

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6093712号
(P6093712)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int.Cl.

C07K 14/55
C12N 15/09

F 1

(2006.01)
(2006.01)C07K 14/55
C12N 15/00

Z N A A

請求項の数 15 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2013-546430 (P2013-546430)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月22日 (2011.12.22)
 (65) 公表番号 特表2014-502967 (P2014-502967A)
 (43) 公表日 平成26年2月6日 (2014.2.6)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2011/066911
 (87) 國際公開番号 WO2012/088446
 (87) 國際公開日 平成24年6月28日 (2012.6.28)
 審査請求日 平成26年11月26日 (2014.11.26)
 (31) 優先権主張番号 61/426,307
 (32) 優先日 平成22年12月22日 (2010.12.22)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 503115205
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
 ザ レランド スタンフォード ジュニ
 ア エニバーシティー
 アメリカ合衆国 94305-2038
 カリフォルニア州 スタンフォード メイ
 ン クワッド ビルディング 170 サ
 ード フロア ピー. オー. ボックス 2
 0386 オフィス オブ ザ ジェネラ
 ル カウンセル
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン2のスーパーAGニストおよびアンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

IL-2R に対する平衡解離定数が、野生型のヒトIL-2(hIL-2)のものより小さい、IL-2R 結合タンパク質であって、

野生型のhIL-2に従い番号付けされたL80F、R81D、L85V、I86VおよびI92Fのアミノ酸置換を含むIL-2ムテインである、結合タンパク質。

【請求項2】

前記ムテインが、I24V、F42A、K43N、P65H、Q74R、Q74H、Q74N、Q74S、I89VおよびV93Iからなる群から選択される1または複数のアミノ酸置換をさらに含む、請求項1に記載の結合タンパク質。 10

【請求項3】

前記ムテインがQ74Rのアミノ酸置換を含む、請求項2に記載の結合タンパク質。

【請求項4】

前記ムテインが、Q74N、L80F、R81D、L85V、I86V、I89VおよびI92Fのアミノ酸置換を有する、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項5】

前記ムテインが、L80F、R81D、L85V、I86V、I89V、I92F、およびV93Iのアミノ酸置換を有する、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項6】

前記ムテインが、Q74H、L80F、R81D、L85V、I86VおよびI92F 20

のアミノ酸置換を有する、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7】

前記ムテインが、IL-2R と IL-2Rとの間の相互作用を阻害する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 8】

前記ムテインが、Q74S、L80F、R81D、L85V、I86VおよびI92Fのアミノ酸置換を有する、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 9】

前記ムテインが、L18R、Q22E、L80F、R81D、L85V、I86V、I89V、I92F、V93I、およびQ126Tのアミノ酸置換を有する、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

IL-2Rに対する平衡解離定数が、野生型のヒトIL-2(hIL-2)のものより小さい、IL-2R 結合タンパク質であって、野生型のhIL-2に従い番号付けされたL18R、Q22E、Q74S、L80F、R81T、L85V、I86V、I89V、I92F、V93IおよびQ126Tのアミノ酸置換を含むIL-2ムテインである、結合タンパク質。

【請求項 11】

前記ムテインが、Q74N、L80F、R81D、L85V、I86VおよびI92Fのアミノ酸置換を有する、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 12】

前記IL-2ムテインがヒトIL-2ムテインである、請求項 1 または10に記載の結合タンパク質。

【請求項 13】

ヒトIL-2を突然変異させ、これにより、第1世代のIL-2ムテインを生成させる工程と、野生型のヒトIL-2のものより小さい、インターロイキン2受容体に対する平衡解離定数を有する第1世代のIL-2ムテインを同定する工程と、同定された第1世代のIL-2ムテインを突然変異させ、これにより、第2世代のIL-2ムテインを生成させる工程と、野生型のhIL-2に従い番号付けされたL80F、R81D、L85V、I86VおよびI92Fのアミノ酸置換を含む第2世代のIL-2ムテインを同定し、さらに野生型のIL-2と比較してより低い程度で、インターロイキン2受容体に結合し、かつ/またはインターロイキン2受容体を介してシグナル伝達する第2世代のIL-2ムテインを同定し、これにより、IL-2 アンタゴニストタンパク質を生成させる工程と、を含む、IL-2 結合タンパク質の生成方法。

【請求項 14】

野生型IL-2と比べて低減したインターロイキン2受容体への結合を示す、請求項 1、2 または10に記載の結合タンパク質。

【請求項 15】

野生型IL-2と比べて低減したインターロイキン2受容体への結合および/またはインターロイキン2受容体を介するシグナル伝達を示す、請求項 1、10 または14に記載の結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[0001] 本発明は、米国国立衛生研究所により与えられた助成金第A I 5 1 3 2 1号の下で、米国政府の助成によりなされた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

[0002] インターロイキン2(IL-2)とは、正常な免疫反応をもたらすのに極めて重要な役割を果たす、活性化したCD4⁺T細胞が主に生成させる多能性のサイトカインである

10

20

30

40

50

。IL-2は、活性化したTリンパ球の増殖(proliferation)および増加(expansion)を促進し、B細胞成長を強化し、単球およびナチュラルキラー細胞を活性化する。IL-2が試験され、承認されたがん治療として用いられている(アルデスロイキン、Proleukin(登録商標))のは、これらの活性のためであった。

【0003】

[0003] 真核細胞では、ヒトIL-2が153アミノ酸の前駆体ポリペプチドとして合成され、そこから20アミノ酸が除去されて成熟分泌IL-2を生成させる(Taniguchi, 1983)。組換えヒトIL-2は、E. coli (Rosenberg, 1984)、昆虫細胞 (Smith, 1985)、および哺乳動物COS細胞 (Taniguchi, 1983)において生成されている。

【0004】

[0004] IL-2は、3つの異なる受容体：インターロイキン2受容体アルファ(IL-2R ; CD25)、インターロイキン2受容体ベータ(IL-2R ; CD122)、およびインターロイキン2受容体ガンマ(IL-2R ; CD132；共通ガンマ鎖)と相互作用することにより作用する。最初に同定された受容体はIL-2Rであった。IL-2Rは、T細胞活性化の際に出現し、元はTac(T活性化の略記)抗原と称した55KDポリペプチド(p55)である。IL-2Rは、約 10^{-8} MのKdでIL-2に結合し、また、「低アフィニティ」のIL-2受容体としても知られる。IL-2の、IL-2Rのみを発現する細胞への結合は、検出可能な生物学的反応もたらさない。

10

【0005】

[0005] IL-2Rは、2つのシステイン/W S X W Sモチーフを特徴とするI型サイトカイン受容体ファミリーのメンバーである。IL-2Rは、IL-2Rと協調的に発現する。64KDのポリペプチドであるIL-2Rは、インターロイキン4およびインターロイキン7の受容体を含めたいくつかのサイトカイン受容体の間で共有されているため、共通鎖としても知られている。IL-2Rは、IL-15に結合しうる同じシグナル伝達受容体複合体である。

20

【0006】

[0006] 大半の細胞、例えば、休止T細胞は、IL-2RおよびIL-2Rを発現するのみなので、IL-2に対して非感受性である。抗原受容体を介してT細胞が活性化すると、IL-2Rが急速に発現する。IL-2RがIL-2に結合すると、次いで、それはIL-2RおよびIL-2Rを逐次的に会合させる(図1)。IL-2R複合体によるIL-2への結合は、Jak/SATシグナル伝達経路を介するシグナル伝達およびIL-2を介する成長刺激を結果としてもたらす。

30

【0007】

[0007] これまでのところ、マウスIL-2についての解析は広範になされているが、ヒトIL-2についてなされているのは、限定された構造/機能解析のみである(Zurawski, S. M.およびZurawski, (1989) Embo J S: 2583-90; Zurawski, S. Mら (1990) Embo J 9: 3899-905; Zurawski, G. (1991). Trends Biotechnol 9: 250-7; Zurawski, S. M.およびZurawski, G. (1992) Embo J 11: 3905-10. Zurawskiら、EMBO J, 12 5113-5119 (1993))。一部のヒトIL-2ムテインが、ヒトPHAblastに対するそれらの活性について検査されている(Xuら、Eur. Cytokine Netw, 6, 237-244 (1995))。BucheliおよびCiardelli、Arch. Biochem. Biophys, 307 (2): 411-415、(1993)、Collins, L. ら、PNAS USA 85: 7709-7713 (1988)、ならびに米国特許第5,696,234号(Zurawskiら)により、ヒトIL-2ムテインの他の例がもたらされている。

40

【0008】

[0008] IL-2の抗新生物剤としての使用は、腫瘍反応に必要な用量に付随する深刻な毒性により制限されている。IL-2療法の主要な副作用は、血管漏出症候群(VLS)であり、これにより、血管内液が肺および肝臓に蓄積される結果として、肺浮腫および肝損傷がもたらされる。近年まで、VLSは、IL-2により活性化されたNK細胞からの炎症促進性サイトカインの放出により引き起こされると考えられていた。しかし、近年の報

50

告は、IL-2の肺内皮細胞への直接的な結合を指摘し、これをVLSの原因と主張している(Kriegら、PNAS USA 107(26) 11906-11911(2010))。原理的には、IL-2Rに対するアフィニティーが高く、その活性がCD25の発現に依存しないIL-2変異体であれば、臨床的有用性を改善し、毒性を低減できたであろう。

【0009】

[0009] 臨床的に重要な1つのIL-2ムテインは、88位におけるアルギニンのアスパラギンへの置換(R88N)により野生型IL-2と異なるBAY50-4798である(Steppanら(2006)J. Interferon and Cytokine Res., 26(3): 171)。この修飾は、IL-2Rへの結合が比較的低減されたIL-2ムテインを結果としてもたらすとされ、保有する毒性が野生型IL-2と比べて小さいと考えられている。しかし、臨床研究は、BAY50-4798を施される患者が、同様な程度のIL-2介在性VLSを経過することを見出した。10

【0010】

[0010] これらの理由で、固有の特性を示すIL-2ムテインが必要とされることが明らかである。このようなムテインの潜在的な使用には、がん(直接療法および/または補助療法として)および免疫不全症(例えば、HIVおよび結核)の治療が含まれる。IL-2の他の潜在的な使用は、その免疫刺激活性に由来し、これには、がんの直接的な治療; HIV患者またはヒトSCID患者などの免疫不全症の治療; 結核などの感染性疾患の治療; 「がんワクチン」戦略における補助剤としてのその使用; および標準的なワクチン接種プロトコール(例えば、年長者用)の増強など、免疫系刺激の適応に応じた使用が含まれる。例えば、VLSの軽減を示すIL-2ムテインであれば有利であろう。20

【0011】

[0011] 本開示は、新規のIL-2ムテインを提供する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

[0012] IL-2は、免疫系に対して広範な効果を及ぼし、免疫の活性化およびホメオスタシスの両方を制御するのに極めて重要な役割を果たす。免疫系刺激剤として、IL-2は、がんおよび慢性ウイルス感染の治療において用いられている。IL-2の刺激効果はまた、自己免疫および移植拒絶を媒介し、被害も引き起こす。免疫の制御および免疫疾患におけるその手段的役割のために、品質を改善したIL-2分子の同定は、なお活発な研究領域であり続いている。30

【課題を解決するための手段】

【0013】

[0013] これらの目的のため、本開示は、IL-2がその同源の(cognate)受容体とどのように相互作用するのかについての洞察に基づき、新規のIL-2組成物を提供する。大半の状況では、IL-2が、3つの異なる受容体: IL-2R_α、IL-2R_β、およびIL-2R_γを介して作用する。休止T細胞など、大半の細胞は、IL-2に対するアフィニティーが低いIL-2R_αおよびIL-2R_βのみを発現するので、IL-2に応答しない。刺激されると、休止T細胞は、比較的高アフィニティーのIL-2受容体であるIL-2R_γを発現する。IL-2のIL-2R_γへの結合は、この受容体をIL-2R_αおよびIL-2R_βに逐次的に会合させ、T細胞の活性化をもたらす。40

【0014】

[0014] IL-2を介する刺激が、IL-2R_γの会合をもはや必要としないように、IL-2のその受容体との相互作用についての構造解析に基づき、野生型IL-2と比較した場合に、IL-2R_γに対するアフィニティーを比較的増大させたIL-2の突然変異体フォームを作製した。このような突然変異体は、強力なIL-2シグナル伝達アゴニストである。

【0015】

[0015] したがって、一実施形態では、IL-2R_γに対する平衡解離定数が、野生型の50

ヒトIL-2のものより小さいIL-2R 結合タンパク質が開示される。

【0016】

[0016] これらの新規の「スーパー」アゴニストIL-2分子を出発点として用いて、IL-2R に結合することが可能であり、IL-2R のIL-2R との相互作用および受容体のシグナル伝達を低減する「スーパー」アンタゴニストも作製した。

【0017】

[0017] 他の実施形態では、IL-2R 結合タンパク質を生成させる方法であって、ヒトIL-2を突然変異させ、これにより、第1世代のIL-2ムテインを生成させる工程と、野生型のヒトIL-2のものより小さいインターロイキン2受容体 に対する平衡解離定数を有する第1世代のIL-2ムテインを同定する工程と、同定された第1世代のIL-2ムテインを突然変異させ、これにより、第2世代のIL-2ムテインを生成させる工程と、野生型のIL-2より低い程度でインターロイキン2受容体 に結合し、かつ／またはこれを介してシグナル伝達する第2世代のIL-2ムテインを同定し、これにより、IL-2結合タンパク質を生成させる工程とを包含する方法が記載される。
10

【0018】

[0018] これらのIL-2ムテインをまとめて、「スーパー2」と称する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】[0019] IL-2のその受容体との相互作用およびT細胞に対する効果についての概略図。IL-2に対するIL-2R の結合は、IL-2R およびIL-2R の逐次的会合を結果としてもたらす。IL-2は、T細胞のクローン性増殖および分化を引き起こす。
20

【図2】[0020] IL-2ライブラリーのFACSプロファイル。ヒトIL-2遺伝子のエラープローンPCR産物を選択に供した。第1世代のIL-2ライブラリーは、6ラウンドにわたる選択を介して生成させた。フィコエリトリリン(PE)へと連結された四量体(tetrameric)のIL-2R を用いて、IL-2ムテインを発現する酵母に結合させて、第1ラウンドを実施した(A)。後続の選択ラウンドは、PEで標識した単量体のIL-2R を用いて達成した。(B)第2世代のIL-2ライブラリーによる結果。

【図3】[0021]示されるIL-2ムテインにおいて、野生型IL-2配列と比べて変化したアミノ酸残基を示す図である。また、各ムテインおよびIL-2のIL-2R に対する結合アフィニティーも示される。
30

【図4】[0022] IL-2ムテインのCD25⁻ナチュラルキラー細胞およびCD25⁺ナチュラルキラー細胞に対する刺激効果。(A)処置されたCD25⁻YT-1ナチュラルキラー細胞および(B)処置されたCD25⁺YT-1ナチュラルキラー細胞において認められる、野生型IL-2ならびにIL-2ムテインである6-6、D10、およびH9の、STAT5リン酸化に対する用量反応関係を示す図である。丸：野生型IL-2；四角：6-6；上向き三角：H9；下向き三角：D10。

