이적 무작위 접합을 통해 수득된 것들 보다 개선된 생성물 프로필을 갖는 조절되고, 널리 정의된 접합된 생성물이다.

[0177] 프로테오믹 및 다른 생물학적 방법에서 PEG의 정확하고 다재다능한 적용은 특이적 작용성 그룹으로 활성화된 한정된 길이(MW)의 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 가용성에 의존한다. 정제된 PEG는 가장 통상적으로, 광범위하게 또는 좁게 한정된 분자량 (MW) 범위에서 상이한 올리고머 크기의 혼합물로서 시판되고 있다. 예를 들어, "PEG 600"은 통상적으로 600g/mol의 평균 MW를 갖는 올리고머의 혼합물을 포함하는 제제를 지칭한다. 유사하게, "PEG 10000"은 10,000 g/mol의 평균 MW를 갖는 PEG 분자(n = 195 내지 265)의 혼합물을 지칭한다.

[0178] 아민 접합. 아민 기를 포함하는 커플링 반응은 일반적으로 2개 유형 - 아실화 또는 알킬화이다. 단백질의 표면 상에 다수의 접근가능한 1급 아미노 기의 가용성 때문에, 이의 작용성 그룹을 통한 접합은 가장 광범위하게 사용되는 방법이다. 라이신, 오르니틴 및 N-말단 아미노 기는 폐길화와 함께 가장 통상적으로 활성화되는 약물 전달이다 [참고: Bruckdorfer, T., (2008, (Spring)) Drug delivery with PEGylation. European Biopharmaceutical Review 96-104]. 초기 아민 접합 전략은 흔히 비-특이적 폐길화를 유도한다. 나트륨 시아노보로하이드라이드를 사용한 환원 알킬화를 통한 아미노 기와 안정한 안정한 2차 아민 연결체를 형성할 수 있는 PEG 알데하이드 유도체(예를 들어, PEG-프로피온알데하이드)의 도입은 이전의 N-알킬 접합 전략 보다 큰 특이성 및 선택성을 유도한다. 알데하이드 기의 반응성은 아민 그룹의 친핵성에 의존하기 때문에, 반응은 단지 배지의 pH가 상기 특정 아민 말단의 pKa 근처이거나 초과인 경우에만 일어난다. 따라서, 반응 배지의 pH를 조절함에 의해, 생성물 프로필의 이질성은 크게 감소될 수 있다. 숙신이미드 유도체를 사용한 단일치환된 프로피온산 및 부탄산 PEG 유도체의 도입 및 이들의 후속적 활성화는 아민 접합에서의 상당한 개선에 기여하였다.

[0179] 대조적으로, N-말단 아미노산의 아실화는 안정한 아마이드 및 우레탄 연결체의 형성을 유도한다. 숙신이미딜 숙시네이트 (PEG-SS), 숙신이미딜 카보네이트 (PEG-SC), 벤조트리아졸 카보네이트 (PEG-BTC), 페닐 카보네이트, 카보닐이미다졸 및 티아졸리딘-2-티온으로 활성화된 PEG 유도체는 N-말단 아실화 경로 후 단백질 접합에서 광범위하게 사용되었다. PEG-NHS 에스테르는 용이하게 가용하고 이는 친핵성과 반응성이어서 NHS 이탈 그룹을 방출하고 아실화된 생성물을 형성한다. NHS는 생접합 합성에서 생리학적 pH 반응에서 보다 높은 반응성 때문에 아민 커플링을 위해 선택된다. 특히, NHS 에스테르로 활성화된 카복실 기는 아민 친핵성과 고도로 반응성이고 펩티드 및 단백질에서 매우 통상적인 실체이다. 반응성 하이드록실 기를 함유하는 중합체 (예를 들어, PEG)는 무수 화

합물을 수득하기 위해 변형될 수 있는 반면 mPEG는 무수물로 아세틸화되어 유리된 카복실레이트 그룹으로 에스테르 종결을 형성한다.

- [0180] 티올 접합. 많은 커플링 방법은 이중-2작용성 시약을 사용하여 하나의 단백질 상의 변형된 라이신 잔기를 제2 단백질 상의 설프하이드릴 기에 커플링시키고, 여기서, 상기 변형된 라이신 잔기는 말레이미드 또는 보호된 설프하이드릴 그룹과 함께, NHS 작용성 그룹을 포함하는 이중-2작용성 시약의 사용으로부터 비롯된다. 형성된 연결체는 이황화 가교 또는 티오에테르 결합이고, 이는 도입된 그룹이 각각 설프하이드릴 또는 말레이미드인지에 의존한다. 제2 단백질 상의 티올 그룹은 내인성 유리된 설프하이드릴일 수 있거나 라이신 잔기의 변형에 의해 화학적으로 도입될 수 있다.
- [0181] 천연 또는 유전학적으로 가공된, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기와 선택적 티올 접합은 부위-특이적 접합 방법을 제공한다. PEG-말레이미드, 비닐설푼, 요오도아세트아미드, 및 오르토포리딜 디설푼과이드와 같은 티올-선택적 유도체는 티오에테르 또는 이황화 연결체의 형성을 통한 시스테인 접합을 위해 사용된다. PEG-말레이미드를 사용한 예는 5 및 20 kDa 유도체를 사용한 트리코산틴 (TCS), 5, 20 및 40kDa 유도체를 사용한 항종양 괴사 인자- α -scFv 단편 (항-TNF- α -scFv) 및 5, 10 및 20 kDa 유도체를 사용한 재조합 스타필로키나제 (Sak)의 유전학적으로 도입된 시스테인 잔기에서의 것들을 포함한다. 그러나, 단일 시스테인 잔기의 제한된 가용성 및 유전학적으로 가공된 시스테인의 도입으로부터 비롯되는 단백질 이량체화의 기회 때문에, 이것은 통상적으로 사용되는 전략이 아니다. 대안적 전략은 단백질에서 쌍 형성 시스테인과 함께 존재하는 보다 높은 수의 접근가능한 이황화 연결체를 이용한다.
- [0182] 산화된 탄수화물 또는 N-말단 접합. 당단백질 또는 N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기에 존재하는 탄수화물 그룹의 효소적 (예를 들어, 글루코스 옥시다제) 또는 화학적 (예를 들어, 나트륨 과옥소산염) 산화는 반응성 알데하이드 기를 생성하고 이는 추가로 PEG 하이드라지드 또는 아민 유도체와 접합될 수 있다. 상기 방법은 거의 4% 탄수화물을 함유하는 면역글로불린 G (IgG)를 폐길화시키기 위해 사용되어왔고, 여기서 IgG는 먼저 과옥소산염으로 산화되고 이어서 mPEG-하이드라지드 유도체와 접합되었다.
- [0183] 트랜스글루타미나제 (TGase) - 매개된 효소 접합. 부위-특이적 폐길화를 위한 대안적 접합 전략은 글루타민 (Gln) 말단과 PEG 1급 아미노 기 간의 TGase-촉매된 아실 전달 반응을 사용하여 글루타민 잔기를 표적화한다. 아포미오글로빈 (apoMb), α -락트알부민 (α -LA), 인간 성장 호르몬 (hGH), 인간 과립구 콜로니-자극 인자(hG-CSF) 및 인간 인터류킨-2 (hIL-2)의 PEG 아민을 사용한 TGase-촉매 선택적 폐길화는 상기 기술을 사용하였다.
- [0184] 다양한 접합 화학물질. 글리코페길화로서 공지된 부위-특이적 방법은 효소적 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) O-글리코실화에 이어서 PEG 살리실산 유도체를 사용한 도입된 O-글리칸의 폐길화를 사용한다. 또한, 클릭 화학 전략은 아지드 말단으로 부착시키기 위한 PEG-알킨 유도체를 사용한 유전학적으로 변형된 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (SOD)의 부위-특이적 모노-폐길화를 구동하기 위해 사용될 수 있다.
- [0185] 예시적 폐길화 조건. PEG 유도체를 단백질에 커플링시키는 다양한 수단은 본 분야의 숙련자에게 공지되어 있으며 [참고: 일반적으로, Abuchowski, A., et al.(1984) Cancer Biochem. Biophys. 7, 175; Sartore, L., et al.(1991) Appl. Biochem. Biotechnol. 27, 45; 및 USP 5,824,784], 본원의 기타 부분에 기술되어 있다. 하기는 예시적 조건이고, 이들은 본 발명과 연계하여 사용될 수 있는 조건을 제한하는 것으로 해석되지 말아야 한다.
- [0186] PEG-NHS 유도체와 단백질 아민 (PEG-NHS + 단백질-NH₂)과의 커플링 - 예시적 조건 번호 1: 50 mM 포스페이트 완충제 (pH 7.2), 4°C, 시간; 예시적 조건 번호 2: 보레이트-포스페이트 완충제 (pH 8.0), 25°C, 2시간.
- [0187] PEG-알데하이드 유도체와 단백질의 NH₂ 기와의 커플링 (PEG-알데하이드 + 단백질-NH₂): 나트륨 시아노보로하이드라이드 (10 eq.), 4°C, 20 시간.
- [0188] PEG-말레이미드 유도체와 단백질의 SH 기와의 커플링 (PEG-말레이미드 + 단백질-SH): 100 mM 포스페이트 완충제 (pH 6.5), 4°C, 4 시간.
- [0189] PEG-NH₂ 유도체와 단백질의 COOH 기와의 커플링 (PEG-NH₂ + 단백질-COOH): 50mM 포스페이트 완충제 (pH 7.2), WSC (2 eq.), 4°C, 10 시간.
- [0190] PEG-p-니트로페닐옥시카르보닐 유도체와 단백질의 NH₂ 기와의 커플링 (PEG-NP + 단백질-NH₂): 붕산염-포스페이트 완충제 (pH 8.0~8.3), r.t., 밤새.

[0191] **가역적 폐길화**

[0192] 많은 경우에, 단백질 폐길화의 개선된 생리화학적 성질은 PEG 접합 동안에 형성된 영구적 연결체로부터 일어나는 시험관내 단백질 활성에서 실질적 감소에 의해 오프셋된다. 결과로서, 가역적 (또는 방출가능한) 폐길화 전략이 개발되었고 여기서, 단백질은 절단가능한 연결체를 통해 PEG 유도체에 부착되고 이는 미리 결정된 동력학적 비율로 생체내 단백질을 방출시킨다. 사용된 가역적 PEG 유도체의 예는 비신, 올리고-락트산 에스테르, 숙신산 에스테르, 디설파이드 및 β -알라닌 에스테르 링커를 포함한다[문헌참조: 예를 들어, Filpula, D. and Zhao, H. (2008) Advanced Drug Delivery Reviews 60(1): 29-49].

[0193] **PEG의 구조**

[0194] 다수의 상업적 실체는 다양하게 다재다능한 작용성 그룹을 갖는 상이한 시리즈의 PEG 유도체를 제공한다. 예를 들어, NOF America Corp. (White Plains, NY)은 출발 물질로서 고도로 정제된 메톡시 PEG; 단백질, 효소 및 다른 약제학적 물질 간의 가교-결합을 위해 가장 인기있는 유도체인 2-작용성 PEG; 다중-아암 PEG (여기서, 다양한 작용성 그룹은 다중-아암 (예를 들어, 4 및 8개 아암) PEG의 말단에 부착되어 있다); 말단 작용성 그룹으로서 말레이미드, 알데하이드, 아민 및 활성화된 NHS를 갖는 2 아암-, 3 아암- 및 4-아암 분지형 유형의 활성화된 PEG를 포함하는 분지형 PEG; 이중작용성 PEG(여기서, 헤테로-유형 활성화된 PEG의 사용이 PEG 각각의 말단 상으로 접합된 상이한 분자를 유도한다); 및 정확한 거리로 이격되어 있는 2개의 반응성 그룹을 위치시킨다는 이점을 갖는 포크된 PEG를 포함하는 단일-작용성 선형 PEG를 제공한다.

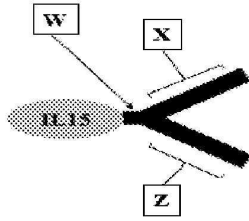
[0195] 추가의 예로서, JenKem Technology USA (Plano, TX)는 다수의 카테고리의 PEG를 제공하고, 이는 절단가능한 링커를 갖는 선형 NHS PEG (예를 들어, 메톡시 PEG 숙신이미딜 숙시네이트; 메톡시 PEG 숙신이미딜 글루타레이트); 선형 카보네이트 PEG (예를 들어, 메톡시 PEG 숙신이미딜 카보네이트; 메톡시 PEG 니트로페닐 카보네이트); 안정한 링커를 갖는 Y-형 분지형 NHS PEG; 안정한 링커를 갖는 선형 모노사카라이드 NHS PEG(예를 들어, 갈락토스 PEG NHS 에스테르; 글루코스 PEG NHS 에스테르); 안정한 링커를 갖는 선형 메톡시 NHS PEG (예를 들어, 메톡시 PEG 숙신이미딜 카복시메틸; 메톡시 PEG 숙신이미딜 부타노에이트; 메톡시 PEG 숙신이미딜 헥사노에이트; 메톡시 PEG 숙신이미딜 숙신아미드; 메톡시 PEG 숙신이미딜 글루타르아미드); Y-형 분지형 카복시 PEG; 선형 카복시 PEG (예를 들어, 메톡시 PEG 카복실; 메톡시 PEG 헥산산); 아민 폐길화를 위한 동중-2작용성 PEG (예를 들어, NHS PEG NHS; 카복실 PEG 카복실); 및 카복실 또는 NHS로 작용화된 이중-2작용성 PEG를 포함한다.