【図5】[0023] IL-2ムテイン結合のCD25に対する非依存性。CD25⁻YT-1ナチュラルキラー細胞およびCD25⁺YT-1ナチュラルキラー細胞のSTAT5リン酸化についての用量反応曲線。(A)IL-2およびIL-2(F42A)(丸、実線：野生型IL-2、CD25⁺細胞；四角、実線：IL-2 F42A、CD25⁺細胞；上向き三角、破線：野生型IL-2、CD25⁻細胞；下向き三角、破線：IL-2 F42A、CD25⁻細胞)。(B)H9およびH9(F42A)(丸、実線：野生型H9、CD25⁺細胞；四角、実線：H9 F42A、CD25⁺細胞；上向き三角、破線：H9、CD25⁻細胞；下向き三角、破線：H9 F42A、CD25⁻細胞)。F42A突然変異は、CD25⁺細胞に対する野生型IL-2の用量反応曲線を右側にシフトさせたが、CD25⁻細胞に対しては観察可能な効果を及ぼさず、H9およびH9 F42Aについての用量反応曲線は、CD25の発現に関わらず本質的に重なり合った。
40

【図6】[0024] CD25 KO T細胞刺激。開示されるIL-2ムテインが、IL-2R の非存在下でT細胞を刺激する能力について調べた。CD25ノックアウトマウスか
50

ら単離したT細胞を、IL-2ムテインまたは野生型IL-2で刺激した。IL-2ムテインの用量反応曲線およびそれぞれのEC₅₀が提示される。示される通り、被験IL-2ムテインの全ては、IL-2Rの非存在下で、T細胞刺激を、野生型IL-2と比べて比較的増大させる結果をもたらした。

【図7】[0025]抗原経験のある(experienced)ヒトCD4 T細胞刺激。開示されるIL-2ムテインが抗原経験のあるT細胞刺激を誘導する相対能力を比較するFACS解析を示す。T細胞を2つの濃度(10ng/mlまたは1ng/ml)のIL-2ムテインまたは野生型IL-2で刺激した。刺激されたT細胞の比率を、各FACSプロファイルに示す。

【図8】[0026]抗体依存性細胞毒性(ADCC)。IL-2ムテインであるD10のナチュラルキラー細胞の機能に対する効果、とりわけ、自発的な抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用についてアッセイした。ナチュラルキラー細胞(エフェクター)およびCr⁵¹で標識した腫瘍細胞(標的)を、抗EGFR抗体であるセツキシマブを伴うかまたは伴わずに、野生型IL-2またはIL-2ムテインであるD10の存在下で、5時間にわたり併せてインキュベートした。D10によるNK細胞の自発的細胞傷害作用に対する刺激は、高用量のIL-2(*p=0.008、**p=0.001)を上回り、IL-2またはD10による刺激を伴わない場合の自発的細胞傷害作用は最小限であった。さらに、D10の添加は、セツキシマブ抗体のADCCを増強した。

【図9】D10の結晶構造。初期疎水性コア突然変異L85Vにより、複数の疎水性コア残基および高アフィニティーのコンセンサス配列を標的とする第2世代のIL-2ライブラリーをもたらした。D10の結晶構造は、ヘリックスCの上流に位置するループ領域において明確に規定された電子密度を含有した。

【図10】新規のIL-2ムテインは、IL-2と比べてCD8⁺T細胞刺激の増強を示すが、Tregsの刺激の増強は示さない。(A)宿主のCD3⁺CD8⁺CD44^{high}メモリー表現型(MP)T細胞の全細胞カウントおよび(B)宿主CD3⁺CD4⁺CD25^{high}T細胞(制御性T細胞)を、PBS、IL-2 20μg、H9 20μg、またはIL-2/抗IL-2モノクローナル抗体の複合体(IL-2/mAb)1.5μgのいずれかを施されたマウスの脾臓において決定した。

【図11】新規のIL-2ムテインは、抗腫瘍反応の増強を示し、IL-2と比べて有害作用を低減する。肺浮腫(肺の湿潤重量)が、IL-2による処置後における有害な毒性作用の尺度として用いられ、乾燥前および乾燥後に肺を秤量することにより決定された(A)。P値は、処置モダリティー間の比較を指す(*p<0.05; **p<0.01)。(B)IL-2ムテインの抗腫瘍特性を、in vivoにおいてB16F10黒色腫細胞を用いて調べた。C57BL/6マウス(群1つ当たりのマウスのn=3~4)に106個のB16F10黒色腫細胞を皮下注射した後、腫瘍小塊が目視可能および触知可能となったら(腫瘍細胞の注射後4~5日目または約15mm²の腫瘍サイズに対応することが典型的である)、PBS、IL-2 20μg、H9 20μg、またはIL-2 1.5μg/抗IL-2モノクローナル抗体の複合体(IL-2/mAb)を5日間にわたり毎日注射した。mm²(±SD)単位の平均腫瘍領域を、腫瘍接種後の時間と対比して示す。P値は、IL-2の他の処置モダリティーとの比較を指す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

[0027] 本明細書の以下および全体では、本開示をより容易に理解させるために、特定の用語および語句が定義される。

【0021】

定義

[0028] 本明細書で引用される全ての参考文献は、全体が示されたと仮定した場合と同様に、参照によりそれらの全体において組み込まれる。別段に規定しない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。Singletonら、「Dictionary of

10

20

30

40

50

Microbiology and Molecular Biology」、3版、J. Wiley & Sons (New York, NY 2001) ; March, 「Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structures」、5版、J. Wiley & Sons (New York, NY 2001) ; ならびにSambrookおよびRussell、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) は、当業者に、本開示で用いられる多くの用語への一般的な指針をもたらす。必要に応じ、市販のキットおよび試薬の使用を伴う手順は、別段に言及しない限り、一般に製造元により規定されたプロトコールおよび／またはパラメータに従い実行する。

10

【0022】

[0029] 本明細書で用いられる「IL-2」とは、天然であれ、組換えであれ、野生型IL-2意味する。Fujitaら、PNAS USA、80、7437-7441(1983)に記載される通り、成熟ヒトIL-2は、133アミノ酸の配列(N末端のさらなる20アミノ酸からなるシグナルペプチドの分だけ短い)として生じる。ヒトIL-2(配列番号1)のアミノ酸配列は、Genbank受託番号(accession locator):NP_000577.2下に見出される。成熟ヒトIL-2のアミノ酸配列を、配列番号2に示す。マウス(Mus musculus)IL-2のアミノ酸配列は、Genbank受託番号:(配列番号3)下に見出される。成熟マウスIL-2のアミノ酸配列を、配列番号4に示す。

【0023】

20

【化1】

配列番号1

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM
LTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

配列番号2

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

30

配列番号3

MYSMQLASCVTLTVLLVNSAPTSSTSSSTA
EAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELL
LSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVL
DLSKSFQLEDAENFISNIRTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRR
WIAFCQSIISTSPQ

40

配列番号4

APTSSTSSSTA
EAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELL
SRMENYRNLKLPRMLTFKF
YLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVL
DLTQS
KS
FQ
LE
DA
EN
FIS
NIR
TV
V
K
L
K
G
S
D
N
T
F
E
C
Q
F
D
D
E
S
A
T
V
V
D
F
L
R
R
W
I
A
F
C
Q
S
I
I
S
T
S
P
Q

【0024】

[0030] 本明細書で用いられる「IL-2ムテイン」とは、インターロイキン2タンパク質に対して特異的な置換がなされているポリペプチドを意味する。例えば、図3は、12のIL-2ムテインおよびそれらの対応するIL-2Rに対する相対結合アフィニティ

50

ーを開示する。IL-2ムテインはまた、天然のIL-2ポリペプチド鎖のうちの1もししくは複数の部位または他の残基におけるアミノ酸の挿入、欠失、置換、および修飾も特徴とする。本開示に従い、任意のこのような挿入、欠失、置換、および修飾は、IL-2Rへの結合活性を保持するIL-2ムテインを結果としてもたらす。例示的なムテインは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸の置換を包含しうる。

【0025】

[0031] ムテインはまた、IL-2の他の位置（すなわち、ムテインの二次構造または三次構造に対して及ぼす効果が最小限の位置）における保存的修飾および保存的置換も包含する。このような保存的置換には、Dayhoff、「Atlas of Protein Sequence and Structure」、5(1978)、およびArgos、EMBO J.、8:779-785(1989)により記載される保存的置換が含まれる。例えば、以下の群のうちの1つに属するアミノ酸は、保存的变化を表す：群I：ala、pro、gly、gln、asn、ser、thr；群II：cys、ser、tyr、thr；群III：val、ile、leu、met、ala、phe；群IV：lys、arg、his；群V：phe、tyr、trp、his；および群VI：asp、glu。

【0026】

[0032] 「IL-2に従い番号付けされた」とは、そのアミノ酸が野生型IL-2の成熟配列において通常生じる位置を基準として選択されたアミノ酸を同定することを意味し、例えば、R81とは、配列番号2において生じる81位のアミノ酸であるアルギニンを指す。

【0027】

[0033] 「IL-2R 受容体を有する細胞型」という用語は、この受容体型を有することが知られる細胞、すなわち、T細胞、活性化したT細胞、B細胞、活性化した単球、および活性化したNK細胞を意味する。「IL-2R 受容体を有する細胞型」という用語は、この受容体型を有することが知られる細胞、すなわち、B細胞、休止単球、および休止NK細胞を意味する。

【0028】

[0034] ポリペプチド配列またはDNA配列に関して本明細書で用いられる「同一性」という用語は、2つの分子間におけるサブユニット配列の同一性を指す。両方の分子におけるサブユニットの位置が、同じ单量体のサブユニット（すなわち、同じアミノ酸残基またはヌクレオチド）により占められていれば、その分子は、その位置において同一である。2つのアミノ酸配列または2つのヌクレオチド配列の間の類似性とは、同一な位置の数の比例関数である。一般に、配列は、最高次のマッチが得られるように割り当てる。必要な場合、同一性は、公表されている技法およびGCSプログラムパッケージ(Devereuxら、Nucleic Acids Res. 12:387、1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschulら、J. Molecular Biol. 215:403、1990)など、広く入手可能なコンピュータプログラムを用いて計算することができる。配列同一性は、University of Wisconsin Biotechnology Center(1710 University Avenue、Madison、Wis. 53705)のGenetics Computer Groupによる配列解析ソフトウェアパッケージなどの配列解析ソフトウェアをそのデフォルトのパラメータで用いて測定することができる。

【0029】

[0035] 「ポリペプチド」、「タンパク質」、または「ペプチド」という用語は、その長さまたは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）に関わらず、アミノ酸残基の任意の鎖を指す。

【0030】

[0036] 本開示の突然変異体のIL-2ポリペプチドが「実質的に純粋」である場合、それらは、対象のポリペプチド、例えば、突然変異体IL-2のアミノ酸配列を含有するポ

10

20

30

40

50

リペプチドの重量（乾燥重量）の少なくとも約60%でありうる。例えば、ポリペプチドは、対象のポリペプチドの重量の少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%でありうる。純度は、任意の適切な標準的方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC解析を介して測定することができる。

【0031】

[0037] 「作動可能に連結された」とは、対象のヌクレオチド配列（すなわち、IL-2ムテインをコードする配列）が、ヌクレオチド配列の発現（例えば、*in vitro*の転写／翻訳系における、または、ベクターを宿主細胞へと導入する場合は、宿主細胞における）を可能とする形で（1または複数の）制御配列に連結されていることを意味することが意図される。「制御配列」には、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が含まれる。例えば、Goeddel (1990)、「Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, Calif.)」を参照されたい。制御配列には、多くの種類の宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を指示する配列、および特定の宿主細胞のみにおけるヌクレオチド配列の発現を指示する配列（例えば、組織特異的な制御配列）が含まれる。当業者には、発現ベクターのデザインが、形質転換される宿主細胞の選択、タンパク質の所望の発現レベルなどの因子に依存しうることが理解されるであろう。本発明の発現構築物を宿主細胞に導入し、これにより、本明細書で開示されるヒトIL-2ムテインを生成させることもでき、その生物学的に活性な変異体を生成させることもできる。10

【0032】

[0038] 本明細書では、「宿主細胞」という用語と「組換え宿主細胞」という用語とが互換的に用いられる。このような用語は、特定の対象細胞を指すのみでなく、また、このような細胞の後代または潜在的な後代も指すことが理解される。後続の世代では、突然変異または環境的影響に起因して特定の修飾が生じうるため、このような後代は、実のところ、親細胞と同一でない場合もあるが、本明細書で用いられる用語の範囲内にやはり包含される。20

【0033】

[0039] 本明細書で用いられる「形質転換」という用語および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムによる共沈殿、DEAEデキストランを介するトランスフェクション、リポフェクション、遺伝子銃、または電気穿孔を含めた、外来の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞へと導入するための、当技術分野で認識される多様な技法を指すことが意図される。30

【0034】

[0040] 本明細書で用いられる「薬学的に許容可能な担体」という用語には、医薬投与に適合的な生理食塩液、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれるがこれらに限定されない。また、補助的な活性化合物（例えば、抗生素）も組成物に組み込むことができる。

【0035】

[0041] 本明細書で用いられる通り、本発明者らは、「がん」（または「がん性」）、「過剰増殖性」、および「新生物性」という用語を、自律的成长能（すなわち、急速な増殖を伴う細胞成長を特徴とする異常な状態（stateまたはcondition））を有する細胞を指すのに用いることができる。過剰増殖性疾患状態および新生物性疾患状態は、病的状態として（すなわち、疾患状態を特徴づけるかまたは構成する状態として）類別することもでき、非病的状態として（すなわち、正常状態からの逸脱ではあるが、疾患状態とは関連しない状態として）類別することもできる。この用語は、組織病理学的種類または侵襲性の段階に関わらず、がん成長または発がん過程、転移性組織、または悪性形質転換細胞、悪性形質転換組織、もしくは悪性形質転換器官の全ての種類を包含することを意味する。「病的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍成長を特徴とする疾患状態において生じる。非病的過剰4050

増殖性細胞の例は、創傷の修復と関連する細胞の増殖を包含する。「がん」または「新生物」という用語は、肺、乳房、甲状腺、リンパ節、およびリンパ組織、消化器官、および泌尿生殖路が罹患する悪性腫瘍を含めた、多様な器官系の悪性腫瘍を指すほか、一般に大半の結腸がん、腎細胞がん、前立腺がん、および／または精巣腫瘍、非小細胞肺がん、小腸がん、ならびに食道がんなどの悪性腫瘍を包含すると考えられる腺がんを指すのにも用いられる。

【0036】

[0042] 「がん腫」という用語は、当技術分野で認知されており、呼吸器系がん、消化器系がん、泌尿生殖器系がん、精巣がん、乳がん、前立腺がん、内分泌系がん、および黒色腫を含めた、上皮組織または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。「腺がん」とは、腺組織由来するか、または腫瘍細胞が、認識可能な腺構造を形成するがん腫を指す。10