[0196] 시판되거나 당업자에 의해 합성될 수 있는 임의의 PEG 모이어티가 본원에서 고려된다. 예를 들어, EP1967212는 단백질 접합을 위해 가용한 말단 COOH 그룹과 함께 4개의 mPEG 분지를 갖는 분지형 PEG 유도체를 기재한다. 상기 분지형 PEG 유도체는 IFN- α 2b, 재조합 스트렙토키나제 (r-SK), 에리트로포이에틴 (EPO), 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF) 및 상피 성장 인자 (EGF)를 포함하는 다수의 치료학적 단백질과 NHS 활성화를 통해 성공적으로 접합되었고 유사한 분자 질량의 2개의 분제된 구조로부터 수득된 것들과 비교하여 이들 제품에 대한 개선된 약리학적 성질이 관찰되었다.

[0197] 본 개시내용의 일부 구현에는 분지형 PEG IL-15 분자를 고려하며, 여기서 IL-15는 1 초과 PEG에 공유적으로 부착된다. IL-15의 아미노산 잔기 상의 아미노 기(예: N-말단에서 알파 아미노 기)에 둘 이상의 PEG 분자를 공유 결합시키는 임의의 적합한 분지형 PEG 링커가 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명에 의해 고려되는 분지형 링커는 두 개 또는 세 개의 PEG 분자를 함유한다. 예로서, 분지형 링커는 가수분해적으로 안정하고, 상기한 바와 같이, 아미노산 잔기의 아미노 기와 반응하는 활성화 잔기(예: 알데하이드 그룹)를 함유하는 선형 또는 분지형 지방족 그룹일 수 있고; 분지형 링커의 지방족 그룹은 2 내지 12개의 탄소를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 지방족 그룹은, 예를 들어, 3개의 탄소원자 각각에 3개의 PEG 분자(즉, 총 9개의 PEG 분자) 및 3급-부틸의 네 번째 탄소 상에 반응성 알데하이드 잔기를 함유할 수 있는 t-부틸일 수 있다.

[0198] 추가의 예시적인 분지형 PEG 링커는 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 제5,643,575호, 제5,919,455호, 제7,052,868호, 및 제5,932,462호. 당업자는, 예를 들어, 반응성 알데하이드 잔기의 첨가로 분지형 PEG 링커에 대한 변형을 제조할 수 있다.

[0199] 본 개시내용의 목적을 위하여, 분지형 PEG IL-15 분자는 하기 화학식에 의하여 나타낼 수 있으며, 하기 식 중, w는 1개 초과 PEG에 공유적으로 부착된 링커이다.



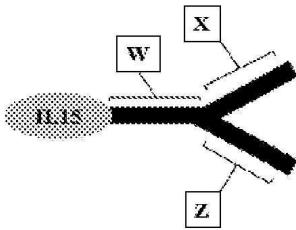
[0200]

[0201]

본 개시내용은 다중 PEG 크기 분포를 갖는 분지형 PEG IL-15 분자를 고려하며, 상기 분지형 PEG IL-15 분자는 치료적으로 허용가능한 MW이다. 일부 구현예에서, x의 MW는 z의 MW와 동일하고, 다른 구현예에서 x 및 z의 MW는 상이하다. 분지형 PEG IL-15 분자에서, PEG의 전체 크기는 링커의 MW가 x 및 z의 것과 비교하여 미소량이므로, x의 MW + z의 MW에 기여할 수 있다. 예를 들어, 20kDa PEG를 포함하는 분지형 PEG IL-15 분자에 대해, x 및 z는 각각 일부 구현예에서 10kDa일 수 있고, x는 5kDa일 수 있고, z는 다른 구현예에서 ~15 kDa일 수 있다. 링커 및 PEG의 예는 본원에 기재된다.

[0202]

본원의 개시내용의 다른 구현예는 다중-아암 PEG IL-15 분자를 고려한다. 상기 구현예에서, IL-15는 선택적으로 링커를 통해 하나 이상의 PEG 모이어티로 공유적으로 부착되고, 상기 모이어티 중 적어도 하나는 하나 이상의 분지를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중-아암 PEG IL-15 분자는 하기식으로 나타낼 수 있다:



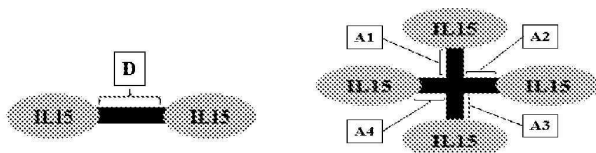
[0203]

[0204]

상기 식 중, x, w 및 z는 PEG의 성분을 나타내고, IL-15는 선택적으로 링커를 통해 w에 공유적으로 부착된다. 본 개시내용은 다중 PEG 크기 분포를 갖는 다중-아암 PEG IL-15 분자를 고려하며, 상기 다중-아암 PEG IL-15 분자는 치료적으로 허용가능한 MW이다. 일부 구현예에서, x, w 및 z의 MW는 동량이다. 기타 구현예에서, x 및 z 각각의 MW는 동량이고, 그리고 w의 MW는 상이하다. 또 다른 추가 구현예에서, x 및 w 각각의 MW는 동량이고, 그리고 z의 MW는 상이하다. 추가 구현예에서, w 및 z 각각의 MW는 동량이고, 그리고 x의 MW는 상이하다. 또 다른 추가의 구현예에서, x, w 및 z의 MW는 상이하다. 다중-아암 PEG IL-15 분자에서, PEG의 전체 크기 (MW)는 x, w 및 z 성분들의 Mw의 합에 기여할 수 있다. 예를 들어, 50 kDa PEG를 포함하는 다중-아암 PEG IL-15 분자의 일부 구현예에서, x 및 z는 각각 20 kDa일 수 있으며, 그리고 w는 10 kDa일 수 있으며; 기타 구현예에서, x 및 w는 각각 20 kDa일 수 있으며, 그리고 z는 10 kDa일 수 있으며; 그리고 추가 구현예에서, w 및 z는 각각 20 kDa일 수 있으며, 그리고 x는 10 kDa일 수 있다. 링커 및 PEG의 예는 본원에 기재된다.

[0205]

본원의 개시내용의 기타 구현예는 다중-작용성 PEG IL-15 분자를 고려한다. 상기 구현예에서, 2개 이상의 IL-15는 선택적으로 링커를 통해 2개 이상의 IL15와 복합체를 형성하는 PEG에 공유적으로 부착된다. 2-작용성 분자는 PEG를 통해 서로 공유적으로 연결된 2개의 IL-15를 포함하고, 3-작용성 분자는 서로 PEG를 통해 공유적으로 연결된 3개의 IL-15를 포함하고, 4-작용성 분자는 서로 PEG 등을 통해 공유적으로 연결된 4개의 IL-15를 포함한다. 본원의 개시내용의 목적을 위해, 다중-작용성 PEG IL-15 분자는 하기식으로 나타낼 수 있다:



[0206]

[0207]

예를 들어, 2-작용성 PEG IL-15 분자에 대해, D는 임의의 치료학적으로 허용되는 MW의 PEG를 통해 각각의 IL-15에 공유적으로 부착된 PEG이다. PEG는 링커를 통해 IL-15 중 하나 또는 둘 다에 선택적으로 부착될 수 있다. 링커 및 PEG의 예는 본원에 기재된다.

[0208]

추가 예시로서, 4-작용성 PEG IL-15 분자에 대하여, A₁A₂A₃A₄ 복합체는 각 IL-15에 공유적으로 부착된 임의의 치

료적으로 허용가능한 MW의 PEG를 나타낸다. PEG는 링커를 통해 IL-15 중 하나 이상에 선택적으로 부착될 수 있다. 각각의 A₁, A₂, A₃ 및 A₄는 동일하거나 상이한 MW일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 40 kDa PEG에 대해 각각의 A₁, A₂, A₃ 및 A₄는 10 kDa일 수 있고; A₁ 및 A₂는 둘다 15 kDa일 수 있고, A₃ 및 A₄는 둘다 5 kDa일 수 있고; A₁은 2.5 kDa일 수 있고, A₂는 7.5 kDa일 수 있고, A₃은 10 kDa일 수 있고, A₄는 20 kDa 동일 수 있다. 링커 및 PEG의 예는 본원에 기재된다.

[0209] **폐길화 방법 고려**

[0210] 단백질 접합을 위해 사용되는 1차 폐길화 방법은 광범위하게 2개의 유형 - 용액 상 배치 방법 및 온-컬럼 공급-배치 방법으로 분류될 수 있다 [참조: Fee, C. J. and Van Alstine, J. M. (2006) Chemical Engineering Science 61(3)924-39). M.]. 통상적으로 채택된 배치 방법은 바람직하게 4~6 °C의 온도에서 적합한 완충제 중에서 함께 시약을 혼합하고, 이어서 이의 생리화학적 성질을 기준으로 하는 적합한 기술을 사용한 목적하는 생성물을 분리하고 정제함을 포함하고, 상기 기술은 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 이온 교환 크로마토그래피 (IEX), 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 막 또는 수성 2-상 시스템을 포함한다. 배치 방법은 통상적으로 다수의 접합을 유도하고 다수의 PEG 이성질체를 생성시키는 반응 종과 생성물 간에 장기적 접촉을 필요로 한다. 이중성 생성물 혼합물이 생성되고, 이는 미반응된 출발 물질, 가수분해된 활성화제 및 다양한 정도의 접합을 갖는 광범위한 폐길화된 생성물을 구성한다. 연장 다단계 정제 및 다운스트림 프로세싱은 흔히 목적하는 생성물을 분리하기 위해 요구되고 이는 전체 수율을 상당히 감소시킨다. 반응 혼합물로부터 목적하는 폐길화된 단백질을 분리하는 비용과 함께 치료학적 단백질의 고비용은 생성물이 극히 고가이도록 하여 흔히 상기 접근법의 적용을 제한한다.

[0211] 여러 온-컬럼(on column) 폐길화 기술은 생성물 프로파일 및 접합의 특이성을 개선시킬 목적으로 사용되었다. 예를 들어, 부위-특이적 고체상 펩티드 폐길화가 사용될 수 있고, 여기서, 펩티드 서열은 링크 아마이드 MBHA-수지 상으로 테더링되고 측쇄 라이신 또는 아스파르트산을 통해 PEG 유도체와 접합되고; 이후, 모노 폐길화된 펩티드는 트리플루오로아세트산 (TFA)을 사용하여 수지로부터 절단될 수 있다. 그러나, 고체상 합성은 대형 단백질 및 고체-연결된 폐길화된 생성물의 방출을 위해 요구되는 TFA와 같은 강한 화합물에 대해서 실행되지 않고 결과로서 상기 방법의 적용은 흔히 고도의 민감성 종과는 실행할 수 없다. 대안적으로, 단백질과 이온 교환 수지 간의 이온 교환 상호작용을 사용하여 목적하는 폐길화된 종을 분리할 수 있다.

[0212] 다른 온-컬럼 폐길화 방법은 크기 배제 반응 크로마토그래피 (SERC)를 포함하고, 이는 다공성 비드로 팩킹된 칼럼을 통한 이들의 상이한 선형 속도를 기준으로 다양한 분자 크기의 종을 분리시키는데 SEC의 원리를 적용한다. 상기 방법에서, 활성화된 PEG 및 단백질은 칼럼 내 일시적 동일계 이동 반응 구간을 형성하고, 여기서, 상기 폐길화된 단백질은 시약 중 어느 하나 보다 큰 크기를 갖고 반응 구간의 앞으로 이동함에 따라 활성화된 PEG와 접촉하는 체류 시간을 제한하고 과-폐길화를 감소시킨다.

[0213] **약물 전달 시스템으로서 PEG 전구약물 접합체**

[0214] 2개의 주요 방법을 사용하여 중합체 약물을 목적하는 위치(들)로 표적화한다: 수동 표적화 및 능동 표적화. 이들 접근법은 항암 약물을 종양 또는 암 세포로 전달하기 위해 가장 통상적으로 사용된다.

[0215] 수동 약물 표적화. 수동 표적화는 변형된 환경 조건으로 인해 표적화된 부위 외부로 약물을 방출시키는 중합체와 약물을 접합시킴에 의해 표적화된 부위로의 약물의 전달을 수행한다. 종양 및 신체의 많은 염증 영역은 과침투성 혈관계 및 불량한 림프구 배수를 갖고, 이는 수동적으로 종양 및 염증 신체 영역으로 거대분자의 증가된 체류를 제공한다. 증진된 침투성 및 체류 (EPR) 효과로서 언급되는 상기 현상은 주로 종양 또는 염증 영역으로의 전구약물의 축적으로 인해 수동 표적화를 위해 사용된다. 고분자량 캐리어와 공유적으로 커플링된 저분자량 약물은 방해된 림프구 배출로 인해 비효율적으로 제거되고 따라서 종양에 축적된다. EPR 효과는 종양 내 보다 높은 축적율의 약물로 인한 수동 표적화 능력을 증진시키고 상기 전구약물은 높은 생물유용성 및 낮은 시스템 독성을 제공하는 약물 분자를 서서히 방출시킨다. [참고: 예컨대, Haag, R. and Kratz, F (2006) Angewandte Chemie-Int'l Ed, 45(8): 1198-1215].

[0216] 능동 표적화. 능동 표적화 방법은 특이적 생물학적 쌍 (예를 들어, 리간드-수용체, 항원-항체 및 효소-기질) 간의 상호작용을 기준으로 한다. 이것은 다양한 접합 화학에 의해 전구약물과 함께, 세포 표면 상의 특이적 수용체에 결합하는 표적화제를 부착시킴에 의해 성취된다. 가장 광범위하게 사용되는 표적화 모이어티는 펩티드 리간드, 당 잔기, 항체, 및 특정 수용체에 특이적인 압타머, 셀렉틴, 항원 및 표적화된 세포 또는 기관에서 발현되는 mRNA이다. 표적화 모이어티와 이들의 표적 분자 간의 상호작용은 전구약물 자체의 내재화 (여기서, 상기

약물은 세포내이입 후 세포내에서 절단된다) 또는 표적화된 세포로의 약물의 내재화 (여기서, 상기 약물은 다양한 세포내이입 및 식세포작용 경로에 의해 세포의 절단된다)에 의한 약물의 취득을 유도한다 [문헌참조: 예를 들어, Dharap, S. (2003) Journal of Controlled Release 91(1-2): 61-73].