【0037】

[0043] 本明細書で用いられる、「造血系の新生物性障害」という用語は、造血系由来の、例えば、骨髄系、リンパ系、もしくは赤血球系、またはこれらの前駆体細胞から生じる過形成性／新生物性細胞を伴う疾患を包含する。分化が低度な急性白血病（例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病）から生じる疾患であることが好ましい。さらなる例示的な骨髄障害には、急性前骨髓性白血病（APML）、急性骨髓性白血病（AML）、および慢性骨髓性白血病（CML）（Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol. / Hematol. 11 :267-97において総説されている）が含まれるがこれらに限定されず；リンパ性悪性腫瘍には、B細胞系列のALLおよびT細胞系列のALLを包含する急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、有毛細胞白血病（HLL）、およびワルデンシュトーレムマクログロブリン血症（WM）が含まれるがこれらに限定されない。悪性リンパ腫のさらなるフォームには、非ホジキンリンパ腫およびそれらの変種、末梢T細胞リンパ腫、成人性T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚性T細胞リンパ腫（CTCL）、大型顆粒リンパ球白血病（LGF）、ホジキン病、およびリード・シュルンベルク病が含まれるがこれらに限定されない。20

【0038】

IL-2 ムテイン

[0044] 多様な実施形態では、本開示は、実質的に精製されうるが必ずしも精製されていないIL-2ポリペプチドであって、IL-2の生物学的活性のうちの1または複数（例えば、細胞増殖の刺激）を果たし、野生型IL-2のアゴニストとして機能しうる、IL-2ポリペプチドを提供する。IL-2は、抗原により活性化したT細胞の増殖およびNK細胞の刺激を誘導する、T細胞成長因子として特徴づけられている。30

【0039】

[0045] また、野生型IL-2のアンタゴニストとして機能しうる、すなわち、IL-2の生物学的活性を防止するIL-2ポリペプチドも、記載されている。

【0040】

[0046] 例示的な突然変異体のIL-2ポリペプチドは、配列番号2により表されるポリペプチドがIL-2Rに結合するアフィニティーより高いアフィニティーでIL-2Rに結合する、配列番号2と少なくとも約80%同一なアミノ酸配列を包含する。例えば、突然変異体のIL-2ポリペプチドは、野生型IL-2と比べて少なくとも1つの突然変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、付加、または置換）を有することが可能であり、野生型IL-2より高いアフィニティーでIL-2Rに結合する。40

【0041】

[0047] 例示的な突然変異体のIL-2ポリペプチドはまた、配列番号2と少なくとも約80%同一であり、配列番号2により表されるポリペプチドがIL-2Rに結合するアフィニティーより低いアフィニティーでIL-2受容体（IL-2R）に結合するアミノ酸配列も包含しうる。例えば、突然変異体のIL-2ポリペプチドは、野生型IL-2と

比べて少なくとも 1 つの突然変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、付加、または置換）を有することが可能であり、野生型 IL - 2 より低いアフィニティーで IL - 2R に結合する。

【0042】

[0048] 例示的な突然変異体の IL - 2 ポリペプチドは、野生型 IL - 2 と少なくとも約 50%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 87%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% 同一でありうる。突然変異は、アミノ酸残基の数または内容の変化からなりうる。例えば、突然変異体の IL - 2 は、野生型 IL - 2 より多数のアミノ酸残基を有する場合もあり、少数のアミノ酸残基を有する場合もある。代替的に、または加えて、例示的な突然変異体のポリペプチドは、野生型 IL - 2 に存在する 1 または複数のアミノ酸残基の置換を含有しうる。多様な実施形態では、突然変異体の IL - 2 ポリペプチドが、単一のアミノ酸残基の添加、欠失、または置換、例えば、69 位における残基の置換により野生型 IL - 2 と異なりうる。同様に、例示的な突然変異体のポリペプチドは、2 つのアミノ酸残基、例えば、配列番号 2 の 24、65、74、80、81、85、86、89、92、および 93 位における残基の置換により野生型と異なりうる。

【0043】

[0049] 例示を目的として述べると、配列番号 2 の基準アミノ酸配列と少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を包含するポリペプチドは、配列番号 2 の基準アミノ酸の最大 5 力所にわたる変更の組入れを除き、基準配列と同一な配列を包含するポリペプチドである。例えば、基準配列におけるアミノ酸残基のうちの最大 5% を欠失させるかまたは別のアミノ酸で置換することもでき、基準配列における全アミノ酸残基のうちの最大 5% の数のアミノ酸を基準配列へと挿入することもできる。これらの基準配列の変更は、基準アミノ酸配列のアミノ(N)末端の位置またはカルボキシ(C)末端の位置に施すこともでき、これらの末端の位置の間のいずれかに、基準配列の残基間に個別に散在させて施すこともでき、基準配列内の 1 または複数の連続する群に施すこともできる。

【0044】

[0050] 置換されるアミノ酸残基（1 または複数の）は、以下の群：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン内の置換を包含することが典型的な保存的置換でありうるが、必ずしも保存的置換ではない。これらの突然変異は、IL - 2R および / または IL - 2R に接触するアミノ酸残基における突然変異でありうる。

【0045】

[0051] より具体的に述べると、突然変異（（1 または複数の）付加または（1 または複数の）欠失に関して保存的であれ、非保存的であれ）は、1 または複数の位置に施すことができる。例えば、突然変異は、I 24V、P 65H、Q 74R、Q 74H、Q 74N、Q 74S、L 80F、L 80V、R 81I、R 81T、R 81D、L 85V、I 86V、I 89V、I 92F、V 93I でありうる。例示的な IL - 2 ムテイン領域の配列は、以下の通りである：5 - 1 : 配列番号 5 ; 5 - 2 : 配列番号 6 ; 6 - 6 : 配列番号 7 ; A 2 : 配列番号 8 ; B 1 : 配列番号 9 ; B 11 : 配列番号 10 ; C 5 : 配列番号 11 ; D 10 : 配列番号 12 ; E 10 : 配列番号 13 ; G 8 : 配列番号 14 ; H 4 : 配列番号 15 ; および H 9 : 配列番号 16。

【0046】

【化2-1】

配列番号5

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLARSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
 WITFCQSIISTLT

配列番号6

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLARSKNFHLRPRDVISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
 WITFCQSIISTLT

10

配列番号7

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLARSKNFHLPRDVISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
 WITFCQSIISTLT

配列番号8

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLASHSKNFHLTPRDVVSNINVFILELGSETTFMCEYADETATIVEFLN
 RWITFCQSIISTLT

20

配列番号9

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLANSKNFHFDPRDVVSNNVFILELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLT

30

配列番号10

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMVLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 LEEELKPLEEVNLASSKNFHFDPRDVVSNNVFILELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLT

配列番号11

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKHLEEVNLANSKNFHVTPRDVVSNNVFILELGSETTFMCEYADETATIVEFLN
 RWITFCQSIISTLT

40

配列番号12

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLASHSKNFHFDPRDVVSNINVFILELGSETTFMCEYADETATIVEFLN
 RWITFCQSIISTLT

【0047】

【化2-2】

配列番号13

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLNASSKNFH**F****D****PRD****VV**SNINV**F**VLELGSETTFMCEYADETATIVEFLN
 RWITFCQSIISTLT

配列番号14

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLN**A**NSKNFH**F****D****PRD****VV**SNINV**F**VLELGSETTFMCEYADETATIVEFLN
 RWITFCQSIISTLT

10

配列番号15

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLNASSKNFH**L****T****PRD****VIS**SNINV**F**VLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
 WITFCQSIISTLT

配列番号16

20

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVNLN**A**QSKNFH**F****D****PRD****VV**SNINV**F**VLELGSETTFMCEYADETATIVEFLN
 RWITFCQSIISTLT

【0048】

[0052] アフィニティーに関して、本明細書では、IL-2Rⁿに、野生型IL-2ポリペプチドよりも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、または少なくとも約40%以上高いアフィニティーで結合する例示的な突然変異体のIL-2ポリペプチドが開示される。野生型IL-2ポリペプチドは、IL-2Rⁿに約280nMのK_dで結合する。開示される例示的な突然変異体のIL-2ポリペプチドの結合アフィニティーはまた、IL-2Rⁿに対して野生型IL-2より1.2、1.4、1.5、2、5、10、15、20、25、50、100、200、250倍またはそれ以上の倍率のアフィニティーとしても表すことができる。

30

【0049】

[0053] 代替的に、または加えて、例示的な突然変異体のIL-2ポリペプチドは、T細胞増殖アッセイにおける効力を野生型IL-2と比べて増大させることができた。突然変異体のIL-2ポリペプチドがIL-2Rⁿに結合する能力は、本明細書で記載される細胞結合アッセイおよび細胞増殖アッセイを含めた多数のアッセイを介して評価することができる。

40

【0050】

[0054] 例示的な突然変異体のIL-2ポリペプチドは、突然変異体のIL-2ポリペプチドに対する一過性の曝露後の長時間にわたり受容体/リガンド複合体からのシグナル伝達が存続するように、野生型IL-2と比較して、IL-2Rⁿ受容体サブユニットからの解離速度の低下を示す能力を有しうる。

【0051】

[0055] 本開示ではまた、その相互作用が、野生型IL-2と比べて約2%、約5%、約10%、約15%、約20%、約50%、約75%、約90%、約95%またはそれ以上低減されるように、IL-2RⁿのIL-2Rⁿとの会合を破壊する突然変異体のポリペプチドも提供される。

【0052】

50

[0056] また、IL-2Rに対するアフィニティーの増大、およびIL-2RのIL-2との相互作用の破壊の両方の特性を保有する例示的な突然変異体のIL-2ポリペプチドも開示される。

【0053】

[0057] 以下でさらに記載される通り、本開示では、酵母表面ディスプレイを用いて、野生型IL-2と比べると、IL-2Rに対する結合アフィニティーが増大し、かつ／またはIL-2Rに対する結合アフィニティーが減少した、突然変異体のIL-2ポリペプチドの例示的なクラスが提供される。

【0054】

IL-2ムテインの野生型IL-2との構造的比較

10

IL-2ムテイン、発現ベクター、および宿主細胞の組換え発現

[0058] 多様な実施形態では、本発明を実施するのに用いられるポリペプチドが、合成であるか、または組換え核酸分子の発現を介して生成する。キメラ（例えば、少なくとも突然変異体のIL-2ポリペプチドおよび異種ポリペプチドを含有する融合タンパク質）である場合、ポリペプチドは、突然変異体IL-2の全部または一部をコードする1つの配列、および異種ポリペプチドの全部または一部をコードする第2の配列を含有するハイブリッドの核酸分子によりコードされうる。例えば、突然変異体のIL-2ポリペプチドは、ヘキサヒストジンタグと融合させて、細菌により発現されるタンパク質の精製を容易にすることもでき、ヘマグルチニンタグと融合させて、真核細胞により発現されるタンパク質の精製を容易にすることもできる。

20

【0055】

[0059] IL-2ムテインをコードするDNA配列を構築し、これらの配列を適切に形質転換された宿主により発現する方法には、PCR支援突然変異誘発法の使用が含まれるがこれらに限定されない。また、IL-2ポリペプチドに対するアミノ酸残基の欠失または付加からなる突然変異も、標準的な組換え法により作製することができる。欠失または付加の場合、IL-2をコードする核酸分子を、任意選択により、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化させる。結果として得られるフラグメントは、直接発現させることもでき、例えば、それを第2のフラグメントへとライゲーションすることによりさらに操作することもできる。核酸分子の2つの末端が互いに重複する相補的なヌクレオシドを含有する場合に、ライゲーションは容易となりうるが、また、平滑末端のフラグメントもライゲーションすることができる。また、PCRにより生成させた核酸も、多様な突然変異体の配列を生成させるのに用いることができる。

30

【0056】

[0060] 完全なアミノ酸配列を用いて、逆翻訳された遺伝子を構築することができる。IL-2ムテインをコードするヌクレオチド配列を含有するDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードする複数の低分子オリゴヌクレオチドを合成し、次いで、ライゲーションすることができる。個別のオリゴヌクレオチドは、相補的なアセンブリーのための5'突出または3'突出を含有することが典型的である

40

【0057】

[0061] 組換え分子生物学法により変化させた核酸分子の発現を介して突然変異体のポリペプチドを生成させることに加えて、突然変異体のポリペプチドは、化学合成することもできる。化学合成されたポリペプチドは、当業者が日常的に生成させているものである。

【0058】

[0062] アセンブリングしたら（合成、部位指向的突然変異誘発、または別 の方法を介して）、IL-2ムテインをコードするDNA配列を、所望の形質転換宿主におけるIL-2ムテインの発現に適する発現ベクターおよび作動的に連結された発現制御配列へと挿入する。適正なアセンブリーは、ヌクレオチドの配列決定、制限マッピング、および適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現により確認することができる。当技術分野でよく知られている通り、宿主においてトランスクレプトされた遺伝子の高発現レベ

50

ルを得るためにには、この遺伝子を、選択された発現宿主において機能的な、転写および翻訳の発現制御配列に作動的に連結しなければならない。

【0059】

[0063] IL-2 ムテインをコードする DNA 配列はまた、部位指向的突然変異誘発、化学合成、または他の方法のいずれにより調製したのであれ、シグナル配列をコードする DNA 配列も包含しうる。存在する場合、このようなシグナル配列は、IL-2 ムテインを発現させるために選択される細胞により認識される配列である。それは、原核細胞のシグナル配列である場合もあり、真核細胞のシグナル配列である場合もあり、2つの組合せの場合もある。それはまた、天然 IL-2 のシグナル配列でもありうる。シグナル配列の組入れは、それがなされる組換え細胞から IL-2 ムテインを分泌させることができが望まれるかどうかに依存する。選択される細胞が原核細胞である場合、DNA 配列がシグナル配列をコードしないことが一般に好ましい。選択される細胞が真核細胞である場合は、シグナル配列をコードすることが一般に好ましく、野生型 IL-2 のシグナル配列を用いることが最も好ましい。10

【0060】

IL-2 ムテイン融合タンパク質

[0064] 上記で言及した通り、例示的な突然変異体の IL-2 ポリペプチドは、突然変異体の IL-2 ポリペプチドおよび異種ポリペプチド（すなわち、IL-2 またはその突然変異体でないポリペプチド）（例えば、米国特許第 6,451,308 号を参照されたい）を包含する融合ポリペプチドまたはキメラポリペプチドとして調製することができる。例示的な異種ポリペプチドは、in vivo において、キメラポリペプチドの循環半減期を延長することが可能であり、したがって、突然変異体の IL-2 ポリペプチドの特性をさらに増強することが可能である。多様な実施形態では、循環半減期を延長するポリペプチドが、ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミンの場合もあり、IgG の重鎖可変領域を欠く抗体の IgG サブクラスの Fc 領域の場合もある。例示的な Fc 領域は、補体の結合およびFc受容体の結合を阻害する突然変異を包含する場合もあり、溶解性の場合もある、すなわち、補体に結合する場合もあり、抗体依存性補体溶解（ADCC；1994年12月12日に出願された USSN 08/355,502）などの別の機構を介して細胞を溶解させる場合もある。20