[0217] 링커의 전구약물 접합체로의 혼입. 용어 “링커” 및 “스페이서”는 중합체 기술 스페이스에 사용되고 달리 지적되지 않는 경우 본원의 개시내용의 목적을 위해 상호교환적으로 사용된다. 알라닌, 글리신 및 소형 펩티드와 같은 아미노산 스페이서는 공유 접합 및 생분해능에 대한 이들의 화학적 다재다능으로 인해 가장 통상적으로 사용된다. 숙신이미딜을 함유하는 이중-2작용성 커플링제가 또한 사용되었다. 링커의 상세한 기재는 본원의 다른 곳에 제시된다.

[0218] 전구약물의 구성에서, 링커는 약물을, 크라우딩 효과를 감소시키고, 반응성을 증가시키고, 입체 장애를 감소시키기 위해 중합체 (예를 들어, PEG)와 융합시키기 위해 사용될 수 있다 [문헌 참조: Khandare, J. and Minko, T. (2006) Progress in Polymer Science 31(4): 359-97]. 링커의 사용은 또한 리간드-단백질 결합을 증진시켜 다중 결합 부위를 제공할 수 있다. 바람직한 링커는 접합체 수술 동안에 안정하고 적당한 작용 부위에서 생체활성 제제를 방출시킬 수 있다.

[0219] 치료적 및 예방적 용도

[0220] 본원의 개시내용은 광범위한 질환, 장애 및/또는 병태, 및/또는 이의 증상의 치료 또는 예방에서 본원에 기재된 IL-15 폴리펩티드 (예를 들어, PEG-IL-15)의 용도를 고려한다. 특별한 용도가 이후 상세히 기재되지만, 본 발명이 그렇게 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 특별한 질환, 장애 및 병태의 일반적인 카테고리가 이후 기재되지만, 질환, 장애 및 병태 중의 일부는 하나 이상의 카테고리의 구성원일 수 있고, 나머지는 임의의 개시된 카테고리의 구성원이 아닐 수도 있다.

[0221] 이하 보다 상세히 논의된 바와 같이, IL-15는 하기와 관련된 질환, 장애 및 병태에서 역할을 하는 것으로 나타났다: 면역 및 염증성 기능(예: 자가면역 관련 질환(예: 류마티스성 관절염), 유육종증, 염증성 장 질환 및 이식 거부); 암(예: 백혈병, 림프 증식성 장애 및 고형 종양); 및 감염성 질환(예: HIV). [참고: 예컨대, Fehniger, et al., Blood 97(1) (Jan 1, 2001)].

[0222] 면역 및 염증성 병태. 일부 구현예에서, 본 발명은 면역계의 억제 및 면역 관련 질환, 장애 및 병태의 치료를 고려한다. 본원에 사용된 바와 같이, “면역성 질환”, “면역성 병태”, “면역성 장애”, “염증성 질환”, “염증성 병태”, “염증성 장애” 등과 같은 용어는 광범위하게 임의의 면역- 또는 염증성 관련 상태(예: 병리학적 염증 및 자가면역 질환)를 포함하는 것을 의미한다. 상기 상태는 종종 다른 질환, 장애 및 병태와 불가분하게 뒤얽혀 있다. 예로서, “면역성 병태”는 감염 (급성 및 만성), 종양 및 면역계에 의한 박멸에 저항하는 암을 포함하여, 암, 종양 및 혈관 신생과 같은 증식성 병태를 의미할 수 있다.

[0223] 본원에 기재된 IL-15 펩티드는 야생형 IL-15 및 IL-15 수용체 복합체 사이의 상호작용의 결과로서 통상적으로 발생하는 하나 이상의 세포성 이벤트를 억제하기에 유효한 양의 투여를 통해 면역 기능을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 IL-15 펩티드를 암호화하는 핵산 분자 또는 본원에 기재된 IL-15 펩티드를 발현시키는 재조합 세포가 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, IL-15 펩티드는 야생형 IL-15와 유사한 친화도를 갖는 IL-15 수용체 복합체에 결합하지만, 세포 신호 전달을 활성화시키지 못한다. IL-15 펩티드가 야생형 IL-15와 효과적으로 경쟁하고, IL-15 신호전달에 대한 반응에 통상적으로 관련된 이벤트를 억제하는 것이 유리하다.

[0224] 예를 들어, 염증성 사이토카인에 의해 유발될 수 있는 면역- 및 염증 관련 질환, 장애 및 병태의 비제한적인 목록에는, 관절염(예: 류마티스성 관절염), 유육종증, 신부전, 루푸스, 천식, 건선, 대장염, 궤장염, 알레르기, 수술 합병증(예: 염증성 사이토카인이 치유를 방지하는 경우), 빈혈 및 섬유근육통을 포함한다. 만성 염증과 관련될 수 있는 다른 질환 및 장애는 알츠하이머 질환, 울혈성 심부전증, 뇌졸중, 대동맥판막협착증, 동맥경화증, 골다골증, 파킨슨 질환, 감염, 염증 장 질환 (예를 들어, 크론 질환 및 궤양성 대장염), 알레르기 접촉 피부염 및 다른 습진, 전신 경화증, 이식 및 다발성 경화증을 포함한다. IL-15 분자가 (예를 들어, 현재의 치료법의 제한으로 인해) 특히 효과적일 수 있는 상기한 질환, 장애 및 병태의 일부는 이후에 보다 상세히 기재된다.

[0225] 본 발명의 IL-15 폴리펩티드는 염증성 장 질환(IBD)의 치료 및 예방에 특히 효과적일 수 있다. IBD는 크론병(CD) 및 궤양성 대장염(UC)을 포함하고, 이들 둘 다는 위장관의 어느 부분에도 영향을 미칠 수 있는 특발성 만성 질환이고, 여러 가지 부작용과 관련되고, 장기적인 UC 환자는 결장암 발병 위험이 증가한다. 현재의 IBD 치료는 염증 증상을 조절하는 것을 목표로 하고, 특정 제제(예: 코르티코스테로이드, 아미노살리실레이트 및 표준 면역억제제(예: 사이클로스포린, 아자티오프린 및 메토트렉세이트))는 제한된 성공을 경험했지만, 장기간 치료

는 간 손상(예: 섬유증 또는 간경변) 및 골수 억제를 유발할 수 있고, 환자는 종종 그러한 치료에 대해 불응성이 된다.

[0226] 통상적인 면역 매개 만성 피부 질환의 집합체인 건선은, 미국에서 450만 명 이상의 사람에게 영향을 미치고, 이중 150만 명은 중간 내지 중증 형태의 질환을 갖는 것으로 간주된다. 또한, 건선 환자의 10% 이상은 관절 주위의 뼈와 결합 조직을 손상시키는 건선성 관절염이 발병한다. 건선의 기본 생리학의 이해가 개선되어, 예를 들어, 질환의 염증성 성질의 원인인 T 림프구와 사이토카인의 활성을 표적화하는 제제의 도입을 초래하였다. 그러한 제제는 ENBREL (에타네르셉트), REMICADE (인플릭시맵) 및 HUMIRA (아달리무맵)을 포함하는 TNF- α 억제제(또한, 류마티스성 관절염(RA)을 치료하는데 사용됨); 및 AMEVIVE (알레파셉트) 및 RAPTIVA (에팔리주맵)와 같은 T-세포 억제제를 포함한다. 이러한 제제 중 일부는 특정 환자 집단에서 어느 정도 효과적이지만, 모든 환자를 효과적으로 치료하는 것으로 나타난 제제는 없었다.

[0227] 일반적으로 관절의 막 내벽(활막)에서 만성 염증을 특징으로 하는 류마티스성 관절염(RA)은 미국 인구의 약 1% (약 210만 명)에 영향을 미친다. 염증 과정에서 TNF- α 및 IL-1을 포함하는 사이토카인의 역할에 대한 더 깊은 이해는 새로운 부류의 질환 변형성 항류마티스성 약물(DMARD)의 개발 및 도입을 가능하게 했다. 제제 (이중 일부는 다른 적응증에 대한 치료 양식과 중복된다)는 ENBREL (에타네르셉트), REMICADE (인플릭시맵), HUMIRA (아달리무맵) 및 KINERET (아나킨라)를 포함한다. 이들 제제 중의 일침가 증상을 완화하고, 구조적 손상의 진행을 억제하며, 특별환자 집단에서 신체 기능을 향상시키지만, 개선된 효능, 보완 작용 메커니즘 및 낮은/덜 심각한 부작용을 갖는 대안의 제제가 여전히 필요하다.

[0228] 장기 및 조직의 이식 거부는 특정 상황에서 IL-15 관련 성분을 포함하는 것으로 밝혀졌다. 거부 반응은 타고난 면역 반응의 성분과 함께 세포성 면역과 체액성 면역 둘 다에 의해 매개되는 적응성 면역 반응이다. 상이한 유형의 이식 장기 및 조직은 종종 거부 메커니즘의 균형이 상이하다. 신장, 심장, 골수, 피부 및 혈액은 이식 거부에 가장 빈번하게 관련되는 장기 및 조직이다. 이식 거부 반응의 치료는 종종 거부 반응의 의학적 카테고리 (예: 초급, 급성 또는 만성)에 의해 결정된다.

[0229] 면역억제 요법은 이식 거부 반응을 치료하는 주요 수단을 구성한다. 치료는 일반적으로 코르티코스테로이드(예: 프레드니손)로 개시된다. 병용 요법은 통상적으로 칼시뉴린 억제제(예: 사이클로스포린 및 타크로리무스) 및 항증식성 제제(예: 아자티오프린)의 첨가를 수반한다. 특별한 면역 성분에 특이적인 항체는 면역억제 요법에 첨가될 수 있고; 항체 치료제는 모노클로날 항-IL-2R α 수용체 항체(예: 다클리주마드) 및 모노클로날 항-CD20 항체(예: 리툽시맵)를 포함한다. 많은 상황에 도움이 되지만, IL-15 관련 제제와 같은 대체 치료 양식이 필요하다.

[0230] 뇌 및 척수에서 미엘린의 여러 부분의 염증 및 흉터를 포함하는 심각하게 쇠약하게 하는 자가면역 질환인 다발성 경화증(MS)을 앓고 있는 피험체는, 현재 치료가 단지 증상을 완화시키거나 장애의 진행을 지연시키기 때문에, 본원에 기재된 IL-15 폴리펩티드에 의해 특히 도움을 받을 수 있다.

[0231] IL-15의 상승된 혈청 수준은 C형 간염 유발 간 질환 동안 및 간 경변 및 만성 간염에서 관찰되었다. IL-15 수준은 특히 간세포 암종을 앓고 있는 피험체에서 상승된다.

[0232] 유사하게, IL-15 폴리펩티드는 환자의 사고, 기억 및 언어 과정을 심각하게 손상시키는 뇌 장애인 알츠하이머병(AD); 예를 들어, 비정상적인 운동, 강직 및 진전을 특징으로 하는 CNS의 진행성 장애인 파킨슨병(PD); 및 진성 당뇨병과 같은 신경퇴행성 장애를 앓고 있는 피험체에게 특히 유리할 수 있다. 이러한 장애는 진행성이고 쇠약하게 하며, 어떤 치료제도 이용 가능하지 않다.

[0233] 암 및 관련 병태. 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 IL-15 분자(예: 펩티드)는 IL-15 수용체를 발현시키는 세포의 바람직하지 않은 증식을 갖는 피험체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 IL-15 펩티드를 암호화하는 핵산 분자 또는 본원에 기재된 IL-15 펩티드를 발현시키는 재조합 세포가 투여될 수 있다. IL-15가 항증식 효과를 발휘하는 작용의 기본 메커니즘의 이해가 본 발명의 실행하는데 필요하지 않지만, 세포 증식은 보체 유도 세포 분해 또는 항체 의존성 세포 독성에 의해 억제될 수 있다.