【0061】

[0065] 「Fc 領域」とは、パパインによる IgG の消化を介して生成する、IgG の C 末端ドメインと相同な天然または合成のポリペプチドでありうる。IgG Fc の分子量は、約 50 kDa である。突然変異体の IL-2 ポリペプチドは、Fc 領域の全体、またはそれがその一部であるキメラポリペプチドの循環半減期を延長する能力を保持する小部分を包含しうる。加えて、全長の Fc 領域またはフラグメント化された Fc 領域は、野生型分子の変異体でもありうる。すなわち、それらは、ポリペプチドの機能に影響を及ぼす場合もあり、及ぼさない場合もある、突然変異を含有することが可能であり、以下でさらに記載される通り、天然の活性が全ての場合に必要または所望なわけではない。30

【0062】

[0066] Fc 領域は、「溶解性」の場合もあり、「非溶解性」の場合もあるが、非溶解性であることが典型的である。非溶解性の Fc 領域は、高アフィニティーの Fc 受容体結合部位および C'1q 結合部位を欠くことが典型的である。マウス IgG Fc の、高アフィニティーの Fc 受容体結合部位は、IgG Fc の 235 位に Leu 残基を包含する。したがって、Fc 受容体結合部位は、Leu 235 を突然変異させるかまたは欠失させることにより破壊することができる。例えば、Leu 235 の Glu による置換は、Fc 領域が高アフィニティーの Fc 受容体に結合する能力を阻害する。マウス C'1q 結合部位は、IgG の Glu 318 残基、Lys 320 残基、および Lys 322 残基を突然変異させるかまたは欠失させることにより機能的に破壊することができる。例えば、Glu 318、Lys 320、および Lys 322 を Ala 残基で置換すると、IgG1 の Fc は、抗体依存性細胞溶解を指示することが可能でなくなる。これに対して、溶解性の I4050

g G F c 領域は、高アフィニティーの F c 受容体結合部位および C' 1 q 結合部位を有する。高アフィニティーの F c 受容体結合部位は、IgG Fc の 235 位において Leu 残基を包含し、C' 1 q 結合部位は、IgG1 の Glu318 残基、Lys320 残基、および Lys322 残基を包含する。溶解性 IgG Fc は、これらの部位において野生型残基または保存的アミノ酸置換を有する。溶解性 IgG Fc は、細胞を抗体依存性細胞毒性または補体誘導性細胞溶解 (CDC) の標的としうる。また、ヒト IgG に適する突然変異も知られる（例えば、Morrisonら、The Immunologist 2:119-124、1994；および Brekkeら、The Immunologist 2: 125、1994 を参照されたい）。

【0063】

[0067] 他の実施形態では、キメラポリペプチドは、突然変異体の IL-2 ポリペプチドおよび F L A G 配列などの抗原性タグとして機能するポリペプチドを包含しうる。F L A G 配列は、本明細書で説明される、ビオチニル化されて高度に特異的な抗 F L A G 抗体により認識される（また、Blanarら、Science 256:1014、1992；LeClairら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8145、1992 も参照されたい）。一部の実施形態では、キメラポリペプチドが、C 末端の c - myc エピトープタグをさらに含む。 10

【0064】

[0068] 他の実施形態では、キメラポリペプチドが、突然変異体の IL-2 ポリペプチドおよび Aga2p アグルチニンのサブユニット（例えば、Boder および Wittrup、Nature Biotechnol. 15:553-7、1997 を参照されたい）など、突然変異体の IL-2 ポリペプチドの発現を増強するかまたは細胞内局在化を指示するように機能する異種ポリペプチドを包含する。 20

【0065】

[0069] 他の実施形態では、突然変異体の IL-2 および抗体またはその抗原結合部分を含めたキメラポリペプチドを生成させることができる。キメラタンパク質の抗体成分または抗原結合成分は、ターゲティング部分として用いられる。例えば、それを用いて、キメラタンパク質を細胞または標的分子の特定のサブセットへと局在化させることができる。サイトカイン - 抗体キメラポリペプチドを生成させる方法は、例えば、米国特許第 6,617,135 号に記載されている。 30

【0066】

突然変異体の IL-2 をコードする核酸分子

[0070] 一部の実施形態では、上記の突然変異体の IL-2 ポリペプチドなど、単独の、またはキメラポリペプチドの一部としての突然変異体の IL-2 ポリペプチドは、核酸分子を発現させることにより得ることができる。突然変異体の IL-2 ポリペプチドが、それらの野生型 IL-2 ポリペプチドとの同一性との関係で記載しうると全く同様に、それらをコードする核酸分子も、野生型 IL-2 をコードする核酸分子との一定の同一性を必然的に有する。例えば、突然変異体の IL-2 ポリペプチドをコードする核酸分子は、野生型 IL-2 をコードする核酸（例えば、配列番号 2）と少なくとも 50%、少なくとも 65%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 85%、および最も好ましくは少なくとも 95%（例えば、99%）同一でありうる。成熟 IL-2 およびそのシグナル配列をコードする核酸配列は、配列番号 17 に見出される。 40

【0067】

[0071] 提供される核酸分子は、天然配列を含有する場合もあり、遺伝子コードの縮重性に起因して天然の配列と異なるが同じポリペプチドをコードする配列を含有する場合もある。これらの核酸分子は、RNA または DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNA、またはホスホルアミダイトベースの合成を介して生成させる合成DNAなどの合成DNA）からなる場合もあり、これらの核酸の種類のうちのヌクレオシドの組合せまたは修飾からなる場合もある。加えて、核酸分子は、二本鎖の場合もあり、一本鎖（すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖）の場合もある。

【0068】

[0072] 核酸分子は、ポリペプチドをコードする配列に限定されず、これにはまた、コー 50

ド配列（例えば、IL-2のコード配列）の上流または下流に位置する非コード配列の一部または全部も包含されうる。分子生物学法の当業者は、核酸分子を単離する日常的な手順に精通している。核酸分子は、例えば、ゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼで処理することにより生成させることもでき、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施することにより生成させることもできる。核酸分子がリボ核酸（RNA）である場合、分子は、例えば、in vitroにおける転写を介して生成させることができる。

【0069】

[0073] 本開示の例示的な単離核酸分子は、天然状態ではそれ自体として見出されないフラグメントを包含しうる。したがって、本開示は、核酸配列（例えば、突然変異体のIL-2をコードする配列）をベクター（例えば、プラスミドベクターまたはウイルスベクター）へと組み込む場合もあり、異種細胞のゲノム（または天然の染色体位置以外の位置における同種細胞のゲノム）へと組み込む場合もある組換え分子など、組換え分子を包含する。

【0070】

[0074] 上記の通り、本発明の突然変異体のIL-2ポリペプチドは、キメラポリペプチドの一部として存在しうる。上記の異種ポリペプチドに加えて、またはこの代わりに、本発明の核酸分子は、「マーカー」または「レポーター」をコードする配列も含有しうる。マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子の例には、-ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスクレオタード（CAT）、アデノシンデアミナーゼ（ADA）、アミノグリコシドホスホトランスクレオタード（neo^r、G418^r）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスクレオタード（HPH）、チミジンキナーゼ（TK）、lacZ（-ガラクトシダーゼをコードする）、およびキサンチンギアニンホスホリボシルトランスクレオタード（XGPRT）が含まれる。本発明の実施と関連する標準的な手順の多くと同様に、当業者は、さらなる有用な試薬、例えば、マーカーまたはレポーターの機能をもたらしうるさらなる配列について承知しているであろう。

【0071】

[0075] 本発明の核酸分子は、突然変異を、哺乳動物の細胞など、任意の生物学的細胞から得られる、IL-2をコードするDNAへと導入することにより得ることができる。したがって、本発明の核酸（およびそれらがコードするポリペプチド）は、マウス、ラット、モルモット、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウサギ、サル、ヒヒ、イヌ、またはネコの核酸でありうる。一実施形態では、核酸分子がヒトの核酸分子である。

【0072】

突然変異体のIL-2遺伝子産物の発現

[0076] 上記の核酸分子は、例えば、それを形質導入した細胞における核酸分子の発現を指示することが可能なベクター内に含有させることができる。したがって、発現ベクターは、突然変異体のIL-2ポリペプチドに加えて、突然変異体のIL-2ポリペプチドをコードする核酸分子も含有し、これらのベクターでトランスクレクトした細胞も、好みの実施形態のうちにある。

【0073】

[0077] 当然ながら、全てのベクターおよび発現制御配列が同等に良好に機能して、本明細書で説明されるDNA配列を発現するわけではないことを理解されたい。また、全ての宿主が、同じ発現系と共に同等に良好に機能するわけでもない。しかし、当業者は、過度の実験なしに、これらのベクター、発現制御配列、および宿主の中で選択を行うことができる。例えば、ベクターの選択では、その中でベクターを複製しなければならないため、宿主についても考慮しなければならない。また、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、および抗生剤マーカーなど、ベクターによりコードされる他の任意のタンパク質の発現についても考慮すべきである。例えば、用いられるベクターには、IL-2ムテインをコードするDNAのコピー数を増幅させるベクターが含まれる。当技術分野では、このような増幅可能なベクターがよく知られている。それらには、例えば、DHFR増幅（例えば、Kaufman、米国特許第4,470,461号；KaufmanおよびSharp、「Construction of a Modular Dihydrafolate Reductase cDNA Gene: Analysis of Signals Utiliz

10

20

30

40

50

ed for Efficient Expression」、Mol. Cell. Biol.、2、1304-19頁(1982)を参照されたい)、またはグルタミンシンテターゼ(「GS」)増幅(例えば、米国特許第5,122,464号および欧州出願公開第338,841号を参照されたい)を介して増幅することが可能なベクターが含まれる。

【0074】

[0078] 一部の実施形態では、本開示のヒトIL-2ムテインが、ベクター、好ましくは発現ベクターから発現する。ベクターは、宿主細胞における自律的複製に有用であるか、または宿主細胞へと導入されると宿主細胞のゲノムへと組み込むことができ、これにより、宿主のゲノムと共に複製される(例えば、非エピソーム性の哺乳動物ベクター)。発現ベクターは、それらが作動可能に連結されたコード配列の発現を指示することが可能である。一般に、組換えDNA法において有用な発現ベクターは、プラスミド(ベクター)のフォームであることが多い。しかし、また、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス)など、発現ベクターの他のフォームも含まれる。10

【0075】

[0079] 例示的な組換え発現ベクターは、発現に用いられる宿主細胞に基づき選択される1または複数の制御配列であって、発現する核酸配列に作動可能に連結された制御配列を包含しうる。

【0076】

[0080] 発現構築物またはベクターは、原核宿主細胞または真核宿主細胞におけるIL-2ムテインまたはその変異体の発現用にデザインすることができる。20

【0077】

[0081] ベクターのDNAは、従来の形質転換法を介して原核細胞へと導入することもでき、トランスフェクション法を介して真核細胞へと導入することもできる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトする適切な方法は、Sambrrookら(1989)、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview、N.Y.)、および他の標準的な分子生物学法についての実験室用マニュアルにおいて見出すことができる。

【0078】

[0082] 原核生物におけるタンパク質の発現は、Escherichia coliにおいて、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターを含有するベクターにより実行することが極めて多い。E. coliにおける組換えタンパク質の発現を最大化する戦略は、例えば、Gottesman(1990)「Gene Expression Technology: Methods in Enzymology」185(Academic Press、San Diego、Calif.)、119-128頁；およびWadaら(1992)Nucleic Acids Res. 20:2111-2118に見出すことができる。細胞に由来するIL-2ムテインまたはその変異体を増殖させるか、採取するか、破壊するか、または抽出する過程は、例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第4,604,377号；同第4,738,927号；同第4,656,132号；同第4,569,790号；同第4,748,234号；同第4,530,787号；同第4,572,798号；同第4,748,234号；および同第4,931,543号に実質的に記載されている。3040

【0079】

[0083] 一部の実施形態では、組換えIL-2ムテインまたは生物学的に活性なその変異体はまた、酵母細胞またはヒト細胞などの真核生物においても作製することができる。適切な真核宿主細胞には、昆虫細胞(培養昆虫細胞(例えば、Sf9細胞))においてタンパク質を発現するのに利用可能なバキュロウイルスベクターの例には、pAcシリーズ(Smithら(1983)Mol. Cell Biol. 3:2156-2165)およびpVLシリーズ(LucklowおよびSummers(1989)Virology 170:31-39)が含まれる)；酵母細胞(酵母であるS. cerevisiaeにおける発現用のベクターの例には、pYEPsec1(Baldariら(1987)EMBO J. 6:229-234)、pMFA(50

KurjanおよびHerskowitz (1982) Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultzら (1987) Gene 54: 113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpPicZ (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) が含まれる); または哺乳動物細胞 (哺乳動物用の発現ベクターには、pCDM8 (Seed (1987) Nature 329:840) およびpMT2PC (Kaufmanら (1987) EMBO J. 6: 187: 195) が含まれる) が含まれる。適切な哺乳動物細胞には、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはCOS 細胞が含まれる。哺乳動物細胞では、発現ベクターの制御機能が、ウイルス制御エレメントによりもたらされることが多い。例えば、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびサルウイルス40に由来する。原核細胞および真核細胞のいずれにも適する他の発現系については、Sambrookら (1989) 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、16および17章 (2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.) を参照されたい。Goeddel (1990)、「Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, Calif.) も参照されたい。

【0080】

[0084] 本開示のヒトIL-2 ムテインをコードする配列は、対象の宿主細胞における発現について最適化することができる。配列のG-C含量は、宿主細胞において発現させた既知の遺伝子を参考することにより計算した、所与の細胞の宿主について平均したレベルに調整することができる。当技術分野では、コドンを最適化する方法が十分に知られている。コード配列内のコドンのうちの約1%、約5%、約10%、約25%、約50%、約75%、または最大100%が、特定の宿主細胞における発現について最適化されるように、IL-2 ムテインのコード配列内のコドンを最適化して、宿主細胞における発現を増強することができる。

【0081】

[0085] 使用に適するベクターには、細菌において用いられるT7ベースのベクター (例えば、Rosenbergら、Gene 56: 125, 1987を参照されたい)、哺乳動物細胞において用いられるpMSXND 発現ベクター (LeeおよびNathans、J. Biol. Chem. 263:3521, 1988)、および昆虫細胞において用いられるバキュロウイルス由来のベクター (例えば、Clontech, Palo Alto, Calif. 製の発現ベクターであるpBacPAK9) が含まれる。

【0082】

[0086] 一部の実施形態では、このようなベクターにおいて対象のポリペプチドをコードする核酸挿入配列を、例えば、発現が求められる細胞型に基づき選択されるプロモーターに作動可能に連結することができる。

【0083】

[0087] 発現制御配列の選択ではまた、多様な因子についても考慮するべきである。これらには、例えば、配列の相対強度、その制御可能性、および本発明のIL-2 ムテインをコードする実際のDNA配列との、とりわけ、潜在的な二次構造に関するその適合性が含まれる。宿主は、選択されたベクターとのそれらの適合性、本発明のDNA配列によりコードされる産物の毒性、それらの分泌特徴、それらがポリペプチドを適正にフォールドする能力、それらのフラグメント化または培養の要件、およびDNA配列によりコードされる産物の精製の容易さを考慮することにより選択すべきである。

【0084】

[0088] これらのパラメータのうちで、当業者は、フラグメント化により、または大スケールの動物培養物において、例えば、CHO 細胞またはCOS 7 細胞を用いて所望のDNA配列を発現する、多様なベクター / 発現制御配列 / 宿主の組合せを選択することができる。

【0085】

[0089] 一部の実施形態では、発現制御配列および発現ベクターの選択が、宿主の選択に依存する。多種多様な発現宿主 / ベクターの組合せを使用することができる。真核宿主に

有用な発現ベクターには、例えば、S V 4 0、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルスに由来する発現制御配列を伴うベクターが含まれる。細菌宿主に有用な発現ベクターには、c o l E 1、p C R I、p E R 3 2 z、p M B 9、およびそれらの派生体を含めたE . c o l iに由来するプラスミドなど、既知の細菌プラスミド、R P 4など、宿主範囲の広いプラスミド、ファージD N A、例えば、ファージラムダの多数の派生体、例えば、N M 9 8 9、ならびにM 1 3および纖維状一本鎖D N Aファージなど、他のD N Aファージが含まれる。酵母細胞に有用な発現ベクターには、2 μプラスミドおよびその派生体が含まれる。昆虫細胞に有用なベクターには、p V L 9 4 1およびp F a s t B a c（商標）1（GibcoBRL、Gaithersburg、Md.）が含まれる（Cateら、「Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells」、Cell、45、685-98頁（1986））。

【0086】

[0090] 加えて、これらのベクターでは、多種多様な発現制御配列のうちのいずれかも用いることができる。このような有用な発現制御配列は、前出の発現ベクターの構造遺伝子と関連する発現制御配列を包含する。有用な発現制御配列の例には、例えば、S V 4 0ウイルスまたはアデノウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターであるl a c系、t r p系、T A C系、またはT R C系、ラムダファージの主要なオペレーター領域およびプロモーター領域、例えば、P L、f dコートタンパク質の制御領域、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素のプロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター、例えば、P h o A、酵母接合系のプロモーター、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーター、ならびに原核細胞もしくは真核細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られる他の配列、ならびにこれらの多様な組合せが含まれる。

【0087】

[0091] T 7プロモーターは、細菌において用いることができ、ポリヘドリンプロモーターは、昆虫細胞において用いることができ、サイトメガロウイルスプロモーターまたはメタロチオネインプロモーターは、哺乳動物細胞において用いることができる。高等真核生物の場合はまた、組織特異的プロモーターおよび細胞型特異的プロモーターも広く入手可能である。これらのプロモーターは、それらが体内の所与の組織または細胞型における核酸分子の発現を指示する能力のためにそのように名づけられている。当業者は、核酸の発現を指示するのに用いる多数のプロモーターおよび他の制御エレメントについて十分に承知している。

【0088】

[0092]挿入された核酸分子の転写を容易にする配列に加えて、ベクターは、複製起点および選択マーカーをコードする他の遺伝子も含有しうる。例えば、ネオマイシン耐性(ne o^r)遺伝子は、それが発現する細胞にG 4 1 8耐性を付与し、したがって、トランスクレプトされた細胞の表現型の選択を可能とする。当業者は、所与の制御エレメントまたは選択マーカーが特定の実験の文脈において用いるのに適切であるかどうかを容易に決定することができる。

【0089】

[0093]本発明において用いるウイルスベクターには、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴のベクター、ヘルペスウイルスベクター、サルウイルス40(SV40)ベクター、およびウシパピローマウイルスベクターが含まれる（例えば、Gluzman（編）、「Eukaryotic Viral Vectors」、CSH Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.を参照されたい）。

【0090】

[0094]突然変異体のI L - 2ポリペプチドをコードする核酸分子を含有および発現する原核細胞または真核細胞もまた、本発明の特色である。本発明の細胞は、トランスクレットした細胞、すなわち、核酸分子、例えば、突然変異体のI L - 2ポリペプチドをコードする核酸分子を組換えD N A法を介して導入した細胞である。また、このような細胞の後

代も、本発明の範囲内にあると考えられる。

【0091】

[0095] 発現系の正確な構成要素は、それほど重要ではない。例えば、突然変異体のIL-2ポリペプチドは、細菌であるE.coliなどの原核宿主において生成させることもでき、昆虫細胞（例えば、Sf21細胞）または哺乳動物細胞（例えば、COS細胞、NIH 3T3細胞、またはHeLa細胞）などの真核宿主において生成させることもできる。これらの細胞は、American Type Culture Collection (Manassas, Va.)を含めた多くの供給源から入手可能である。発現系の選択では、構成要素が互いに適合的であることのみが重要である。当業者は、このような決定を下すことが可能である。さらに、発現系を選択するのに指針を必要とする場合、当業者は、Ausubelら（「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、New York、N.Y.、1993）およびPouwelsら（「Cloning Vectors: A Laboratory Manual」、1985、増補版1987）を参考にすることができる。10

【0092】

[0096] 発現させたポリペプチドは、日常的な生化学的手順を用いて発現系から精製し、例えば、本明細書で記載される療法剤として用いることができる。

【0093】

[0097] 一部の実施形態では、得られるIL-2ムテインを、ムテインを生成させるのに用いられる宿主生物に応じてグリコシリ化または非グリコシリ化させる。宿主として細菌を選択する場合は、生成させるIL-2ムテインを非グリコシリ化させる。他方、真核細胞は、おそらく天然のIL-2がグリコシリ化するのとは別の形ではあるが、IL-2ムテインをグリコシリ化させる。形質転換された宿主を介して生成するIL-2ムテインは、任意の適切な方法により精製することができる。IL-2を精製するための多様な方法が知られている。例えば、「Current Protocols in Protein Science」、2巻、John E. Coligan、Ben M. Dunn、Hidde L. Ploehg、David W. Speicher、Paul T. Windingfield編、ユニット6.5（著作権：1997、John Wiley and Sons, Inc.）を参照されたい。IL-2ムテインは、E.coliにおいて生成させる封入体から単離することもでき、カチオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltrationクロマトグラフィー、および/または逆相液体クロマトグラフィーを用いて所与のムテインを生成させる哺乳動物培養物または酵母培養物に由来する条件付け培地から単離することもできる。2030

【0094】

[0098] IL-2ムテインをコードするDNA配列を構築する別の例示的な方法は、化学合成を介する。これには、記載される特性を示すIL-2ムテインをコードするタンパク質配列の、化学的手段による直接的なペプチド合成が含まれる。この方法は、IL-2のIL-2R_α、IL-2R_β、および/またはIL-2R_γとの相互作用に影響を及ぼす位置において、天然のアミノ酸および非天然のアミノ酸の両方を組み込みうる。代替的に、所望のIL-2ムテインをコードする遺伝子は、オリゴヌクレオチド合成機を用いる化学的手段を介して合成することができる。このようなオリゴヌクレオチドは、所望のIL-2ムテインのアミノ酸配列に基づきデザインし、組換えムテインを生成させる宿主細胞において好適なコドンを優先的に選択する。この点で、遺伝子コードは縮重であること（アミノ酸は複数のコドンによりコードされうること）が十分に認識されている。例えば、Phenylalanine (F)は、2つのコドンであるTICまたはTTTによりコードされ、Tyrosine (Y)は、TACまたはTATによりコードされ、Histidine (H)は、CACまたはCATによりコードされる。Tryptophan (W)は、単一のコドンであるTGGによりコードされる。したがって、特定のIL-2ムテインをコードする所与のDNA配列について、そのIL-2ムテインをコードする多くの縮重のDNA配列が存在することが理解される。例えば、図2に示されるムテイン5-2に好ましいDNA配列に加えて、示されるIL-2ムテインをコードする多くの縮重のDNA配列が存在することが理解される。これらの縮重のDNA配列も、本開示の範囲内にあると考えられる。したがって、本発明の文脈における「そ4050

の縮重の変異体」とは、特定のムテインをコードし、これにより、その発現を可能とする全てのDNA配列を意味する。

【0095】

[0099] IL-2ムテインの生物学的活性は、当技術分野で知られる任意の適切な方法を介してアッセイすることができる。このようなアッセイには、PHA-blasts増殖およびNK細胞増殖が含まれる。

【0096】

治療法

[00100] 一部の実施形態では、突然変異体IL-2のポリペプチドおよび/またはそれらを発現する核酸を対象に投与して、アポトーシス過程または分化過程の異常と関連する障害を治療する（例えば、能動的免疫または受動的免疫を生成させることにより、例えば、がんなどの細胞増殖障害または細胞分化障害を治療する）ことができる。このような疾患の治療において、開示されるIL-2ムテインは、血管漏出症候群の軽減などの有利な特性を保有する。10

【0097】

[00101] 細胞増殖障害および/または細胞分化障害の例には、がん（例えば、がん腫、肉腫、転移性障害、または造血系の新生物性障害、例えば、白血病）が含まれる。転移性腫瘍は、前立腺、結腸、肺、乳房、および肝臓の腫瘍が含まれるがこれらに限定されない、多数の原発性腫瘍型から生じうる。本発明の組成物（例えば、突然変異体のIL-2ポリペプチドおよび/またはそれらをコードする核酸分子）はまた、ウイルス感染（例えば、AIDSインフルエンザ）を有する患者にも投与することができる。20

【0098】

[00102] 突然変異体のIL-2ポリペプチドを用いて、腎がんもしくは黒色腫、または任意のウイルス疾患を含めた任意の種類のがんを有するか、これを有することが疑われるか、またはこれを発症する危険性が高い可能性がある患者を治療することができる。例示的ながん腫には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸、および卵巣の組織から形成されるがん腫が含まれる。この用語また、がん腫性組織および肉腫性組織からなる悪性腫瘍を包含するがん肉腫も包含する。

【0099】

[00103] 増殖性障害のさらなる例には、造血系の新生物性障害が含まれる。30

【0100】

[00104] 他の増殖性障害および/または分化障害の例には、皮膚障害が含まれる。皮膚障害は、真皮層、表皮層、または皮下層における細胞もしくは細胞群または層群の活性異常を伴う場合もあり、真皮-表皮間接合部における異常を伴う場合もある。例えば、皮膚障害は、ケラチン生成細胞（例えば、基底層および基底層直上の過剰増殖性ケラチン生成細胞）、メラニン生成細胞、ランゲルハンス細胞、メルケル細胞、免疫細胞、および表皮層、例えば、基底層（stratum basale (stratum germinativum)）、有棘層、顆粒層、透明層、または角質層のうちの1または複数において見出される他の細胞の活性異常を伴う。他の実施形態では、障害が真皮細胞、例えば、真皮層、例えば、乳頭層または網状層において見出される、真皮内皮細胞、真皮線維芽細胞、真皮免疫細胞（例えば、マスト細胞またはマクロファージ）の活性異常を伴う。40

【0101】

[00105] 皮膚障害の例には、乾癬、乾癬性関節炎、皮膚炎（湿疹）、例えば、剥脱性皮膚炎、またはアトピー性皮膚炎、毛孔性紅色斑糠疹、バラ色斑糠疹、類乾癬、苔癬状斑糠疹、扁平苔癬、光沢苔癬、魚鱗癬様紅皮症、角皮症、皮膚疾患、円形脱毛症、壞疽性膿皮症、尋常性白斑、類天疱瘡（例えば、眼部瘢痕性類天疱瘡または水疱性類天疱瘡）、尋常性白斑、汗孔角化症、関節包を満たす上皮関連細胞の過剰増殖および炎症を伴う関節リウマチ；脂漏性皮膚炎および日光皮膚炎などの皮膚炎；脂漏性角化症、老人性角化症、光線角化症、光誘起角化症、および毛包性角化症などの角化症；尋常性ざ瘡；ケロイドおよびケロイド形成に対する予防；母斑；疣贅、コンジローマまたは尖圭コンジローマ、および性病

疣などのヒトパピローマウイルス(HPV)感染を含めた疣;白板症;扁平苔癬;および角膜炎が含まれる。皮膚障害は、皮膚炎、例えば、アトピー性皮膚炎またはアレルギー性皮膚炎の場合もあり、乾癬の場合もある。

【0102】

[00106] 治療に適する患者はまた、乾癬を有する場合もある。「乾癬」という用語は、その医学的意味、すなわち、主に皮膚が罹患し、隆起性、肥厚性、落屑性、非瘢痕性の病変をもたらす疾患という意味を有することが意図される。病変は通常、重なり合い光沢のある落屑で覆われる、輪郭の鮮明な紅斑性丘疹である。落屑は、銀色がかっているか、わずかに乳白色であることが典型的である。爪の病変が高頻度で生じ、結果として陥凹、爪甲剥離、肥厚、および変色をもたらす。乾癬は、関節炎と関連する場合があり、麻痺性でありうる。ケラチン生成細胞の過剰増殖は、表皮炎症およびケラチン生成細胞の分化の減殺と共に乾癬性表皮過形成の重要な特色である。ケラチン生成細胞の過剰増殖を説明するのに、乾癬を特徴づける複数の機構が提起されている。乾癬の発症機序にはまた、細胞性免疫の障害も関与している。乾癬性障害の例には、慢性定常性乾癬、尋常性乾癬、発疹性(滴状)乾癬、乾癬性紅皮症、汎発性膿疱性乾癬(ツンブッシュ全身性膿疱性乾癬)、環状膿疱性乾癬、および限局性膿疱性乾癬が含まれる。10

【0103】

[00107] 代替的に、または患者へと直接的に投与する方法に加えて、一部の実施形態では、突然変異体のIL-2ポリペプチドを、*ex vivo*法において用いることができる。例えば、細胞(例えば、末梢血リンパ球、または患者から単離され、培養物中に静置されるかもしくは維持される精製されたリンパ球の集団)は、*in vitro*の培養培地中で培養することができ、接触させる工程は、IL-2突然変異体を培養培地へと添加することから影響を受ける場合がある。培養工程は、細胞を他の薬剤で刺激または処理して、例えば、増殖を刺激するか、または対象の抗原(例えば、がん抗原またはウイルス抗原)に対して反応性である細胞集団を増殖させるさらなる工程を包含しうる。次いで、細胞を、それらを処理した後で患者へと投与する。20

【0104】

医薬組成物および投与法

[00108] 一部の実施形態では、突然変異体のIL-2ポリペプチドおよび核酸を、医薬組成物を含めた組成物へと組み込むことができる。このような組成物は、ポリペプチドまたは核酸分子および薬学的に許容可能な担体を包含することが典型的である。30

【0105】

[00109] 医薬組成物は、その意図される投与経路に適合的となるように調合する。本発明の突然変異体のIL-2ポリペプチドは、経口でも施しうるが、非経口経路を介して投与する可能性の方が大きい。非経口投与経路の例には、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経皮(局所)投与、経粘膜投与、および直腸内投与が含まれる。非経口適用に用いられる溶液または懸濁液は、以下の成分を包含しうる:注射用水、生理食塩液、固定油、ポリエチレンジリコール、グリセリン、プロピレンジリコール、または他の合成溶媒など、滅菌の希釈剤;ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤;アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤;エチレンジアミンテトラ酢酸などのキレート化剤;酢酸、クエン酸、またはリン酸などの緩衝剤;および塩化ナトリウムまたはデキストロースなど、等張性を調整するための薬剤。pHは、一塩基性リン酸ナトリウムおよび/もしくは二塩基性リン酸ナトリウム、塩酸、または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整する(例えば、約7.2~7.8、例えば、7.5のpHまで)。非経口調製物は、アンプル、ディスポーザブルの注射器、またはガラスもしくはプラスチックで作製された複数回投与用のバイアルに封入することができる。40