[0234] 본원에 기재된 IL-15 펩티드는 암, 예를 들어, 자궁, 경부, 유방, 전립선, 고환, 위장관(예: 식도, 구인두, 위, 소장 또는 대장, 결장 또는 직장), 신장, 신장 세포, 방광, 뼈, 골수, 피부, 두경부, 간, 담낭, 심장, 폐, 췌장, 타액선, 부신, 갑상선, 뇌(예: 신경교종), 신경절, 중추 신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS)의 암, 및 조혈계 및 면역계(예: 비장 또는 흉선)의 암을 포함하는 증식성 병태 또는 장애를 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 또한, 예를 들어, 면역원성 종양, 비면역원성 종양, 휴면 종양, 바이러스 유도 암(예: 상피 세포 암, 내피 세포 암, 편평 세포 암종 및 유두종 바이러스), 선암종, 림프종(예: 피부 T-세포 림프종(CTCL), 암

중, 흑색종, 백혈병, 골수종, 육종, 기형종, 화학 유발 암, 전이 및 혈관 신생을 포함하는 다른 암 관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

- [0235] 특정 구현예에서, 종양 또는 암은 하기와 같다: 결장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 신경교아종 또는 백혈병(예: HTLV-1 - 매개된 성인 T-세포 백혈병). 용어(들) 암 관련 질환, 장애 및 병태의 사용은 암과 직접 또는 간접적으로 관련된 상태를 광범위하게 지칭하는 것을 의미하고, 예를 들어, 혈관 신생 및 형성 장애와 같은 전암 상태를 포함한다.
- [0236] 일부 구현예에서, 본 발명은 IL-15 분자 및 예가 본원의 다른 곳에 제시되어 있는적어도 하나의 추가의 치료제 또는 진단제를 사용하여 증식성 병태, 암, 종양 또는 전암 상태를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0237] 바이러스성 및 박테리아성 병태. 바이러스성 및 세균성 질환, 장애 및 병태에서 IL-15의 역할에 대한 관심이 증가하고 있다. IL-15는 이의 수용체 결합 활성 및 다른 인자에 따라 자극 및 억제 효과 둘 다를 생산하는 것으로 가정되었다.
- [0238] 인간 면역결핍 바이러스(HIV)와 관련하여, IL-15는 IL-2의 작용을 모방하는 이의 능력을 통해 두 가지 모순되는 효과를 갖는다. 하나의 효과는 면역 기능의 잠재적으로 유익한 향상이고, 다른 효과는 HIV 복제의 잠재적으로 유해한 활성화이다. 이러한 반대 효과는 또한 다른 바이러스 관련 장애에도 존재한다. IL-15와 바이러스 부하의 변동 사이에서 밀접한 시간적 상관관계가 관찰되었다.
- [0239] 본 발명은 IL-15로의 치료가 유익할 수 있는 임의의 바이러스 질환, 장애 또는 병태의 치료 및/또는 예방하는데 IL-15 폴리펩티드의 사용을 고려한다. 고려되는 바이러스성 질환, 장애 및 병태의 예는 엡스타인-바 바이러스, B형 간염, C형 간염, HIV, 단순 포진 바이러스 및 시토메갈로바이러스(CMV)를 포함한다.
- [0240] IL-15는 최근에 특정 세균성 및 다른 침입성 감염과 관련되어 있다. 예를 들어, 보고는 예를 들어, 살모넬라 및 플라스모디움 팔시파룸에 의해 유발되는 감염 전 제조합 IL-15의 투여가 유기체에 대한 숙주 방어 및 유기체의 제거를 개선시킴을 지적한다.
- [0241] **약제학적 조성물**
- [0242] 본 발명의 IL-15 폴리펩티드는 피험체에게 투여하기에 적합한 조성물의 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 이러한 조성물은 IL-15 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 “약제학적 조성물”이다. 특정 구현예에서, IL-15 폴리펩티드는 치료적으로 허용되는 양으로 존재한다. 약제학적 조성물은 본 개시내용의 방법에 사용될 수 있다; 따라서, 예를 들면, 약제학적 조성물은 본 명세서에서 기재된 치료적 및 예방적 방법 및 용도를 실시하기 위해 피험체에 생체외 또는 생체내로 투여될 수 있다.
- [0243] 본 발명의 약제학적 조성물은 의도된 투여 방법 및 투여 경로에 적합하도록 제형화될 수 있고; 예시적인 투여 경로는 본원에 제시된다. 또한, 약제학적 조성물은 본 발명에 의해 고려되는 질환, 장애 및 병태를 치료하거나 예방하기 위해 본원에 기재된 다른 치료적 활성제 또는 화합물과 함께 사용될 수 있다.
- [0244] 약제학적 조성물은 통상적으로 본 발명에 의해 고려된 치료적 유효량의 IL-15 폴리펩티드 및 하나 이상의 약제학적으로 및 생리학적으로 허용되는 제형화제를 포함한다. 적합한 약제학적으로 허용가능한 또는 생리학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제는, 비제한적으로, 산산화제 (예를 들면, 아스코르브산 및 소듐 바이셀페이트), 보존제 (예를 들면, 벤질 알코올, 메틸 파라벤, 에틸 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조에이트), 유효제, 현탁화제, 분산제, 용매, 충전제, 팽화제, 세제, 완충제, 비히클, 희석제, 및/또는 아췌반트를 포함한다. 예를 들어, 적합한 비히클은 가능하게는 비경구 투여용 약제학적 조성물에 통상적인 다른 재료로 보충된 생리 식염수 용액 또는 시트레이트 완충 식염수일 수 있다. 중성의 완충된 염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 염수는 추가의 예시적인 비히클이다. 당업자는 본원에서 고려되는 약제학적 조성물 및 투여 형태에 사용될 수 있는 다양한 완충제를 용이하게 인식할 것이다. 전형적인 완충제는, 약제학적으로 허용가능한 약산, 약 염기 또는 이의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예로서, 완충제 성분은 수용성 재료, 예를 들어, 인산, 타르타르산, 락트산, 석신산, 시트르산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 글루탐산 및 이의 염일 수 있다. 허용가능한 완충제는, 예를 들면, Tris 완충제, N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄설향산) (HEPES), 2-(N-모폴리노)에탄설향산 (MES), 2-(N-모폴리노)에탄설향산 나트륨 염 (MES), 3-(N-모폴리노)프로판설향산 (MOPS), 및 N-트리스[하이드록시메틸]메틸-3-아미노프로판설향산 (TAPS)을 포함한다.
- [0245] 약제학적 조성물이 제형화된 후, 이는 액제, 현탁제, 겔제, 유제, 고체로서, 또는 탈수되거나 동결건조된 분말

로서 멸균 바이알 속에 저장될 수 있다. 이러한 제형은 즉시 사용 가능한 형태, 사용 전에 재구성을 필요로 하는 동결건조 된 형태, 사용 전에 희석을 필요로 하는 액체 형태 또는 다른 허용 가능한 형태로 보관될 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 단일-사용 용기 (예를 들면, 단일-사용 바이알, 앰플, 주사기, 또는 자동 주사기 (예를 들면, EpiPen[®]에 유사한 것))로 제공되고, 반면에 다중-사용 용기 (예를 들면, 다중-사용 바이알)가 다른 구현예에서 제공된다. 임플란트(예: 이식 가능한 펌프) 및 카테터 시스템, 저속 주사 펌프 및 장치를 포함하는 임의의 약물 전달 장치가 IL-15를 전달하기 위해 사용될 수 있고, 이들 모두는 당업자에게 익히 공지되어 있다. 일반적으로 피하 또는 근육내로 투여되는 데포 주사제는 또한 정의된 기간에 걸쳐 본원에 개사된 폴리캡티드를 방출시키는데 이용될 수 있다. 데포 주사제는 일반적으로 고체- 또는 오일 기반이고, 일반적으로 본원에 제시된 제형화 성분 중 적어도 하나를 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 데포 주입의 가능한 제형 및 용도에 대해 익숙하다.

[0246] 상기 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 오일성 현탁제 형태일 수 있다. 이 현탁제는 위에 언급된 적절한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 공지 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 제제는 또한 무-독성의 비경구적으로-허용가능한 희석제 또는 용매 속의 멸균 주사가 가능한 액체 또는 현탁제, 예를 들어, 1,3-부탄디올 중의 액체일 수 있다. 이용될 수 있는 허용가능한 희석제, 용매 및 분산매는 물, 링거액, 등장의 염화나트륨 용액, 크레모포어 ELTM (BASF, 뉴저지 주 파시파니) 또는 포스페이트 완충된 염수 (PBS), 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 및 적합한 이들의 혼합물을 포함한다. 추가로, 멸균 비휘발성 오일(fixed oil)은 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 사용된다. 이 목적을 위하여, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하는, 임의의 자극없는 고정된 오일이 이용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주사제의 제조에서 용도를 찾는다. 특정한 주사가 가능한 제형의 장기적인 흡수는 흡수를 지연하는 제제(예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴)를 포함함에 의해 달성될 수 있다.

[0247] 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물은 경구 용도에 적합한 형태, 예를 들어, 정제, 캡슐제, 트로키제, 로젠지제, 수성 또는 유성 현탁액, 분산 가능한 분말 또는 과립제, 에멀전, 경질 또는 연질 캡슐제, 또는 시럽, 용액, 마이크로비드 또는 엘릭시르로서 존재할 수 있다. 경구 용도로 의도된 약제학적 조성물은 약제학적 조성물을 제조하기 위한 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 따라서 제조될 수 있고, 이러한 조성물은 약제학적으로 우아하고 맛이 좋은 제제를 제공하기 위해 하나 이상의 제제, 예를 들어, 감미제, 향미제, 착색제 및 방부제를 함유할 수 있다. 정제, 캡슐 등은 정제 제조를 위해 적합한 비독성 약제학적으로 허용가능한 부형제와 혼합된 활성 성분을 함유한다. 이러한 부형제는, 예를 들어, 탄산칼슘, 탄산나트륨, 락토스, 인산칼슘 또는 인산나트륨과 같은 희석제; 과립화제 및 봉해제, 예를 들어, 옥수수 전분 또는 알긴산; 결합제, 예를 들어, 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 및 윤활제, 예를 들어, 마그네슘스테아레이트, 스테아르산 또는 활석일 수 있다.

[0248] 경구 투여에 적합한 정제, 캡슐 등은 위장관에서 봉해 및 흡수를 지연하고 그렇게 함으로써 지속 작용을 제공하기 위한 공지된 기술에 의해 코팅되거나 또는 코팅되지 않을 수 있다. 예를 들면, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 시간 지연 물질이 사용될 수 있다. 이들은 또한 조절 방출을 위한 삼투요법 정제를 형성하기 위해 당해 기술에서 공지된 기술에 의해 코팅될 수 있다. 추가 제제는 투여된 조성물의 전달을 조절하기 위해 생분해성 또는 생체적합성 입자 또는 폴리머성 기질 예컨대 폴리에스테르, 폴리아민 산, 하이드로겔, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리무수물, 폴리글리콜 산, 에틸렌-비닐아세테이트, 메틸셀룰로오스, 카복시 메틸셀룰로오스, 프로타민 설페이트, 또는 락타이드/글라이콜라이드 코폴리머, 폴리락타이드/글라이콜라이드 코폴리머, 또는 에틸렌비닐아세테이트 코폴리머를 포함한다. 예를 들면, 경구 제제는 각각 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 또는 폴리 (메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐의 사용에 의해 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐 안에, 또는 콜로이드 약물 전달 시스템 안에 포획될 수 있다. 콜로이드성 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노-캡슐, 마이크로구형체, 마이크로비드, 및 수중유 에멀전, 교질입자, 혼합된 교질입자, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 상기 언급된 제형의 제조방법은 당업자에게 자명할 것이다.

[0249] 경구용 제형은 또한 경질 젤라틴 캡슐로서 제공될 수 있고, 여기서, 활성 성분은 불활성 고체 희석제, 예를 들어, 탄산칼슘, 인산칼슘, 카올린, 미세결정성 셀룰로오스, 또는 연질 젤라틴 캡슐과 혼합되고, 여기서, 상기 활성 성분은 물 또는 오일 매질, 예를 들어, 땅콩유, 액체 파라핀 또는 올리브유와 혼합된다.

[0250] 수성 현탁제는 이의 제조를 위해 적합한 부형제와 혼합된 활성 물질을 함유한다. 이러한 부형제는 현탁제, 예를 들어 카복시메틸셀룰로오스나트륨, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 알긴산나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 트래거캔스검 및 아카시아검이며; 분산제 또는 습윤제는 천연 유래 포스파타이드, 예를 들어 레시틴, 또는

산화알킬렌의 지방산과의 축합 생성물, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 산화에틸렌의 장쇄 지방족 알코올과의 축합생성물, 예를 들어, 헵타데카에틸렌옥시세탄올, 또는 산화에틸렌의 지방산 및 헥시톨로부터 유래된 부분적 에스터와의 축합 생성물, 예컨대 폴리옥시에틸렌 솔비톨 모노올레이트, 또는 산화에틸렌의 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분적 에스터와의 축합 생성물, 예를 들어, 폴리에틸렌 솔비탄 모노올레이트일 수 있다. 수성 현탁제는 또한 하나 이상의 보존제를 함유할 수 있다.

[0251] 오일 현탁제는 활성 성분을 식물성 오일, 예를 들어, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 또는 코코넛유 또는 미네랄 오일, 예를 들어, 액체 파라핀 중에 현탁시킴에 의해 제형화될 수 있다. 오일성 현탁제는 증점제, 예를 들어, 밀납, 경질 파라핀 또는 세틸 알콜을 함유할 수 있다. 상기 제시된 것들과 같은 감미제, 및 향미제가 맛이 좋은 경구 제제를 제공하기 위해 첨가될 수 있다.

[0252] 물의 첨가에 의한 현탁액의 제조에 적합한 분산성 분말 및 과립은 분산제 또는 습윤제, 현탁제 및 하나 이상의 보존제와 혼합하여 활성 화합물을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제가 본원에 예시된다.

[0253] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 또한 수중유 에멀전 형태일 수 있다. 유성 상은 식물성 오일, 예를 들어, 올리브유 또는 땅콩유, 또는 미네랄 오일, 예를 들어, 액체 파라핀 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 천연 발생 검, 예를 들어, 아카시아 검 또는 트라가칸트 검; 천연 발생 포스포티드, 예를 들어, 대두, 레시틴 및 지방산으로부터 유래되는 에스테르 또는 부분 에스테르; 헥시톨 무수물, 예를 들어, 소르비탄 모노올레이트; 및 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트일 수 있다.

[0254] 제형은 또한, 체내 유래의 빠른 분해 또는 제거에 대해 화합물을 보호할 담체, 예컨대 제어방출형 제형 (임플란트, 리포솜, 하이드로겔, 전구약물 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 시간 지연 물질, 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트 단독, 또는 왁스와 의 조합된 물질이 사용될 수 있다.

[0255] 본 발명은 직장 투여용 좌제 형태로 IL-15 폴리펩티드의 투여를 고려한다. 이들 좌제는 통상의 온도에서는 고체이지만 직장 온도에서는 액체여서 직장에서 용융되어 약물을 방출시키는 적합한 비-자극 부형제와 약물을 혼합함에 의해 제조될 수 있다. 그와 같은 물질은, 비제한적으로, 코코아 버터, 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0256] 본 발명에 의해 고려된 IL-15 폴리펩티드는 현재 공지되어 있거나 장래에 개발될 임의의 다른 적합한 약제학적 조성물(예: 비내 또는 흡입용 스프레이)의 형태로 존재할 수 있다.