【0106】

[00110] 注射用に適する医薬組成物には、滅菌水溶液(水溶性の場合)または滅菌分散液および滅菌注射用溶液もしくは滅菌注射用分散液を即席で調製するための滅菌粉末が含まれる。静脈内投与では、適切な担体が、生理食塩液、静菌水、Cremophor E50

L（商標）（BASF、Parsippany、N.J.）、またはリン酸緩衝生理食塩液（PBS）を包含する。全ての場合において、組成物は、滅菌であり、容易な注射針通過可能性が存在する程度まで流体であるものとする。担体は、製造条件下および保管条件下において安定であるものとし、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から防護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレン glycolなど）、およびこれらの適切な混合物を含有する、溶媒の場合もあり、分散媒の場合もある。例えば、レシチンなどのコーティングを用いることにより、分散液の場合には必要とする粒子サイズを維持することにより、および界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウムを用いることにより、適正な流体性を維持することができる。微生物作用の防止は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなど、多様な抗菌剤および抗真菌剤により達成することができる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウムを包含することが好ましいであろう。注射用組成物の遅延吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組み入れることによりもたらすことができる。10

【0107】

[00111] 滅菌注射用溶液は、適切な溶媒中に、必要とする量の活性化合物を、必要に応じて、上記で列挙した成分のうちの1つまたは組合せと共に組み込んだ後、濾過による滅菌処理を施すことにより調製することができる。一般に、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒と、上記で列挙した成分に由来する、必要とする他の成分とを含有する滅菌媒体へと組み込むことにより調製する。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、任意のさらなる所望の成分を有効成分に加えた粉末を、既に滅菌濾過したその溶液から生成させる、真空乾燥および凍結乾燥である。20

【0108】

[00112] 用いられる場合、経口組成物は一般に、不活性の希釈剤または可食性の担体を包含する。経口療法剤投与の目的では、活性化合物を賦形剤と共に組み込むことができ、錠剤、トローチ、またはカプセル、例えば、ゼラチンカプセルのフォームで用いる。経口組成物はまた、口内洗浄液として用いられる流体の担体を用いて調製することもできる。薬学的適合性の結合剤および/または補助剤物質を、組成物の一部として組み入れることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、性質が類似する以下の成分または化合物のうちのいずれかを含有しうる：結晶セルロース、トラガントガム、もしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogel（商標）、もしくはトウモロコシデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはStereotex（商標）などの潤滑剤；コロイド状の二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香味剤などの芳香剤。30

【0109】

[00113] 吸入投与の場合、突然変異体のIL-2ポリペプチドまたはそれらをコードする核酸は、適切な高圧ガス、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する加圧容器もしくは分注器または噴霧器からのエアゾールスプレーのフォームで送達する。このような方法には、米国特許第6,468,798号において記載される方法が含まれる。40

【0110】

[00114] 突然変異体のIL-2ポリペプチドまたは核酸の全身投与はまた、経粘膜手段または経皮手段も介しうる。経粘膜投与または経皮投与では、透過される障壁に適切な浸透剤を処方物中で用いる。当技術分野では、このような浸透剤が一般に知られており、これらには、例えば、経粘膜投与では、洗浄剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻腔内スプレーまたは坐剤の使用を介して達成することができる。経皮投与では、活性化合物を、当技術分野で一般に知られる軟膏（ointments、salves）、ゲル、またはクリームへと調合する。

【0111】

50

[00115] 一部の実施形態ではまた、化合物（突然変異体のIL-2ポリペプチドまたは核酸）を、坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなど、従来の坐剤ベースを伴う）または直腸内送達用の停留浣腸のフォームで調製することもできる。

【0112】

[00116] 一部の実施形態では、化合物（突然変異体のIL-2ポリペプチドまたは核酸）はまた、McCaffreyら(Nature 418:6893, 2002)、Xiaら(Nature Biotechnol. 20: 1006-1010, 2002)、またはPutnam(Am. J. Health Syst. Pharm. 53: 151-160, 1996; Am. J. Health Syst. Pharm. 53:325, 1996に訂正掲載)において記載されている方法が含まれるがこれらに限定されない、当技術分野で知られる方法を用いるトランسفエクションまたは感染を介して投与することもできる。 10

【0113】

[00117] 一実施形態では、突然変異体のIL-2ポリペプチドまたは核酸を、インプラントおよびマイクロカプセル化された送達系を含めた制御放出処方物など、突然変異体のIL-2ポリペプチドを体内からの急速な消失から保護する担体と共に調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生体分解性ポリマー、生体適合性ポリマーを用いることができる。このような処方物は、標準的な技法を用いて調製することができる。材料もまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販されている。また、リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を感染させた細胞を標的とするリポソームを含めた）も、薬学的に許容可能な担体として用いることができる。例えば、米国特許第4,522,811号において記載される通り、これらは、当業者に知られる方法に従い調製することができる。 20

【0114】

[00118] このような突然変異体のIL-2ポリペプチドまたは核酸化合物の用量、毒性、および治療有効性は、例えば、LD₅₀（集団のうちの50%に対して致死的な用量）およびED₅₀（集団のうちの50%において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物による標準的な薬学的手順を介して決定することができる。毒性作用と治療効果との用量比が治療指数であり、これは、比LD₅₀/ED₅₀として表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物も用いられるが、非感染細胞への潜在的な損傷を最小化し、これにより、副作用を軽減するためには、罹患組織部位をこのような化合物の標的とする送達系をデザインするように注意を払うべきである。 30

【0115】

[00119] 細胞培養物によるアッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおいて用いられる用量の範囲を処方するのに用いることができる。このような化合物の用量は、毒性をほとんどまたは全く伴わないED₅₀を包含する循環濃度の範囲内にあることが好ましい。用量は、使用される剤形および使用される投与経路に応じてこの範囲内で変化させることができる。本明細書の方法で用いられる任意の化合物の場合、治療有効用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて処方して、細胞培養物中で決定されるIC₅₀（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する被験化合物の濃度）を包含する循環血漿濃度の範囲を達成することができる。このような情報を利用してヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。 40

【0116】

[00120] 本明細書で規定される治療有効量の突然変異体IL-2ポリペプチド（すなわち、有効用量）は、選択されるポリペプチドに依存する。例えば、患者体重1kg当たり約0.001~0.1mgの範囲の単回投与量を投与することができるが、一部の実施形態では、約0.005、0.01、0.05mg/kgを投与することもできる。一部の実施形態では、600,000IU/kgを投与する（IUは、リンパ球増殖バイオアッセイを介して決定することができ、The World Health Organiz 50

ation 1st International Standard for Interleukin 2 (human)により確立された国際単位(IU)で表される)。この用量は、PROLEUKIN(登録商標)に処方された用量と同様でありうるが、これより少ないと予測される。組成物は、隔日1回を含め、毎日1回～1または複数回～毎週1または複数回投与することができる;当業者は、疾患もしくは障害の重症度、既往の治療、全般的な健康、および/または対象の年齢、ならびに存在する他の疾患が含まれるがこれらに限定されない特定の因子が、対象を有効に治療するのに必要とする用量およびタイミングに影響を及ぼしうることを理解するであろう。さらに、治療有効量の本発明の突然変異体IL-2ポリペプチドによる対象の治療は、単回の治療を包含する場合もあり、一連の治療を包含する場合もある。一実施形態では、組成物を8時間ごとに5日間にわたり投与した後、2～14日間、例えば、9日間の休薬期間に統いて、さらに8時間ごとに5日間にわたり投与する。

【0117】

[00121] 医薬組成物は、投与のための指示書と併せて、容器内、パック内、または分注器内に組み入れられる。

【実施例】

【0118】

[00122] 本発明は、非限定的な例として用いられる以下の研究においてさらに記載され、これらにより例示される。

【0119】

(実施例1)

酵母の表面におけるIL-2の機能的発現

[00123] IL-2は既にバクテリオファージ上で提示されている(Buchliら、Arch. Biochem. Biophys. 339:79-84、1997)が、このかつての系は、指向的進化に適さず、したがって、IL-2Rのサブユニットに対する結合を改善したIL-2の突然変異体を得るのには適切でない。これを克服するため、IL-2を、酵母細胞の表面で発現させた。ヒトIL-2 DNAを、酵母用ディスプレイベクターであるpCT302へとクローニングした。Saccharomyces cerevisiaeのEBY100株を、pCT302_IL-2ベクターで形質転換し、SD-CAAプレート上、30℃で3日間にわたり増殖させた。IL-2酵母の個別のコロニーを、SD-CAA中、30℃で一晩にわたり増殖させ、次いで、20℃で2日間にわたりSGCAAに導入した。酵母を、四量体化されたビオチニル化IL-2R、ビオチニル化、またはビオチニル化の存在下におけるビオチニル化IL-2Rで染色した。IL-2Rおよびの細胞外ドメインをC末端においてビオチニル化し、染色分取試薬として用いられるフィコエリトリンコンジュゲートストレプトアビシンに連結した。IL-2Rの四量体は、2μgのビオチニル化IL-2Rを、氷上で15分間にわたり470nMのストレプトアビシン-フィコエリトリン(SA-PE、Invitrogen)と共にインキュベートすることにより形成した。これらの受容体の「四量体」は、単量体の細胞外ドメイン(ECD)によるIL-2との低アフィニティの相互作用のアビディティーを増強し、ライプラリーからのIL-2変異体の最大限の回収を可能とした。溶体の野生型IL-2と同様に、IL-2R単独に弱く結合する、酵母により提示されるIL-2は、単独には全く結合せず、フローサイトメトリー(データは示さない)により見られる対角染色を介して証拠立てられる通り、IL-2Rの存在下では、に結合した。したがって、酵母により提示されるIL-2は、可溶性のIL-2と共に見られる、細胞上におけるヘテロ二量体の受容体複合体の協調的アセンブリーを再現する(recapitulate)ものであり、したがって、ライプラリーによる選択のためのプラットフォームとして適する。

【0120】

(実施例2)

IL-2突然変異体ライプラリーの構築およびスクリーニング

[00124] 第1世代のin vitro戦略は、IL-2遺伝子全体のエラープローンP

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

第1世代のIL-2ライプラリーの選択：ライプラリーは、IL-2Rに対する6回にわたる選択ラウンドにかけた（図2A）。第1ラウンドでは、ライプラリーを、 $2\text{ }\mu\text{M}$ のビオチニル化されたIL-2Rを 470 nM のストレプトアビジン-フィコエリトリンコンジュゲート（SAV-PE）と15分間にわたり混合することにより形成した 470 nM の四量体のIL-2Rで標識した。ライプラリーを、IL-2Rと共に1.5時間にわたりインキュベートし、PBS-BSA緩衝液（リン酸緩衝生理食塩液+ウシ血清アルブミン）で洗浄し、Miltenyi抗PE MicroBeadsと共に4で20分間にわたりインキュベートした。細胞を再度洗浄し、選択用の磁気カラムを通過させた。IL-2Rの濃度（ラウンド2： $1\text{ }\mu\text{M}$ 、ラウンド3： $1\text{ }\mu\text{M}$ 、ラウンド4： 300 nM 、ラウンド5： 300 nM 、ラウンド6： 100 nM 、全て単量体のIL-2R）のみを変更して、この選択法をさらに5回にわたり反復することに成功した。選択が終了したら、ラウンド5およびラウンド6の酵母培養物をSD-CAAプレート上に塗布したが、これにより、個別の酵母コロニーがもたらされた。結果として得られる18の酵母コロニーを、 500 nM のIL-2Rへの結合について調べた。これらの18の酵母コロニーから単離されたIL-2DNAを、配列決定した。これらの18の酵母コロニーの間の、野生型IL-2の対応する残基と比べたアミノ酸の差違を、表1に示す。

【 0 1 2 2 】

【表1】

表1

残基番号 野生型IL-2	5	34	43	61	74	75	77	81	85	103	106	112	120
	S	P	K	E	Q	S	N	R	L	F	E	A	R
5_1						R							
5_2												V	
5_3												V	
5_4								K				Y	D
5_5												V	
5_6				R									S
5_8(野生型)							R						
5_9												V	
5_10													
6_1											V		
6_2									R	R			
6_3				N									
6_4											V		
6_5											V		
6_6											V		
6_7									I		V		
6_8					K						V		
6_10	T										V		

【0123】

第2世代のIL-2ライブラリーのライブラリー構築: L 8 5 Vを含有するクローニングの比率が高いことに基づき、第2のIL-2ライブラリーを、主に疎水性のコア残基に焦点を当てて構築した。Q 7 4、L 8 0、R 8 1、L 8 5、I 8 6、I 8 9、I 9 2、V 9 3において突然変異を伴う部位指向的IL-2ライブラリーを構築した。Q 7 4は、H / K / N / Q / R / Sとして変化させた。R 8 1は、縮重のNNKコドンを伴う20アミノ酸の全てにおいて変化させた[配列中、Nは、アデニヌクレオシド、チミンヌクレオシド、グアニヌクレオシド、およびシトシンヌクレオシドの各々による25%のミックスを表し、Kは、グアニンまたはチミンである]。残りの残基は、F / I / L / Vとして変化させた。ライブラリーは、以下のオリゴを用いるアセンブリーPCRにより構築した。

【0124】

10

20

30

【化3】

IL-2_affmat_ass01

GCACCTACTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACGGAGCA

IL-2_affmat_ass02

CAAAATCATCTGTAAATCCAGAAGTAAATGCTCCAGTTGTAGCTGTG

IL-2_affmat_ass03

GGATTACAGATGATTGAATGGAATTAATAATTACAAGAACCCAA

10

IL-2_affmat_ass04B

AACTTAGCTGTGAGCCTGGTGAGTTGGGATTCTTGTAAATTATT

IL-2_affmat_ass05BGGATGCTCACAGCTAAGTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTG**IL-2_affmat_ass06**

GTTCTTCTTAGACACTGAAGATGTTCAGTTCTGTGGCCTTCTG

IL-2_affmat_ass07

CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTAA

20

IL-2_affmat_ass08 GTGAAAGTTTGCTSYKAGCTAAATTAGCACTCCTCC**IL-2_affmat_ass09**AGCAAAAACTTCACNTTCNNKCCCAGGGACNTNCNTCAGCAATNTCAACGTAN
TCCTGGAACTAAAGGGATC**IL-2_affmat_ass10**

CATCAGCATATTCACACATGAATGTTTCAGATCCCTTAGTCCAG

30

IL-2_affmat_ass11

ATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTCTGAACA

IL-2_affmat_ass12AGATGATGCTTGACAAAAGGTAATCATCTGTCAGAAATTCTACAAT**IL-2_affmat_ass13** TTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACTGGATCCTCTGGI

【0125】

部位指向的PCRは、以下のオリゴにより増幅した：

40

PCR増幅オリゴ(5'0bpの相同性を包む)

【0126】

【化4】

IL-2_site2_assFor:

5'-

AGTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCGCACC
TACTTCAAGTTCTAC-3'

IL-2_site2_assRev:

5'-

ACACTGTTGTTATCAGATCTCGAGCAAGTCTTCGGAGATAAGCTTTGTTGCCACCA
GAGGATCC-3'

10

【0127】

P C Rにより、D N A 4 0 μ gがもたらされ、これを二重消化されたp C T 3 0 2およびエレクトロコンピテントのE B Y 1 0 0 酵母と混合し、第1世代のライブラリーの場合と同様に電気穿孔した。

【0128】

第2世代のI L - 2 ライブラリーの選択：ライブラリーを、I L - 2 R に対する5回にわたる選択ラウンドにかけた(図2B)。この選択法は、用いられるI L - 2 R の濃度に対する改変(ラウンド1:1 μ M、ラウンド2:1 0 0 n M、ラウンド3:3 0 n M、ラウンド4:3 0 n M、ラウンド5:1 0 n M、全て単量体のI L - 2 R)を伴うことを除き、第1世代のライブラリーの場合と全く同様に実施した。選択が終了したら、ラウンド4およびラウンド5の酵母培養物をS D - C A A プレート上に塗布したが、これにより、個別の酵母コロニーがもたらされた。両方のラウンドに由来する4 8の個別の酵母クローンを9 6 ウエルのブロックフォーマットで増殖させ、5 n MのI L - 2 R 、次いで、S A V - P Eで標識することによりスクリーニングした。スクリーンは、I L - 2 R に対する7つの高アフィニティー結合剤をもたらした。これらの7つの高アフィニティー結合剤の間の、野生型I L - 2 の対応する残基と比べたアミノ酸の差違を、I L - 2 R に対する結合アフィニティーと共に表2に示す。

20

【0129】

30

【表2】

表2

残基番号	74	80	81	85	86	89	92	93	K _d (nM)
野生型IL-2	Q	L	R	L	I	I	I	V	280
B1	N	F	D	V	V	V	F		1.6
C5	N	V	T	V	V		F		10
D10	H	F	D	V	V		F		1.2
E10	S	F	D	V	V		F		1.3
G8	N	F	D	V	V		F		1.5
H4	S		T	V			F		14
H9		F	D	V	V		F		1.3
コンセンサス		F	D	V	V		F		20

【0130】

(実施例3)

IL-2△テインタンパク質の発現および精製

[00125] ヒトIL-2変異体(アミノ酸1~133)、IL-2R細胞外ドメイン(アミノ酸1~214)、および_c(アミノ酸34~232)を、N末端のgp67シグナル配列およびC末端のヘキサヒスチジンタグとインフレームでpAcGp67-Aベクター(BD Biosciences)へとクローニングし、バキュロウイルスによる発現系を用いて生成させた。バキュロウイルスの原液は、SF900II培地(Invitrogen)中で増殖させたSpodoptera frugiperda(Sf9)細胞におけるトランスフェクションおよび增幅により調製し、タンパク質の発現は、Biowhittaker(登録商標)昆虫XPRESS(商標)培地(Lonza)中で増殖させたTrichoplusia ni(High Five(商標))細胞懸濁液中で実行した。タンパク質を発現させ、ニッケルアガロース(QIAGEN)を介する48~60時間後のHigh Five(商標)上清から捕捉し、10mMのHEPES(pH7.2)および150mMのNaCl中で平衡化したSuperdex 200カラム(GE Healthcare)によるサイズ除外クロマトグラフィーを介して濃縮および精製した。SPRおよび細胞ベースのアッセイで用いられるIL-2変異体は、完全にグリコシリ化させて発現させた。ビオチニル化させた受容体の発現では、IL-2Rおよび_cを、C末端ビオチンアクセプターベプチド(BAP)(LNDIFEAQKIEWHE)およびヘキサヒスチジンタグと共にpAcGp67-Aベクターへとクローニングした。受容体タンパク質は、過剰なビオチン(100uM)を伴うBirAリガーゼと共に共発現させた。

【0131】

(実施例4)

CD25⁻ナチュラルキラー(YT-1)細胞およびCD25⁺ナチュラルキラー(YT-1)細胞の刺激

[00126] YT-1細胞およびCD25⁺YT-1細胞を、10%のウシ胎仔血清、2mMのL-グルタミン、最小限の非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、25mMのHEPES、およびペニシリン-ストレプトマイシン(Gibco)を補充した RPMI 1640

30

40

50

培地中に培養した。CD₂₅⁺YT-1細胞は、以下の通りに精製した：1×10⁷個の細胞をFACS緩衝液（リン酸緩衝生理食塩液+2%のウシ血清アルブミン）で洗浄し、FACS緩衝液1mL中、4℃で20分間にわたり、PEとコンジュゲートした抗ヒトCD₂₅（1:20；Biolegend、San Diego、CA）で染色した。染色された細胞を抗PE IgGへと連結された常磁性マイクロビーズで標識し、製造元（Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany）の指示書に従い、LS-MACS（登録商標）分離カラムにより分離した。溶出させた細胞を、完全 RPMI培地中に1×10⁵個の細胞濃度で再懸濁させ、後続の実験のために増殖させた。細胞の濃縮は、Accuri（登録商標）C6フローサイトメーターを用いて、FL-2チャネルによるフローサイトメトリーを介してモニタリングした。

10

【0132】

[00127] YT-1細胞に対するH9、D10、および6-6の用量反応関係は、フローサイトメトリーによりSTAT5のリン酸化をアッセイすることにより決定した（図4aおよび4b）。CD₂₅⁺YT-1細胞またはCD₂₅⁻YT-1細胞をFACS緩衝液で洗浄し、96ウェルプレート内のFACS緩衝液200μL中に表示される濃度の野生型、6-6、H9、またはD10と共に再懸濁させた。細胞を室温で20分間にわたり刺激し、次いで、ホルムアルデヒドを1.5%まで添加することにより固定し、10分間にわたりインキュベートした。氷上で20分間にわたり、100%の氷冷メタノールで細胞を透過処理した後、-80℃で一晩にわたりインキュベーションした。固定されて透過処理された細胞を過剰なFACS緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液中で1:20に希釈した、Alexa647コンジュゲート抗STAT5 pY694（BD Biosciences、San Jose、CA）50μLと共に20分間にわたりインキュベートした。細胞をFACS緩衝液中で2回にわたり洗浄し、Accuri（登録商標）C6フローサイトメーターのFL-4チャネルを用いて細胞の平均蛍光発光を決定した。

20

【0133】

[00128] IL-2の42位におけるフェニルアラニンからアラニンへの十分に特徴づけられた突然変異（F42A）であって、CD₂₅への結合は消失させるが、IL-2R_αまたはIL-2R_βに結合するその能力には影響を及ぼさない突然変異（Mott、1995）を利用することにより、IL-2ムテイン（いわゆる「スーパー2」分子）のCD₂₅非依存性についてさらに調べた。この突然変異はH9ムテインにも導入し、H9/F42Aを得た。IL-2、IL-2/F42A、H9、およびH9/F42Aによる、CD₂₅-YT-1細胞およびCD₂₅⁺YT-1細胞に対するSTAT誘導の比較を実施した（図5）。IL-2/F42A突然変異は、CD₂₅⁺細胞に対する野生型IL-2の用量反応曲線を約110g右側にシフトさせたが、F42A突然変異は、CD₂₅-細胞におけるSTAT誘導に対する観察可能な効果を及ぼさなかった（図5a）。これに対して、H9およびH9/F42Aについての用量反応曲線は、CD₂₅-細胞およびCD₂₅⁺細胞のいずれにおいても本質的に重なり合った。したがって、これらの実験は、IL-2ムテインが、見かけ上はCD₂₅の存在から利益を受けないが、それらの活性は、CD₂₅のインターフェースを破壊する突然変異に対して非感受性であることを裏付ける。

30

【0134】

40

（実施例5）

CD₂₅-T細胞およびCD₂₅⁺T細胞刺激

[00129]ヒトおよびマウスのCD₄-T細胞を、BALB/CマウスのPBM（Stanford Blood Bank）、脾臓、およびリンパ節から、それぞれ、抗体でコーティングされたCD₄-T細胞単離用磁気ビーズ（Stem Cell TechnologiesおよびMiltenyi Biotec）を用いて調製した。天然細胞刺激アッセイでは、細胞を即座に用いた。in vitroにおいて「抗原経験のある(experienced)」T細胞世代を生成するために、100ng/mLの抗CD3（ヒトにはOKT3であり、マウスには2C11である；eBiosciences）でプレートをコーティングする前に、ウェルを、pH 9.6の重炭酸緩衝液中の二次抗体（Vector Labs）であらかじめコーティングした。T細胞を、可溶性の抗CD28（ヒトにはCD28.2であ

50

り、マウスには37.51である；eBiosciences）と共に、ウェル1つ当たり 0.1×10^6 個の細胞で播種した。細胞を、刺激された完全なT C Rと共に3日間にわたり培養した後、条件付け培地内で2日間にわたり静置し(rest)、新鮮な培養培地内で2日間にわたり静置した。使用前に、L y m p h o l y t e - M (Cederlane)による遠心分離を介して生細胞を回収し、カウントした。

【0135】

[00130] CD25の発現が欠損するT細胞またはCD25を発現するT細胞に対するIL-2ムテインの活性を評価した(図6)。野生型IL-2および6つのIL-2ムテインの用量反応関係を、1ng/ml～1000ng/mlの範囲のタンパク質濃度におけるSTAT5のリン酸化についてアッセイした。IL-2ムテインがCD25欠損T細胞におけるSTAT5のリン酸化を刺激する能力は、それらのIL-2Rに対するアフィニティーと良好に相関した。IL-2ムテインによるSTAT5のリン酸化の増大は、IL-2より2桁大きかった。

10

【0136】

[00131] また、IL-2ムテインが、大量の完全IL-2受容体複合体であるCD25(IL-2R)、IL-2R_cを発現する、抗原経験のあるヒトCD4+T細胞におけるSTAT5のリン酸化を刺激する能力も評価した(図7)。ヒトCD4+T細胞をin vitroにおいてTCR刺激し、静置し、「抗原経験のある」ヒトCD4+CD25+Tリンパ球を生成させた。1ng/mlでは、STAT5リン酸化の差違がほとんど観察されなかった。野生型を含めた各IL-2変異体により、細胞のうちの90%超を刺激した。0.1ng/mlでは、わずかな差違が観察された。野生型IL-2は、48%のpSTAT5刺激を結果としてもたらし、IL-2ムテインは、65～79%のpSTAT5刺激をもたらした。したがって、IL-2ムテインは、見かけ上は抗原経験のあるヒトT細胞を野生型IL-2より良好に刺激するが、増強は、CD25を欠く細胞における場合ほど顕著ではない。

20

【0137】

(実施例6)

NK細胞による細胞傷害作用アッセイ

[00132] EGFR(内皮成長因子受容体)を発現する扁平上皮がん細胞系(SCC6)と、EGFRに対するモノクローナル抗体であるセツキシマブとを用いて、D10 IL-2ムテインの、ナチュラルキラー細胞の機能、とりわけ、自発的な抗体依存性細胞介在性細胞毒性(ADCC)に対する効果を評価した。ヒトEGFR陽性扁平上皮細胞がん細胞系であるSCC6は、J.Sunwoo研究室(Stanford, CA)から恵与された。SCC6細胞系は、加熱により不活化した10%のFCS(HyClone Laboratories)、100U/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシン(いずれもInvitrogen Life Technologies製)を補充したDMEM/F12培地(Invitrogen Life Technologies)中で培養した。細胞は、5%CO₂中37°の培養物中で接着させて増殖させた。セツキシマブ(マウスキメラ抗ヒト表皮成長因子受容体(EGFR) IgG1; IMC-C225; Erbitux(登録商標))は、Bristol-Myers Squibbから購入した。

30

【0138】

[00133] クロム放出は、以下の通りに実施した：NK細胞は、約 1×10^9 個の細胞を含有する、健康なドナーによる白血球低減系(LRS)産物から単離した。NK細胞は、製造元の指示書に従いNK細胞単離用ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いる負磁気細胞分取を介して単離した。NK細胞を純度(CD3-CD56⁺フローサイトメトリーにより規定される>90%の純度)について評価した。SCC6標的細胞を細胞 1×10^6 個当たり150μCiの⁵¹Crで2時間にわたり標識した。培地単独中、セツキシマブ(100pg/ml)中、IL-2(1000IU/ml)中、IL-2 D10(1pg/ml)中、IL-2 D10(10pg/ml)中、またはセツキシマブ(100pg/ml)にIL-2(1000IU/ml)を加えた組合せ、セツキシマブ(100pg/ml)にIL-2 D10(1pg/ml)を加えた組合せ、もしくはセツキシマブ(100pg/ml)にIL-2 D10(10pg/ml)を加えた組合せ。

40

50

mL)にIL-2-D10(10pg/mL)を加えた組合せを含めた組合せ中に⁵¹Crで標識したSCC6細胞と共に、エフェクター細胞:標的細胞比を0:1、1:1、および5:1で変化させて、精製されたNK細胞を5時間にわたり培養した後に、溶解百分率を決定した。アッセイは、3連で実施した。精製されたNK細胞を、⁵¹Crで標識したSCC6細胞と共に、濃度を変化させるセツキシマブ、IL-2またはIL-2-D10の存在下または非存在下で培養した。D10によるNK細胞の自発的細胞傷害作用に対する刺激は、高用量のIL-2(図8、*p=.008、**p=.001)を上回り、IL-2またはD10による刺激を伴わない場合の自発的細胞傷害作用は最小限であった。セツキシマブに結合したSCC6のADCも、D10による刺激を介して、高用量のIL-2またはセツキシマブ単独と比較して同様に増大した(*p=.0005、**p=.0001)。とりわけ、D10により、自発的な細胞毒性およびADCの両方の、高用量のIL-2と比較して優越する機能的増強が、1:1を含め全てのエフェクター:標的比において生じた。

【0139】

(実施例7)

IL-2ムテインは、抑制型T細胞(Tregs)の刺激を比較的低下させながら、メモリー表現型増殖の増強を結果としてもたらす

[00134] IL-2ムテインであるH9の、CD25は低レベルで発現するがIL-2Rは高レベルで発現するメモリー表現型CD8⁺T細胞の増殖に対する効力を、in vivoにおいて評価した。C57B1/6マウスに、PBS、IL-2 20μg、H9 20μg、またはIL-2/抗IL-2モノクローナル抗体の複合体1.5μgを施し、脾臓のCD3⁺CD8⁺CD44^{high}メモリー表現型T細胞の全細胞カウントをフローサイトメトリーにより評価した。脾臓細胞の懸濁液を調製し、蛍光色素をコンジュゲートしたモノクローナル抗体で、CD3(クローン145-2C11、eBioscience)、CD4(クローンRM4-5、Caltag Laboratories)、CD8a(クローン53-6.7、BD Biosciences)、CD25(クローンPC61、BD Biosciences)、CD44(クローンIM7、eBioscience)、NK1.1(クローンPK136、BD Biosciences)、およびThy1.1(クローンHIS51、eBioscience)を染色した。BD FACS Canto(商標)IIフローサイトメーターを用いて少なくとも100,000個の生細胞を収集し、FlowJoソフトウェア(TriStar, Inc.)を用いて解析した。図10(A)に示される通り、開示されるIL-2ムテインによる処置は、他の処置モダリティーと比べて大幅な、メモリー表現型T細胞の増殖を結果としてもたらしたが、CD3⁺CD4⁺CD25^{high}T細胞である制御性T細胞の増殖は制限された(図10(B))。