[0257] 제형 중의 폴리펩티드 또는 이의 단편의 농도는 광범위하게 가변적일 수 있고(예: 약 0.1 중량% 미만 내지 통상적으로 약 2 중량%, 또는 적어도 약 2 중량% 내지 20 중량% 내지 50 중량% 이상), 일반적으로, 예를 들어, 선택된 특별한 투여 방식에 따라서 유체 부피, 점도 및 피험체 기반 인자에 기초하여 주로 선택된다.

[0258] 투여 경로

[0259] 본 발명은 임의의 적합한 방식으로 IL-15 분자, 및 이의 조성물의 투여를 고려한다. 적합한 투여 경로는 비경구 (예를 들면, 근육내, 정맥내, 피하 (예를 들면, 주사 또는 임플란트), 복강내, 낭내, 관절내, 복강내, 뇌내 (실질세포내) 및 뇌심실내), 경구, 비강, 질, 설하, 안구내, 직장, 국소 (예를 들면, 경피), 설하 및 흡입을 포함한다. 일반적으로 피하 또는 근육내 투여되는 데포 주사제는 또한 규정된 시간 동안 본원에 개시된 IL-15 분자를 방출시키는데 이용될 수 있다.

[0260] 본 발명의 특별한 구현에는 비경구 투여를 고려하고, 추가의 구현예에서, 비경구투여는 피하이다.

[0261] 조합 요법

[0262] 본 발명은 하나 이상의 활성 치료제(예: 사이토카인) 또는 다른 예방적 또는 치료적 방식(예: 방사선)과 병용하여 IL-15 분자의 사용을 고려한다. 이러한 병용 요법에서, 다양한 활성제는 종종 상이한 상보적 작용 메커니즘을 갖는다. 이러한 병용 요법은 하나 이상의 제제의 용량 감소를 가능하게 하여 하나 이상의제제와 관련되는 부작용을 감소시키거나 제거함으로써 특히 유리할 수 있다. 또한, 이러한 병용 요법은 기본적인 질환, 장애 또는 병태에 대해 상승작용부피 치료 또는 예방 효과를 가질 수 있다.

[0263] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "조합"은 별도로 투여될 수 있는, 예를 들면, (예를 들면, 키트로 제공될 수 있는 것과 같이) 개별의 투여를 위해 별도로 제형화될 수 있는 요법 및 단일 제형으로 함께 투여될 수 있는 (즉, "공동-제형") 요법을 포함하는 것으로 지칭된다.

- [0264] 특정 구현예에서, IL-15 폴리펩티드 및 하나 이상의 활성 치료제 또는 다른 예방적 또는 치료적 양식은 순차적으로 투여되거나 적용될 수 있고, 예를 들어, 하나의 제제는 하나 이상의 다른 제제 이전에 투여된다. 다른 구현예에서, IL-15 폴리펩티드 및 하나 이상의 활성 치료제 또는 다른 예방적 또는 치료적 양식은 동시에 투여되고, 예를 들어, 둘 이상의 제제는 동시에 또는 거의 동시에 투여되고; 둘 이상의 제제는 둘 이상의 개별 제형으로 존재할 수 있거나 단일 제형(즉, 공동-제형)으로 조합될 수 있다. 2종 이상의 제제가 순차적으로 또는 동시에 투여되는지 여부에 무관하게, 이들은 본 개시내용의 목적을 위해 조합하여 투여되는 것으로 간주된다.
- [0265] 본 발명의 IL-15 폴리펩티드는 상황하에 적합한 임의의 방식으로 적어도 하나의 다른 (활성) 제제와 병용하여 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제 및 본 발명의 적어도 하나의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 일정 기간 동안 유지된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나 이상의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단되는(예: 피험체가 안정한 경우) 한편, 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 일정한 투여 레지멘으로 유지된다. 추가의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단되는(예: 피험체가 안정한 경우) 한편, 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 증가된다(예: 고용량, 더 빈번한 투여 또는 더 긴 치료 레지멘). 또 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 유지되고, 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 감소되거나 중단된다(예: 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 레지멘). 또 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료 및 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 감소되거나 중단된다(예: 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 레지멘).
- [0266] 면역 및 염증성 병태. 본 발명은 면역- 및/또는 염증 관련 질환, 장애 및 병태 뿐만 아니라 이와 관련된 장애를 IL-15 분자 및 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 진단제로 치료하고/하거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0267] 병용 요법에 유용한 치료제의 예는 하기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다:비스테로이드성 항염증성 약물(NSAID), 예를 들어, 아스피린, 이부프로펜 및 다른 프로피온산 유도체(알미노프로펜, 베크사프로펜, 부클로식산, 카프로펜, 펜부펜, 페노프로펜, 플루프로펜, 플루르비프로펜, 인도프로펜, 케토프로펜, 미로프로펜, 나프록센, 옥사프로진, 피르프로펜, 프라노프로펜, 수프로펜, 티아프로펜산 및 티옥사프로펜), 아세트산 유도체(인도메타신, 아세메타신, 알클로페낙, 클리다낙, 디클로페낙, 펜클로페낙, 펜클로식산, 펜티아작, 푸이로페낙, 이부페낙, 이속세팍, 옥스피낙, 술린닥, 티오피낙, 톨메틴, 지도메타신 및 조메피락), 페남산 유도체(플루페남산, 메클로페남산, 메페남산, 니플름산 및 톨페남산), 비페닐카복실산 유도체(디플루니살 및 플루페니살), 옥시캄(이속시캄, 피록시캄, 수독시캄 및 테독시칸), 살리실레이트(아세틸 살리실산, 설파살라진) 및 피라졸론(아파존, 베즈피페릴론페프라존, 모페부타존, 옥시펜부타존, 페닐부타존). 다른 조합은 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 억제제를 포함한다.
- [0268] 조합을 위한 다른 활성제는 스테로이드, 예를 들어, 프레드니솔론, 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 베타메타손, 텍사메타손 또는 하이드로코르티손을 포함한다. 이러한 조합은, 스테로이드의 하나 이상의 부작용이 필요한 스테로이드 투여량을 감소시킴으로써 감소되거나 심지어 제거될 수 있기 때문에, 특히 유리할 수 있다.
- [0269] 예를 들어, 류마티스성 관절염을 치료하기 위한 조합에 사용될 수 있는 활성제의추가의 예는 사이토카인 억제성 항염증성 약물(들)(CSAID); 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자의 항체 또는 이의 길항제, 예를 들어, TNF, LT, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 또는 PDGF를 포함한다.
- [0270] 활성제의 특정 조합은 자가면역 및 후속적 염증 캐스케이드에서 상이한 시점에서 간섭할 수 있고 TNF 길항제, 예를 들어, 키메라, 인간화된 또는 인간 TNF 항체, REMICADE, 항-TNF 항체 단편 (예를 들어, CDP870), 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 이의 유도체, p75TNFR1gG (ENBREL.) 또는 p55TNFR1gG (LENERCEPT), 가용성 IL-13 수용체 (sIL-13), 및 또한 TNF α -전환 효소 (TACE) 억제제를 포함하고; 유사하게, IL-1 억제제 (예를 들어, 인터류킨-1-전환 효소 억제제)가 효과적일 수 있다. 다른 조합은 인터류킨 11, 항-P7s 및 p-셀렉틴 당단백질 리간드(PSGL)를 포함한다. 본원에 기재된 IL-15 폴리펩티드와의 조합에 유용한 제제의 다른 예는 인터페론- β 1a (AVONEX); 인터페론- β 1b (BETASERON); 코파손; 고압 산소; 정맥내 면역글로불린; 클라브리빈; 및 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자에 대한 항체 또는 이의 길항제(예: CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체)를 포함한다.
- [0271] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.
- [0272] 암 및 관련 병태. 본 발명은 증식성 병태; 암, 종양 또는 전암 질환, 장애 또는 병태를 IL-15 분자 및 하나의 추가의 치료제 또는 진단제로 치료하고/하거나 예방하는 방법을 제공한다.

- [0273] 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 사이클로스포스파미드; 알킬 설폰에이트, 예를 들어, 부설판, 임프루설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카보구온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리에틸올로멜라미메를 포함하는 에틸렌아민 및 메틸아멜라민; 질소 머스타드, 예를 들어, 키오람부실, 클로르나파진, 클로로포스포미드, 에스트라무스틴, 이포스포미드, 메클로르에타딘, 메클로르에타딘 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어, 카무손, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예를 들어, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 칼리키아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사산물, 예를 들어, 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 메토크세이트, 프레토프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시딘, 6-아자우리딘, 카보푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예를 들어, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스포미드 글리코시드; 아미놀레블린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미딘; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미토크산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리메틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노시드(Ara-C); 사이클로스포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탈셀; 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토크세이트; 백금 및 백금 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드(VP-16); 이포스포미드; 미토마이신 C; 미토크산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT11; 토포아이소머라제 억제제; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 중의 어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0274] 화학요법제는 또한 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는항호르몬제, 예를 들어, 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, 오나프리스톤 및 토레미펜을 포함하는 항에스트로겐제; 및 항안드로겐제, 예를 들어, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 상기 중의 어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 특정 구현예에서, 병용 요법은 호르몬 또는 관련 호르몬제의 투여를 포함한다.
- [0275] IL-15 폴리펩티드와 조합하여 사용될 수 있는 추가의 치료 양식은 사이토카인 또는 사이토카인 길항제, 예를 들어, IL-12, INF α , 또는 항-상피 성장 인자 수용체, 방사선 요법, 또 다른 종양 항원에 대한 모노클로날 항체, 모노클로날 항체와 독소의 복합체, T-세포 보조제, 골수 이식, 또는 항원 제시 세포(예: 수지상 세포 요법)를 포함한다. 백신(예를 들어, 가용성 단백질로서 또는 단백질을 암호화하는 핵산으로서)도 또한 본원에 제공된다.
- [0276] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.
- [0277] 바이러스성 및 박테리아성 병태. 본 발명은 바이러스성 질환, 장애 및 병태 뿐만 아니라 이와 관련된 장애를 IL-15 분자 및 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 진단제(예: 하나 이상의 항바이러스성 제제 및/또는 바이러스 요법과 관련되지 않는 하나 이상의 제제)로 치료하고/하거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0278] 이러한 병용 요법은 다양한 바이러스 라이프-사이클 단계를 표적화하고, 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 상이한 작용 메커니즘을 갖는 항바이러스제를 포함한다: 바이러스 비코팅의 억제제(예: 아만타딘 및 리만티딘); 역전사 효소 억제제(예: 아시클로비르, 지도부딘 및 라미부딘); 인테그라제를 표적화하는 제제; 전사 인자의 바이러스 DNA에의 부착을 차단하는 제제; 번역에 영향을 미치는 제제(예: 안티센스 분자)(예: 포미비르센); 번역/리보자임 기능을 조절하는 제제; 프로테아제; 바이러스 어셈블리 조절제(예: 리팜피신); 및 바이러스 입자의 방출을 억제하는 제제(예: 자나미비르 및 오셀타미비르). 특정 바이러스 감염 (예를 들어, HIV)의 치료 및/또는 예방은 흔히 항바이러스 제제 그룹 ("각테일")을 필요로 한다.

- [0279] IL-15 폴리펩티드와 조합하여 사용하기 위해 고려되는 다른 항바이러스제는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 아바카비르, 아데포비르, 아만타딘, 암프레나비르, 암플리젠, 아르비돌, 아타자나비르, 아트리플라, 보세프레비네르테트, 시도포비르, 콤비비르, 다루나비르, 텔라비르딘, 디다노신, 도코산올, 에독수딘, 에파비렌즈, 엠트리시타빈, 엔푸비르티드, 엔테카비르, 팜시클로비르, 포삼프레나비르, 포스카르네트, 포스포네트, 간시클로비르, 이바시타빈, 이무노비르, 이독수리딘, 이미쿠이모드, 인디나비르, 이노신, 다양한 인터페론 (예를 들어, 페그인터페론 알파-2a), 로피나비르, 요오비리드, 마라비록, 모록시딘, 메티사존, 넬피나비르, 네비라핀, 넥사비르, 펜시클로비르, 페라미비르, 플레코나릴, 포도필로톡신, 칼테그라비르, 리바비린, 리토나비르, 피라미딘, 사쿠이나비르, 스타부딘, 텔라프레비르, 테노포비르, 티프라나비르, 트리플루리딘, 트리지비르, 트로만타딘, 트루바다, 발라시클로비르, 발간시클로비르, 비크리비록, 비다라빈, 비라미딘, 및 잘시타빈.
- [0280] 막대형 그람 음성 세균의 살모넬라(Salmenella) 속의 IL-15 치료는 현재 개발중인 백신과 조합하여 가장 효과적인 것으로 간주된다. 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum) 기생충의 치료를 위한 병용 요법과 관련하여, 항말라리아 약물(예: 콜로르퀸) 및 아르테미시니니스가 IL-15 펩티드와의 병용 요법에 효과적일 수 있다.
- [0281] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.
- [0282] **투여**
- [0283] 본 발명의 IL-15 폴리펩티드는, 예를 들어, 투여 목적(예: 목적하는 분해도); 제형이 투여되는 피험체의 연령, 체중, 성별 및 건강 및 신체 조건; 투여 경로; 및 질환, 장애, 상태 또는 이의 증상의 성질에 의존하는 양으로 피험체에게 투여될 수 있다. 투여 레지멘은 투여되는 제제(들)와 관련되는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도를 고려할 수 있다. 효과적인 투여량 및 투여 레지멘은, 예를 들어, 안전성 및 용량 증가 시험, 생체내 연구(예: 동물 모델), 및 당업자에게 공지된 다른 방법으로부터 용이하게 예측될 수 있다.
- [0284] 일반적으로, 투여 변수는, 투여량이 피험체에게 비가역적으로 독성일 수 있는 양(최대 허용 용량(MTD)) 미만이고, 피험체에서 측정가능한 효과를 생성하기 위해 필요한 양 이상이어야 한다고 지시한다. 이러한 양은, 예를 들어, 투여 경로 및 다른 인자를 고려하여 ADME와 관련된 약동학적 및 약력학적 변수에 의해 예측된다.
- [0285] 유효한 용량 (ED)은 이것을 섭취한 피험체의 일부 분획에서 치료적 반응 또는 목적 효과를 생성하는 제제의 용량 또는 양이다. 제제의 “중간 유효 투여량” 또는 ED50은 그것이 투여되는 집단의 50%에서 치료 반응 또는 목적하는 효과를 생성하는 제제의 투여량 또는 양이다. ED50은 일반적으로 제제의 효과의 합리적인 기대치의 척도로서 사용되지만, 임상적이 모든 관련 인자를 고려하여 적절하다고 간주할 수 있는 투여량일 필요는 없다. 따라서, 일부 상황에서, 유효량은 계산된 ED50 이상이고, 다른 상황에서 유효량은 계산된 ED50 미만이고, 또 다른 상황에서 유효량은 계산된 ED50과 동일하다.
- [0286] 또한, 본 발명의 IL-15 분자의 유효 투여량은, 피험체에게 1회 이상의 투여량으로투여되는 경우, 건강한 피험체에 비해 목적하는 결과를 생성하는 양일 수 있다. 예를 들어, 특별한 장애를 앓고 있는 피험체의 경우, 유효 투여량은 그 장애의 진단 변수, 척도, 마커 등을 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 90% 초과까지 향상시키는 양일 수 있고, 여기서 100%는 정상 피험체가 나타내는 진단 변수, 척도, 마커 등으로서 정의된다. 본원에 기재된 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 필요한 IL-15 분자의 양은 당해 분야에 공지된 IL-15 활성 검정에 의해 결정될 수 있는 집합된 단백질의 IL-15 활성을 기본으로 한다.
- [0287] IL-15 분자의 치료적 유효량은 약 0.01 내지 약 100 단백질 μg /체중 kg/일, 약 0.1 내지 20 단백질 μg /체중 kg/일, 약 0.5 내지 10 단백질 μg /체중 kg/일, 또는 약 1 내지 4 단백질 μg /체중 kg/일의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, IL-15 분자의 치료적 유효량은 약 1 내지 16 단백질 μg /체중 kg/일의 범위일 수 있다. 본 발명은 전달하기 위해 연속 주입에 의한 IL-15 분자의 투여, 예를 들어, 약 50 내지 800 단백질 μg /체중 kg/일을 고려한다. 주입 속도는, 예를 들어, 부작용 및 혈구수의 평가에 기초하여 변할 수 있다.
- [0288] 경구 제제의 투여를 위해, 조성물은 1.0~1000 밀리그램의 활성 성분, 특히 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0, 또는 1000.0 밀리그램의 활성 성분을 함유하는 정제, 캡슐 등의 형태로 제공될 수 있다.
- [0289] 특정 구현예에서, 개시된 IL-15 폴리펩티드의 투여량은 "단위 복용 형태"에 함유된다. 어구 "단위 복용 형태"는

물리적으로 별개의 단위들을 언급하고, 각 단위는 단독으로 또는 하나 이상의 추가 제제와 병용하여 목적 효과를 생성하기에 충분한, 본 개시내용의 IL-15 폴리펩티드의 소정된 양을 함유한다. 단위 투여 형태의 변수는 특별한 제제 및 달성되는 효과에 의존한다는 것이 이해된다.

[0290] **키트**

[0291] 본 발명은 또한 IL-15, 및 이의 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 고려한다. 키트는 일반적으로 이하 기재되는 바와 같이 다양한 성분을 수용하는 물리적 구조의 형태이고, 예를 들어, 본원에 기재된 방법을 실시하는데 이용될 수 있다.

[0292] 키트는 (예를 들어, 멸균 용기에 제공된) 본원에 개시된 하나 이상의 IL-15 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 이는 피험체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물의 형태일 수 있다. IL-15 폴리펩티드는 사용할 준비가 되거나, 예를 들어, 투여 전에 재구성 또는 희석을 필요로 하는 형태로 제공될 수 있다. IL-15 폴리펩티드는 사용자에게 의해 재구성될 필요가 있는 형태로 존재하고, 키트는 또한 IL-15 폴리펩티드와 함께 또는 별도로 포장된 완충제, 약제학적으로 허용가능한 부형제 등을 포함할 수 있다. 병용 요법이 고려될 경우, 키트는 여러 제제를 별도로 함유할 수 있거나, 그들은이미 키트로 조합될 수 있다. 키트의 각 성분은 개별 용기 내에 포함될 수 있고, 다양한 용기 모두는 단일 패키지 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 키트는 내부에 수용된 성분을 적절히 유지시키기 위해 필요한 조건(예; 냉동 또는 동결)을 위해 설계될 수 있다.

[0293] 키트는 그 안의 성분들에 대한 식별 정보 및 이들의 사용에 대한 설명 (예를 들면, 작용 기전, 약동학 및 약리학, 부작용, 사용금지 사유, 등을 포함하는, 활성 성분(들)의 투여 변수, 임상 약리학)을 포함하는 표지 또는 패키징 삽입물을 함유할 수 있다. 표지 또는 삽입물은 제조자 정보 예컨대 로트 번호 및 만료일을 포함할 수 있다. 표지 또는 포장 삽입물은, 예를 들어, 성분을 수용하는 물리적 구조에 통합되거나 물리적 구조 내에 별도로 함유되거나 키트의 성분(예: 앰플, 튜브 또는 바이알)에 부착될 수 있다.

[0294] 표지 또는 삽입물은 디스크(예: 하드 디스크, 카드, 메모리 디스크), CD- 또는 DVD-ROM/RAM과 같은 광학 디스크, DVD, MP3, 자기 테이프, 또는 RAM 및 ROM과 같은 전기 저장 매체 또는 자기/광학 저장 매체, 플래시 매체 또는 메모리-타입 카드와 같은 이들의 하이브리드와 같은 컴퓨터 판독 가능한 매체를 추가로 포함하거나 이에 통합될 수 있다. 일부 구현예에서, 실제 설명서는 키트에 존재하지 않지만, 원격 소스로부터 지침서를 획득하는 수단(예를 들어, 인터넷을 통해)이 제공된다.

[0295] **실험**

[0296] 하기 실시예는 본 발명을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을당업자에게 제공하기 위해 제시되며, 발명자가 그들의 발명으로 간주하는 범위를 제한하는 것을 의도하지 않고, 그들은 이하 실험이 수행되었고 수행될 수 있는 모든 실험임을 나타내고자 의도하지 않는다. 본 시제로 기술된 예시적 설명은 반드시 수행될 필요는 없고, 오히려 설명이 본원에 기재된 데이터 등을 생성하기 위해 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 사용된 수치 (예를 들면 양, 온도, 등)에 대하여 정확도를 확보하기 위해 노력하였지만 일부 실험적 오차는 설명되어야 한다.

[0297] 달리 나타내지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도(°C)이고, 압력은 대기압 또는 이의 근접 압력이다.

[0298] 하기를 포함하는 표준 약어가 사용된다: bp = 염기쌍(들); kb = 킬로베이스(들); pl = 피코리터(들); s 또는 sec = 초(들); min = 분(들); h 또는 hr = 시간(들); aa = 아미노산(들); kb = 킬로베이스(들); nt = 뉴클레오타이드(들); ng = 나노그램; μ g = 마이크로그램; mg = 밀리그램; g = 그램; kg = 킬로그램; dl 또는 dL = 데시리터; μ l 또는 μ l = 마이크로리터; ml 또는 mL = 밀리리터; l 또는 L = 리터; nM = 나노몰; μ M = 마이크로몰; mM = 밀리몰; M = 몰; kDa = 킬로달톤; i.m.= 근육내(로); i.p.= 복강내(로); s.c.= 피하(로); QD = 매일; BID = 1일 2회; QW = 매주; QM = 매월; HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피; BW = 체중; U = 단위; ns = 통계적으로 유의하지 않음; PBS = 인산염 완충된 식염수; PCR = 폴리머라제 연쇄 반응; NHS = N-하이드록시석신이미드; DMEM = 이글 배지의 둘베코 변형; GC = 계능 사본; ELISA = 효소 결합 면역 흡착 검정; EDTA = 에틸렌디아민테트라아세트산; PMA = 포르볼 미리스테이트 아세테이트; rhIL-15 = 재조합 인간 IL-15; LPS = 리포다당류.

[0299] **물질 및 방법**

[0300] 하기 일반적 재료 및 방법이 이하 실시예에 사용될 수 있다:

[0301] 분자 생물학에서 표준 방법은 기재되어 있다[문헌참조: 예를 들어, Sambrook and Russell (2001) Molecular

Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; and Ausubel, et al.(2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y. (박테리아 세포 및 DNA 돌연변이 생성에서의 클로닝 (Vol. 1), 포유동물 세포 및 효모에서의 클로닝 (Vol. 2), 당접합체 및 단백질 발현 (Vol. 3), 및 생물정보학 (Vol. 4)을 기술함)].

[0302] 과학적 문헌은 면역침전, 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리, 및 결정화, 및 화학적 분석, 화학적 변형, 해독 후 변형, 융합 단백질 제조 및 단백질의 글리코실화를 포함하는, 단백질 정제를 위한 방법을 기재하고 있다 [문헌참조: 예를 들어, Coligan, et al.(2000) Current Protocols in Protein Science, Vols. 1-2, John Wiley and Sons, Inc., NY].

[0303] 다클론성 및 단클론성 항체의 생산, 정지, 및 단편화가 기술되며 [예를 들어, Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; 리간드/수용체 상호작용을 특성화하는 표준 기술이 이용가능하며 [참조: 예를 들어, Coligan et al.(2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., NY]; 형광성-활성화된 세포 분류 (FACS)를 포함하는 유세포 분석(flow cytometry) 방법이 이용가능하고 [문헌참조: 예를 들어, Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ]; 예를 들어, 진단 시약 용도의 핵산 프라이머 및 프로브를 포함하는 핵산, 폴리펩티드 및 항체를 변형시키기 위해 적합한 형광성 시약이 이용가능하다 [Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO.].

[0304] 면역계의 조직학의 표준 방법이 기재되어 있다 [참조: 예를 들어, Louis et al. (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NY].

[0305] 면역 세포 (CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포)의 결실은 항체 매개 제거에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 250 μ g의 CD4- 또는 CD8-특이적 항체를 매주 주사할 수 있고, 세포 결실은 FACS 및 IHC 분석을 사용하여 검증할 수 있다.

[0306] 예를 들어, 항원성 단편, 리더 서열, 단백질 폴딩, 작용성 도메인, 글리코실화 부위 및 서열 정렬을 결정하기 위한 소프트웨어 패키지 및 데이터베이스가 가용하다 [참조: 예를 들어, GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); 및 DeCypher™ (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV)].

[0307] 면역적격 Balb/C 또는 B-세포 - 결핍 Balb/C 마우스는 기관 (The Jackson Lab., Bar Harbor, ME)으로부터 입수 가능하며, 표준 과정에 따라 사용될 수 있다 [문헌 참조: 예를 들어, Martin et al (2001) Infect. Immun., 69(11): 7067-73 및 Compton et al.(2004) Comp. Med. 54(6): 681-89]. 본 발명에 의해 고려되는 실험 작업에 적합한 다른 마우스 균주는 당업자에게 공지되어 있고, 통상 The Jackson Lab로부터 입수하였다: .당업자는 본 발명을 실시하는데 또한 사용될 수 있는 모델 및 세포주(예: 염증 모델)에 친숙하다.

[0308] 혈청 IL-15 농도 수준 및 노출 수준은 당해 분야에 사용되는 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 혈청 노출 수준 검정은 마우스 꼬리 절단으로부터 플레인 모세관으로 전혈(~ 50 μ l/마우스)을 수집하고, 원심분리로 혈청 및 혈액 세포를 분리하고, 표준 ELISA 키트[예: R&D 시스템즈 (R&D Systems)] 및 기술에 의해 IL-15 노출 수준을 결정함으로써 수행될 수 있다. 대안적으로, 또는 또한, 이하 기재된 ELISA 프로토콜 (또는 유사한 프로토콜)은 뮤테인 또는 변형된 뮤테인의 생체내 반감기를 결정하는 수단으로서 인간 IL-15의 혈청 수준을 측정하도록 조정될 수 있다.

[0309] IL-15 단백질: 인간 IL-15는 R&D 시스템즈 (Minneapolis, MN, # 247-IL/CF, Accession #: P40933)하기로부터 구입하였다.

[0310] 인간 IL-15 탐지 ELISA. 96웰 플레이트(Nunc Maxisorp #442404)는 4°C에서 100 μ l/웰 PBS + 1 μ g/mL 항-인간 IL-15 항체 (예를 들어, ATCC HB-12062, 클론 M111, Manassas, VA)로 밤새 코팅될 수 있고, DPBS-Tween 20 (Teknova #P0297) 중에서 6 $\times$ 200 μ l로 세척하였고, 진동 플랫폼 상에서 실온에서 2시간 동안 200 μ l/웰 PBS + 5% BSA (Calbiochem #2960) 중에서 블로킹시키고, 상기 기재된 바와 같이 세척하였다. 샘플을 PBS로 연속 희석할 수 있고, 100 μ l/웰을 검정 플레이트에 첨가할 수 있다. 샘플은 2회 또는 3회 실행할 수 있다. 양성 대조군으로서, 정제된 인간 IL-15가 첨가될 수 있는 반면, 모의 혈청감염으로부터 완충제 또는 조절된 배지는 음성 대조군으로서 사용될 수 있고, 둘 다 연속 희석된다. 샘플을 진동 플랫폼 상에서 4°C에서 밤새 배양한 다음, 상기한 바와 같이 세척할 수 있다. 100 μ l/웰의 PBS + 항-인간-IL-15 항체(예: ab7213; Abcam)를 각 웰에 첨가할 수 있고, 진동 플랫폼 상에서 실온에서 1시간 동안 배양하고, 상기한 바와 같이 세척한 다음, 100 μ l/웰의 당나귀 항-래빗 IgG (H+L)-HRP (Jackson Immuno Research # 711-035-152, 1:10,000로 희석됨)를 첨가하고, 진동 플

플랫폼 상에서 실온에서 추가의 1시간 동안 배양할 수 있다. 플레이트를 기재된 바와 같이 세척할 수 있고, 100 μ l/웰의 1-Step Ultra TMB-ELISA (Pierce/Thermo #34029)로 1 내지 5분 동안 전개시킨 다음, 반응을 100 μ l/웰 중지 용액 (Life Technologies #SS04)으로 중지시켰다. 플레이트는 Molecular Devices M2 플레이트 판독기 상에서 450nm에서 판독할 수 있다.

[0311] 또 다른 ELISA 포맷은 [예를 들어, 인간 IL-15 Quantikine ELISA 키트 (R&D Systems #D1500, Minneapolis, MN)에서 제조업자의 권장된 프로토콜에 따라] 사전 제조된 키트를 포함할 수 있었다.

[0312] CTLL-2 세포 증식 검정. 소만 등(Soman et al.)[J Immunol Methods 348(1-2):83-94 (2009 August 31)]은 IL-15 생물학적 활성을 정량적으로 추산하기 위해 가용성 CellTiter96 Aqueous One Reagent (Promega; Madison, WI)을 사용하여 CTLL-2의 최적화된 테트라졸륨 염료계 표색 세포 증식 검정을 설명한다. CTLL-2는 IL-2 의존성 뮤린 세포주이다.

[0313] 소만 등에 의해 기재된 것과 실질적으로 유사한 CTLL-2 세포 증식 검정이 IL-15 생물학적 활성을 결정하기 위해 본원에 사용되었다. 간략하게, CTLL-2 세포(ATCC TIB-214, Manassas, VA)는 10% FBS 및 10% T-STIM (Corning #354115, Tewsbury, MA)이 보충된 RPMI 1640 (Life Technologies, 11875-093, Grand Island, NY)에서 배양했다. 세포를 10,000 세포/mL 내지 100,000 세포/mL의 밀도로 5% CO₂이 보충된 37°C에서 유지시키고, 그들이 대수 상(통상적으로 해동 후 2 내지 3주; 세포 생존율 $\geq$ 95%)으로 성장되고 있을 때 수거하고, T-STIM 없는 성장 배지 20mL로 (5분간 1000 rpm에서 원심분리에 의해) 4회 세척했다. 이어서, T-STIM 없는 성장 배지 100 μ l 중의 25,000 세포/웰을 투명한 96-웰 조직 배양 플레이트로 분액화하고, 단백질이 희석되는 동안 배양기로 반환시켰다. IL-15 샘플을 검정 배지에 이어, 일련의 2배 희석물로 8 ng/mL의 초기 농도로 희석한 다음, 100 μ l를 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 첨가하고, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기로 반환시켰다. 48시간 배양 기간 후, CellTiter96[®] Aqueous One Solution을 첨가하고(20 μ l/웰), 현탁액을 37°C 및 5% CO₂에서 추가의 1 내지 4시간 동안 배양했다. 플레이트를 490nm에서 판독하고, 배지를 포함하는 웰의 배경 판독치는 샘플 웰 판독치로부터 제외시켰다.

[0314] M07e 세포 증식 검정. 문헌[참조: Kanakura et al. (Blood 76(4):706-15 (1990 August 15)); Caliceti et al. (PLoS One 7(7): e41246. doi: 10.1371/journal.pone.0041246 (2012)); 및 Zauner et al. (BioTechniques 20: 905-13 (May 1996))]은 IL-3 또는 GM-CSF 의존성 증식을 하는 인간 백혈병 거핵구 세포주인 M07e를 사용하는 세포 증식 검정을 기재한다. M07e 세포는 DSMZ로부터 구입할 수 있다 (DSMZ 번호 ACC 104; Braunschweig, Germany).

[0315] M07e 세포주는 10% FBS, rhGM-CSF (10 ng/mL) 또는 rhIL-3(10 ng/mL)으로 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco, Grand Island, NY)에서 배양할 수 있고; 대안적으로, 세포는 5% FCS 및 10 ng/mL IL3으로 보충된 IMDM에서 배양할 수 있다. M07e 세포의 인자 유도된 증식을 정량화하기 위해 MTT [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (Sigma) 도입을 사용할 수 있다. 간략하게, 3중 분취량의 M07e 세포는 37°C에서 72시간 동안 평저 미세역가 플레이트 (100 μ l/웰)에서 배양될 수 있다. MTT는 최종 4시간의 배양을 위해 첨가될 수 있다(PBS 중 10 μ l의 5mg/mL MTT 용액). 72시간 후, 100 μ l의 산 이소프로판올(이소프로판올 중 0.04 N HCl)을 모든 웰에 첨가하고, 혼합하고, 광학 밀도를 540nm에서 마이크로 ELISA 플레이트 판독기 상에서 측정했다.

[0316] 야생형 및 뮤테인 인간 IL-15의 정제. 항-인간-IL-15 항체(예: ATCC HB-12062, 클론 M111, Manassas, VA)는 CNBr-활성화 세파로스 4 패스트플로우 (GE Healthcare #71-5000-15 AF, 제조업자의 프로토콜에 따름)에 결합시키고, PBS로 평형화시킬 수 있다. 유리 예코노-컬럼 (Bio-Rad, Hercules, CA)에 함유된 조절 배지 100 mL당 500 μ l 내지 1mL의 M111-세파로스를 첨가하고, 진동 플랫폼 상에서 실온에서 1 내지 2시간 동안 배양할 수 있다. 배지를 중력 흐름을 통해 컬럼을 통해 전개시키고, 1X PBS (pH 7.4)로 1X 세척하고, 0.1M 글리신(pH 2.9)으로 용출시키고, 10 부피%의 1M 트리스 완충제(pH 8.0)로 중화시킬 수 있다. 단백질을 농축시키고, 아미콘 울트라 원심 필터 장치 (Millipore, Billerica, MA; 5,000 kD 분자량 컷오프)를 사용하여 PBS (pH 7.4)로 완충제 교환할 수 있다. 단백질 농도는 280nm에서 분광 광도계로 결정될 수 있다.

[0317] SEC 분석 단백질. 1100 시리즈 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 사용하여, 20-50 μ g의 단백질을 TSK3000sw 컬럼 (Tosoh Biosciences, Tokyo, JP) 상에 주입하고, PBS (pH 7.4)로 평형화하고, 1 mL/분의 유속으로 작동시킬 수 있다.

[0318] **IL-15의 폐길화**

- [0319] PEG (NOF Corporation, Japan)는 pH 4-8에서 100mM NaCl을 포함하는 50mM 포스페이트로 10~100 mg/mL의 농도로 희석시킬 수 있고, 인간 IL-15는 PBS (pH 7.4)로 2~10 mg/mL의 농도로 희석시킬 수 있다. 최종 반응 혼합물은 10:1 내지 2:1- 비율 범위(PPA PEG: 인간 IL-15)의 PEG 및 인간 IL-15; 및 최종 농도 5~50 mM의 수소화시아노 붕소나트륨을 포함할 수 있다. 반응물을 4℃~25℃에서 2~48 시간 동안 배양할 수 있다. 목적하는 단백질 중 및/또는 완충제 교환을 선택하기 위해, 폐길화 단백질은 (상기한 바와 같이) SEC를 통해 분획화될 수 있고, 또는 폐길화 반응 혼합물 및/또는 완충제 교환에서 대부분의 비단백질 종을 제거하기 위해, PEG-IL-15 반응 혼합물은 한외 여과 단계를 거칠 수 있다(예를 들어, Millipore Labscale TFF 시스템은 5kDa 분자량 컷오프로 재생 셀룰로즈(PLCGC) 막과 함께 사용될 수 있다).
- [0320] **IL-15의 변형된 형태의 생체 활성을 측정하기 위한 검정**
- [0321] 본 발명은 본원에 기재된 IL-15 분자의 생체 활성을 결정하기 위한 당해 분야에 공지된 임의의 검정 및 방법의 사용을 고려한다. 이후 기재된 검정은 대표적이고, 배타적이지 않다.
- [0322] CD8+/CD4+T-세포 검정. 활성화된 1차 인간 CD8+ 및 CD4+ T-세포는 PEG-IL-15로 치료될 때 IFN γ , 그랜자임 B, 퍼포린 및 TNF α 를 분비한다. 하기 프로토콜은 이러한 사이토카인의 생산을 스크리닝하기 위한 예시적 검정을 제공한다. 인간 1차 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 임의의 표준 프로토콜에 따라 분리될 수 있다 (참조: 예를 들어, Fuss et al.(2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NY). 웰당 2.5mL의 PBMC (1천만 개의 세포/mL의 세포 밀도)를, 5% CO₂로 가습된 37℃ 배양기 중의 임의의 표준 조직 배양물 처리된 6-웰 플레이트(BD; Franklin Lakes, NJ)에서, RPMI (Life Technologies; Carlsbad, CA), 10 mM HEPES (Life Technologies; Carlsbad, CA), 10% 태아 송아지 혈청 (Hyclone Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) 및 페니실린/스트렙토마이신 칼테일 (Life Technologies; Carlsbad, CA)을 함유하는 완전 RPMI, 또는 AIM-V 무혈청 배지 (Life Technologies #12055-083)로 배양할 수 있다. CD8+ 및 CD4+ T-세포는 제조 프로토콜(Miltenyi Biotec; Auburn, CA)에 따라 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec)의 MACS 세포 분리 기술을 사용하여 분리시킬 수 있다. T-세포는 24-웰 조직 배양 플레이트(Costar #3526, Corning, NY)를 항-CD3 및 항CD-28 항체 (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)로 코팅하고, 1mL의 AIM-V 배지에 3E6 세포/웰을 첨가함으로써 활성화될 수 있다. 세포를 기재된 바와 같이 3일 동안 성장시킨 다음 수집하고, 2E6 세포/mL의 밀도로 새로운 AIM-V에 재현탁시키고, 250 μ L/웰을 96-웰 조직 배양 플레이트 (Falcon # 353072, Corning, NY)로 분액화할 수 있다. 인간 PEG-IL-15를 연속으로 희석시키고, 웰에 최종 농도 1 μ g/mL 내지 0.01 ng/mL로 첨가할 수 있고; 세포를 가습화된 37℃ 배양기에서 3일 동안 5% CO₂로 배양할 수 있다. 이어서, 배지를 수집한 다음, 상업적 ELISA 키트 및 하기 제조 프로토콜 (예: Affymetrix Bioscience; San Diego, CA or R&D Systems, Minneapolis, MN)을 사용하여 IFN γ , 그랜자임 B, 퍼포린 및/또는 TNF α 에 대해 검정할 수 있다.
- [0323] NK 세포 검정. 인간 NK 세포를 PBMC 세포로부터 분리시킬 수 있고(상기한 프로토콜; 완전 RPMI에서 배양됨), 제조 프로토콜(Miltenyi Biotec; Auburn, CA)에 따라 밀테니 바이오텍의 MACS 세포 분리 기술을 사용하여 유사하게 분리시킬 수 있다. 세포를 성장시키고 배양할 수 있고(T-세포에 대해 기재된 바와 같이, 완전 RPMI 사용), 250 μ L의 완전 RPMI에서 5E5 세포/웰로 96-웰 조직 배양 플레이트(Falcon # 353072, Corning, NY)에 플레이트팅했다. 성장을 위해 1 내지 3일 후, 배지를 T-세포에 대해 기재된 바와 같이 검정할 수 있다.
- [0324] **종양 모델 및 종양 분석**
- [0325] 당해 분야에서 허용되는 어느 종양 모델, 검정 등을 사용하여 다양한 종양에 대한 본원에 기재된 IL-15 분자의 영향을 평가할 수 있다. 이후 기재되는 종양 모델 및 종양 분석은 이용될 수 있는 것들의 대표이다.
- [0326] 동계 마우스 종양 세포를 종양 접종당 10⁴, 10⁵ 또는 10⁶ 개의 세포로 피하 또는 피내로 주사한다. Ep2 유방암 종, CT26 결장 암종, 피부의 PDV6 편평상피 암종 및 4T1 유방암종 모델이 사용될 수 있다[참조: 예를 들어, Langowski et al.(2006) Nature 442:461-465]. 면역적격 Balb/C 또는 B-세포 결핍 Balb/C 마우스가 사용될 수 있다. PEG-mIL-15는 면역적격 마우스에 투여될 수 있는 반면, PEG-hIL-15 치료는 B-세포 결핍 마우스에 존재할 수 있다. 종양은 치료가 시작되기 전에 100 내지 250 mm³의 크기에 도달하도록 허용된다. IL-15, PEG-mIL-15, PEG-hIL-15, 또는 완충제 대조군은 종양 이식으로부터 떨어진 부위에 피하 투여된다. 종양 성장은 통상적으로 전자 캘리퍼스를 사용하여 매주 2회 모니터링한다.
- [0327] 종양 조직 및 림프 기관을 다수의 염증 마커에 대한 mRNA 발현을 측정하고, 다수의 염증 세포 마커에 대한 면역조직화학을 수행하기 위해 다양한 종점에서 수거한다. 조직을 액체 질소 중에서 순간 동결시키고 -80℃에서 저

장하였다. 원발성 종양 성장은 통상적으로 전기 칼리퍼를 사용하여 주당 2회 모니터링하였다. 종양 부피는 화학식 $[(\text{너비})^2 \times \text{길이}/2]$ 를 사용하여 계산할 수 있고, 여기서 길이는 더 긴 치수이다. 종양은 치료가 시작되기 전에 90~250 mm³의 크기에 도달하도록 허용된다.

[0328] **실시예 1**

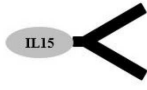
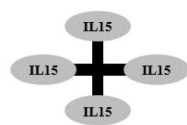
[0329] 여러 시리즈의 폐길화된 rHuIL-15 분자를 제조하고, 이들의 활성은 비폐길화된 rHuIL-15의 것과 비교하였다. 본원의 개시내용은 비폐길화된 IL-15의 것 보다 우수한 하나 이상의 성질을 갖는 폐길화된 IL-15 분자를 고려한다. 상기 성질의 예는 비폐길화된 IL-15, 연장된 반감기 및/또는 다른 이로운 약력학적 변수 (예를 들어, ~400/ng/mL의 혈청 노출을 유지하기에 충분한 QW 투여), 치료학적으로 허용되는 안정성, 및 효율적이고 저렴한 제조능과 유사하거나 이 보다 큰 효능을 포함한다.

[0330] 활성화된 PEG는 제조사 (NOF America Corp. (White Plains, NY))로부터 입수하였고, 표준 폐길화 과정 및 조건을 사용하여 rHuIL-15에 접합시켰다 (문헌참조, 예를 들어, WO 2014/172392). 표 1에 제시된 바와 같이, 다양한 PEG 구조 및 크기 (MW)를 포함하는 여러 IL-15 PEG 시리즈를 생성하였고 평가하였다: 시리즈 1: 선형 PEG; 시리즈 2: 2-아암 분지형 PEG; 시리즈 3: 3-아암 분지형 PEG; 시리즈 4: 이작용성 PEG; 및 시리즈 5: 사작용성 (star) PEG. 달리 지적되지 않는 경우, 각각의 시리즈에서 IL-15는 이의 N-말단에서 폐길화하였다.

[0331] 상기된 방법을 사용하여, EC50 값 (ng/mL)은 각각의 분자의 효능을 결정하기 위해 계산하였고 비폐길화된 rHuIL-15에 상대적인 각각의 분자의 최대 활성화 백분율(%)을 결정하였다(즉, 수용체 포화에서 측정된 최대 흡광도 정제기는 비폐길화된 IL15 최대 흡광도 정제기의 백분율로서 계산하였다).

[0332] 결과는 표 1에 제시된다

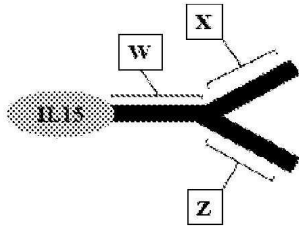
표 1

일련 번호	PEG-rHuIL-15 구조	분자량 (kD)		EC ₅₀ (ng/mL)	최대 활성화% (비폐길화된 rHuIL-15와 비교하여)
		PEG	PEG + IL-15		
	비 폐길화된 rHuIL-15	0	13	0.111	100 %
1		5	18	0.126	98 %
		10	23	0.131	89 %
		20	33	0.150	88 %
		30	43	0.267	86 %
		40	53	0.687	90%
2		20	33	0.258	48%
		40	53	0.817	44%
		60	73	0.8	50%
		80	93	1.287	54%
3		50	63	~0.1	89 %
4		10	36	0.442	71 %
		30	56	1.654	66 %
5		20	72	0.239	67%

[0333]

[0334] 상기 데이터는 시리즈 3, 시리즈 5 및 시리즈 2 (예를 들어, 20kDa PEG)에서 폐길화된 IL-15 분자가 선호될 수

있는 효능을 갖고 있음을 지적한다. 비페길화된 IL-15 및 시리즈 1 분자에 상대적인 시리즈 3 분자의 생체활성에서의 증가는 특히 PEG의 크기 관점에서 놀라웠다. 표 1에서 특정 시리즈 3 분자에 대해, 하기의 화학식을 참조하면, $x = y - 20$ kDa이고 $w = 10$ kDa이다.



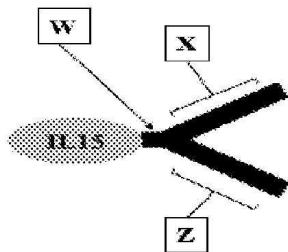
[0335]

[0336]

본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 본원의 개시내용은 시리즈 3 분자로서 고려되는 다른 PEG 크기 분배를 고려한다 (예컨대, $w = 20$ kDa 그리고 $x = y = 15$ kDa).

[0337]

표 1에 명시된 일련의 2개 분자 각각에서, 하기 화학식을 참고하여, PEG의 총 크기는 x 의 MW 플러스(plus) y 의 MW에 기인하며, 이때, 링커의 MW는, 이의 예시가 본원에 기술된 바와 같이, x 및 y 의 MW와 비교하여 미소량이다. 예를 들어, 표 1에서 20 kDa 분자에 대해, $x = y = 10$ kDa이다.



[0338]

[0339]

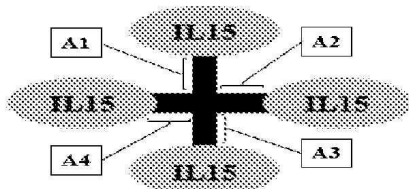
표 1에 지적된 바와 같이, 40 kDa, 60 kDa, 및 80 kDa 페길화된 IL-15 분자의 효능은 20kDa 분자의 것 보다 훨씬 낮은 수준이었다.

[0340]

본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 본원의 개시내용은 시리즈 2 분자로서 고려되는 다른 PEG 크기 분배를 고려한다. 예를 들어, 20kDa PEG를 포함하는 분지형 PEG IL-15 분자에 대해, x 및 y 는 각각 일부 구현예에서 10kDa일 수 있고, x 는 5kDa일 수 있고, y 는 다른 구현예에서 15 kDa일 수 있다. 링커 및 PEG의 예는 본원에 기재된다.

[0341]

표 1에서 특정 시리즈 5 분자(4-작용성 PEG IL-15 분자)에 대해, 하기의 화학식을 참조하면, $A_1A_2A_3A_4$ 복합체는 4개의 IL-15의 각각에 공유적으로 부착된 20kDa의 PEG를 나타낸다. 각각의 A_1 , A_2 , A_3 및 A_4 는 5 kDa이다. PEG는 링커를 통해 IL-15 중 하나 이상에 선택적으로 부착될 수 있다.



[0342]

[0343]

4-작용성 PEG 시리즈 5 분자는 합리적 효능을 가졌지만 상기 star PEG는 제조능 및 안정성과 연관된 과제를 제공한다 (데이터는 나타내지 않음).

[0344]

본 발명의 특정 구현예는 본원에 기재되어 있으며, 이는 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최선의 방식을 포함한다. 전술한, 설명을 읽음에 의해, 개시된 구현예의 변화가 당해 기술에서 일하는 자에게 명백해질 수 있으며, 그리고 이들 숙련가는 적절한 경우 그러한 변화를 사용할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명은 본원에 구체적으로 기재된 바와 다르게 실시될 수 있고, 본 발명은 적용 가능한 법률에 의해 허용되는 바와 따라 본원에 첨부된 특허청구범위에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함하는 것이 의도된다. 게다가, 이들의 모든 가능한 변화에서의 상기-기재된 요소의 임의의 조합은 본원에서 달리 명시되지 않거나 다르

게는 맥락 상 명확히 금기되지 않는 한, 본 발명에 의해 내포된다.

[0345]

본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 출원, 수탁 번호 및 기타 참고 문헌은 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 참조로 인용된 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 바와 같이 본원에 참고로 인용된다.

도면

도면1a

1A. IL-15 긴 신호 펩티드 (LSP) 단백질 (수탁 번호 BC018149.2)

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIE
DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSL
SSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

도면1b

1B. IL-15 짧은 신호 펩티드 (SSP) 단백질 (수탁 번호 BC100962.1)

MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVT
AMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEF
LQSFVHIVQMFINTS

도면1c

1C. 성숙 인간 IL-15 단백질

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

도면2a

2A. 긴 신호 펩티드 (LSP) cDNA 오픈 리딩 프레임 (ORF) (수탁 번호 BC018149.2)

atgagaatttcgaaaccacatttgagaagtatttccatccagtgtctactgtgtttacttctaaacagtcattttctaactgaagctggcattcatgt
cttcattttgggctgtttcagtgccagggtctcctaaaacagaagccaactgggtgaatgtaataagtgatttgaaaaaattgaagatcttattc
aatctatgcatattgatgtactttatatacggaaagtgatgtcacccagttgcaagtaacagcaatgaagtgtcttctcttgaggttacaag
ttatttcacttgagtcggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaaatctgatcatcctagcaacaacagtttgtcttctaattgggaatgtaa
cagaatctggatgcaagaatgtgaggaaactggaggaaaaaataataagaattttgcagagtttgtacatatgtccaaatgttcacaa
cactcttga

도면2b

2B. 짧은 신호 펩티드 (SSP) cDNA 오픈 리딩 프레임 (ORF) (수탁 번호 BC100962.1)

atgggtattgggaaccatagatttgcagctgttcagtgagggcttcctaaaacagaagccaactgggtgaatgtaataagtgattgaaa
aaaattgaagatcttattcaatctatgcattgatgctctttatatacggaaagtgatgttcacccagttgcaaagtaacagcaatgaagtg
cttctcttggagttaacaagttattcacttgagtcggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaatctgatcatcctagcaacaacagttt
gtcttctaattgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtgaggaaactggaggaaaaaatattaaagaattttgcagagttttgtacat
attgtccaaatgttcatcaacacttcttga

도면2c

2C. 성숙 인간 IL-15 단백질을 암호화하는 핵산 서열

aactgggtgaatgtaataagtgattgaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcattgatgctctttatatacggaaagtgatgtcacc
ccagttgcaaagtaacagcaatgaagtgttctcttggagttaacaagttattcacttgagtcggagatgcaagtattcatgatacagtagaa
aatctgatcatcctagcaacaacagttgtcttctaattgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtgaggaaactggaggaaaaaaa
tattaaagaattttgcagagttttgtacatattgtccaaatgttcatcaacacttcttga

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> McCauley, Scott A.
Mumm, John B.
Chan, Ivan H.

<120> INTERLEUKIN-15 COMPOSITIONS AND USES THEREOF

<130> ARMO-021WO

<150> US 61/270,447

<151> 2015-12-21

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr

1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ser

<210> 2

<211> 135

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Leu Gly Thr Ile Asp Leu Cys Ser Cys Phe Ser Ala Gly Leu

1 5 10 15

Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe
50 55 60
Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile
65 70 75 80
His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser
85 90 95
Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu
100 105 110

Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val
115 120 125

Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
130 135

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser

<210> 4

<211> 489

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgagaat	tttgcagc	atttccatcc	agtgctactt	gtgtttactt	60
ctaaacagtc	attttctaac	tgaagctggc	atcatgtct	tcattttggg	120
gcagggttc	ctaaaacaga	agccaactgg	gtgaatgtaa	taagtgattt	180
gaaagatc	ttcaatctat	gcatattgat	gctactttat	atacggaaag	240
cccagttgca	aagtaacagc	aatgaagtgc	tttctcttgg	agttacaagt	300
gagtcaggag	atgcaagtat	tcatgataca	gtagaaaatc	tgatcatcct	360
agtttgtctt	ctaatgggaa	tgtaacagaa	tctggatgca	aagaatgtga	420
gaaaaaata	ttaaagaatt	tttgcagagt	ttgtacata	ttgtccaaat	480
acttcttga					489

<210> 5

<211> 408

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggtattgg	gaacataga	tttgtgcagc	tgtttcagtg	cagggttcc	60
gccaactggg	tgaatgtaat	aagtgatttg	aaaaaaattg	aagatcttat	120
catattgatg	ctactttata	tacggaaagt	gatgttcacc	ccagttgcaa	180
atgaagtgtc	ttctcttggg	gttacaagtt	atttcacttg	agtcaggaga	240
catgatacag	tagaaaatct	gatcatccta	gcaaacaaca	gtttgtcttc	300
gtaacagaat	ctggatgcaa	agaatgtgag	gaactggagg	aaaaaaatat	360
ttgcagagtt	ttgtacatat	tgtccaaatg	ttcatcaaca	cttcttga	408

<210> 6

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat 60
 attgatgcta ctttatatac ggaaagtgat gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg 120
 aagtgttttc tcttgagatt acaagttatt tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat 180
 gatacagtag aaaatctgat catcctagca aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta 240
 acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg 300
 cagagttttg tacatattgt ccaaagtgtc atcaacactt cttga 345

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213>

Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 7

Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 8

Asp Thr Val Glu Asn Leu

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 9

His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 10

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 11

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20 25

<210> 13

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala

1 5 10 15

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu

20 25 30

Ala

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 14

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 15

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 16

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 17

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 18
 Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 19
 Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> This residue may be repeated.
 <400> 20

Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)
 <223> This residue may be repeated.
 <400> 21
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> This residue may be repeated.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> This residue may be repeated.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> This residue may be repeated.

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> This residue may be repeated.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> This residue may be repeated.
 <400> 22
 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)
 <223> This stretch of residues may be repeated.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> This residue may be repeated.
 <400> 23

Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> This stretch of residues may be repeated.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> This residue may be repeated.
 <400> 24

Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 25
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222>
 > (1)..(4)
 <223> This stretch of residues may be repeated.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> This residue may be repeated.

<400> 25

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 26

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 27

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 28

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 29

Gly Ser Ser Ser Gly

1

5