【0140】

(実施例8)

in vivoにおけるIL-2ムテインの毒性の低減

[00135] IL-2による処置は、急性肺浮腫などの重度の有害作用をもたらしうることが知られ、これは、現在のところIL-2の有効な使用を阻止する制約となっている。したがって、開示されるIL-2ムテインのIL-2と比べた毒性を評価した(図11A)。C57B1/6マウスに、PBS、IL-2 20μg、H9 20μg、またはIL-2/抗IL-2モノクローナル抗体の複合体1.5μgによる毎日の腹腔内注射を、連続5日間にわたり施した。養子(adoptive)細胞移入の6日後、肺を摘出し、真空下58で一晩にわたる乾燥の前および乾燥の後に秤量した。肺の湿潤重量は、初期の肺重量を脱水後の肺重量から減じることにより計算した。

【0141】

(実施例9)

in vivoにおけるIL-2ムテインの抗腫瘍活性の増大

[00136] 開示されるIL-2ムテインの腫瘍細胞に対する効力をin vivoにおいて調べた。 RPMI 100μl中に10⁶個のB16F10黒色腫細胞を、マウス(群1つ当たりのマウス3~4匹)背部の真皮上層へと注射した。処置は、PBS、IL-2

20 μg、H9 20 μg、またはIL-2 / 抗IL-2モノクローナル抗体の複合体(IL-2/mAb) 1.5 μgによる5回にわたる毎日の注射からなり、腫瘍小塊が約15 mm²のサイズではっきりと目視可能および触知可能となって1日後に開始した。図11(B)で裏付けられる通り、開示されるIL-2ムテインは、in vivoにおける抗腫瘍活性の増強を結果としてもたらした。

【0142】

(実施例10)

IL-2ムテインとIL-2との構造比較

[00137] 表面プラズモン共鳴(SPR)によりIL-2Rに対するそれらの結合アフィニティーおよび反応速度を測定するために、IL-2ムテインのうちのいくつかを組換えにより発現させた。IL-2とIL-2Rとのアフィニティーは、K_D = 280 nMであった。IL-2ムテインを、低アフィニティーのクラス、中程度のアフィニティーのクラス、および高アフィニティーのクラスへとクラスター分割した。低アフィニティーのIL-2ムテイン(5-2および6-6)は、それぞれ、50~70 nMのK_DでIL-2Rに結合し、野生型IL-2の4~6倍のアフィニティーの増分は、ほぼ完全にL85V置換を介するものであった。第2の部位指向的ライブラリーから選択された、アフィニティーが中程度の突然変異体および高アフィニティーの突然変異体のK_Dは、それぞれ、10~15 nM(C5、H4)および1.2~1.7 nM(B1、D10、E10、G8、H9)であった。アフィニティーの増大は、オフ速度の低減により一様に明示され、高アフィニティーのIL-2ムテインは、L80F/R81D/L85V/I86V/I92Fのうちの無作為化された位置にコンセンサス配列を含有した。

【0143】

[00138] IL-2ムテインの構造的帰結を理解するために、D10ムテインのほか、IL-2Rおよび_cに結合したD10の三元複合体を結晶化させた。D10単独の構造では、6つの突然変異のうちの5つが、B-Cループ上およびCヘリックスのコア内のIL-2Rに接触しない位置にクラスター化した。とりわけ、B-Cヘリックスのリンクカーリー領域は、電子密度マップにおいて、この領域が部分的にまたは完全に無秩序的である他のIL-2構造と比較して秩序立っている(図9)。F80、V85、およびV86の置換基は、まとまって、ループを安定化させCヘリックスを分子のコアへと「ピン止め」しヘリックスBを充填する疎水性のクラスターへと崩れこんでいる(collapse into)と考えられる。H74の突然変異およびD81突然変異は、溶媒に曝露されており、したがって、それらの構造的役割はそれほど明らかではないが、Aspは、ヘリックスC構造にさらに寄与しうる、ヘリックスのよく知られたNキャッピング残基である。6つのコンセンサス突然変異のうちの1つであるI92Fのみが、受容体複合体におけるIL-2Rに接触する位置に置かれた。Phe92は、CヘリックスとAヘリックスとの間に深く挿入され、複合体のIL-2Rにより覆い隠された分子表面のうちの、Ile92と比較した、さらなる10²に寄与するに過ぎない。したがって、そのIL-2Rとの接触は、合計で約300倍に及ぶD10のアフィニティーの増分に対してわずかな寄与をなすに過ぎない可能性が高い。

【0144】

[00139] また、D10三元受容体複合体の低解像度(3.8)による構造も決定して、突然変異がIL-2R/_c受容体の結合形状を攪乱したかどうかを評価した。安定的なD10とIL-2Rとの三元複合体を結晶化させ、CD25の非存在下で精製した。D10の三元複合体におけるIL-2R/_cヘテロ二量体全体の骨格およびサイトカイン/IL-2Rの接觸方式は、既に報告されている四元アセンブリーの場合と本質的に同一である。したがって、スーパー2の効力の増大は、受容体二量体の骨格の構造変化に起因するものではなく、アフィニティーの増強に起因する可能性が高い。

【0145】

[00140] 上述で論じた通り、IL-2のCヘリックスは、二元複合体および四元複合体のいずれにおいても見られる、IL-2Rへの結合時に微細な再配置を受けると考えら

10

20

30

40

50

れる。これに対して、PDBデータベースにおいて、3つの野生型のリガンド結合していない構造を検査することにより、Cヘリックスの位置のばらつきが、このヘリックスにおけるB因子の、この分子の残りの部分と比べた増大と符合することが明らかとなる。D10の構造の、リガンド結合していないIL-2、および受容体複合体におけるIL-2の構造との比較を企図した。D10におけるCヘリックスは、遊離フォームの場合より、2つの受容体に結合したIL-2の立体構造において見られるCヘリックスとより類似し、ヘリックスコアの上方および内部へのシフトを経ていることが観察された。

【0146】

[00141] 分子動力学(MD)シミュレーションを用いて、IL-2ムテインがIL-2Rに対する結合アフィニティーを増大させる機構を探査した。IL-2ムテインと対比した、IL-2の相対的な立体構造の可撓性を直接探索するために、原子レベルの詳密なマルコフ状態モデル(MSM)を構築した。このMSMにおける状態は、原子論的シミュレーションから結果として得られる、急速に相互変換する立体構造の反応速度論的クラスター化に由来する。これらの準安定状態の各々は、系の構造および動態を最終的に決定する根底的な自由エネルギーLANDスケープにおける局所的な極小値に対応する。MSMの解析は、IL-2ムテインがIL-2より安定的であり、IL-2が、IL-2ムテインのほぼ2倍のクラスターをビットすることを裏付ける。例えば、IL-2ムテインの最も密度の高い状態(most populated state)の平衡確率は、IL-2の約-0.05と比較して約-0.20である。IL-2ムテインでは、ヘリックスB、B-Cループ、およびヘリックスCが、IL-2の場合と比較して硬直している。発生した突然変異は、B-Cループ内(H74、D81)、およびBヘリックスとCヘリックスとの充填インターフェース内(F80、V85、V86)に存在するので、いずれのヘリックス(ヘリックスCのみでなく)も突然変異から利益を受け、集合的な安定化を経る。F92は、ヘリックスCとヘリックスAとの間の分子的楔として作用し、ヘリックスのよりC末端側の端部でさらなる安定化のための影響力として作用すると考えられる。MDシミュレーションにより、スーパー2では、ヘリックスBもまた安定化を経ていることが示唆されることは、IL-2の結晶構造の比較からは自明でなかったので驚きであった。IL-2Rは、主にBヘリックスおよびDヘリックスの一部において、IL-2に結合する。MDシミュレーションは、IL-2RのIL-2への結合は、ヘリックスBを硬直させることが可能であり、この構造的安定化は、B-CループおよびヘリックスCへと伝播しうる可能性を示唆する。原理的には、IL-2ムテインにおいて発生した突然変異の見かけの効果と同様である。

【0147】

[00142] 最も密度の高い立体構造を各タンパク質のシミュレーションから視覚化することにより、ヘリックスCは、IL-2ムテインにおける場合よりIL-2における場合にはるかに可撓性が大きいことが示され、また、IL-2ムテインにおける突然変異が、受容体結合様の立体構造を実際に安定化させることも示される。

【0148】

他の実施形態

[00143] 本発明をその詳細な記載と共に記載してきたが、前出の記載は、添付の特許請求の範囲により規定される、本発明の範囲を例示することを意図するものであり、これを限定するものではないことを理解されたい。他の態様、利点、および改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内にある。例えば、IL-2は、明細書の全体において言及されているが、当業者であれば、本明細書で記載される方法および組成物が、他のサイトカイン、例えば、この特性を伴う顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、またはIL-15にも同等に適用可能であることを理解するであろう。したがって、本発明はまた、それらのそれぞれの受容体に対する結合アフィニティーを野生型と比較して増大させた、GM-CSF、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、およびIL-15の突然変異体、ならびにこれらの突然変異体を同定する方法および用いる方法も包含する。

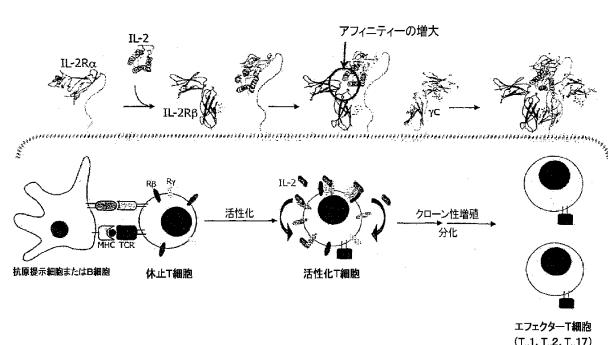
10

20

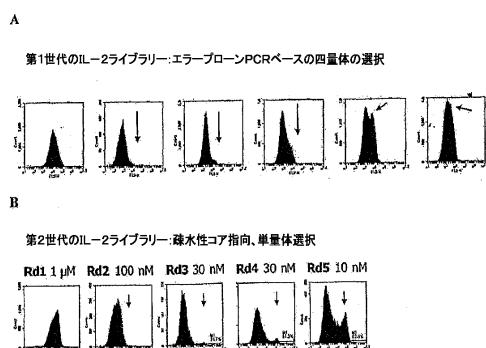
30

40

【図1】



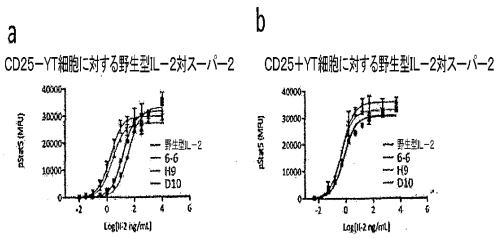
【図2】



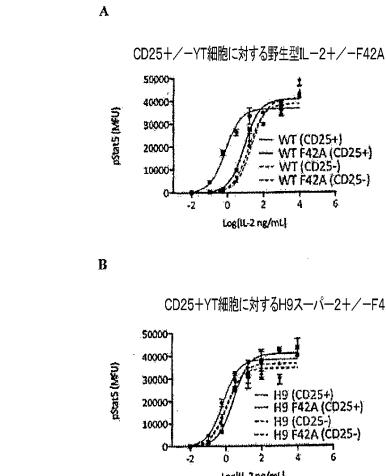
【図3】

残基番号	IL-2Rβに対するアフィニティー										
	74	80	81	85	86	89	92	93	K_d (nM)	k_{on} (1/ms)	k_{off} (1/s)
wtIL-2	R	Q	L	R	L	I	I	V	280	7.9×10^5	0.22
5-1									235	3.1×10^5	0.073
5-2									77	5.8×10^5	0.045
6-6						I			49	1.2×10^6	0.061
A2	H	T	N	V	V	V	V	I			
B1	N	T	N	V	V	V	V	I	1.6	3.1×10^6	0.005
B11	S	T	N	V	V	V	V				
C5	N	V	T	V	V	V	V		10	1.6×10^6	0.016
D10	H	T	N	V	V	V	V		4.3	4.1×10^6	0.0051
E10	S	T	N	V	V	V	V		1.3	4.3×10^6	0.0055
G8	N	T	N	V	V	V	V		1.5	3.2×10^6	0.0049
H4	S	T	N	V	V	V	V		14	9.4×10^5	0.013
H9	S	T	N	V	V	V	V		1.4	4.1×10^6	0.0056
コンセンサス											

【図4】

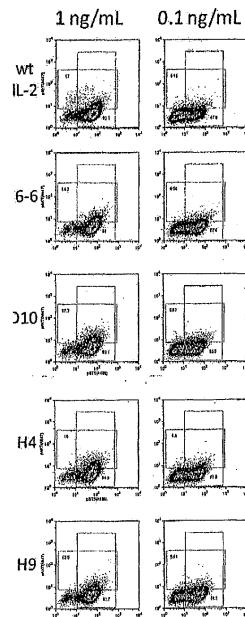


【図5】

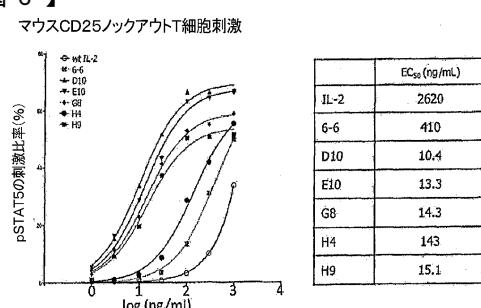


【図7】

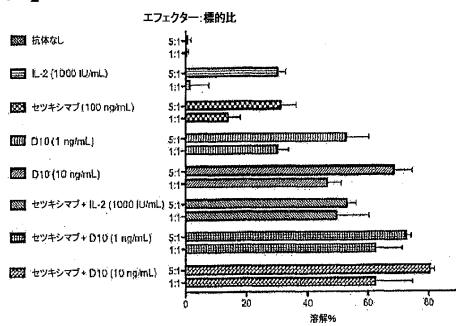
抗原経験のあるヒトCD4+T細胞刺激



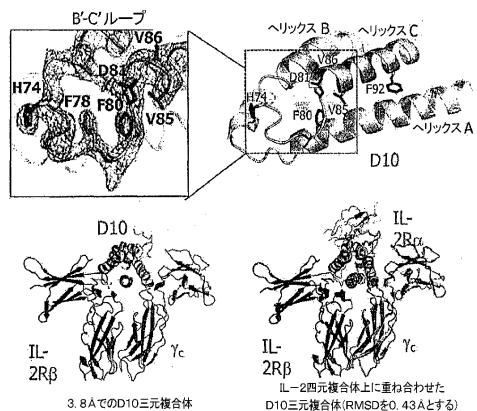
【図6】



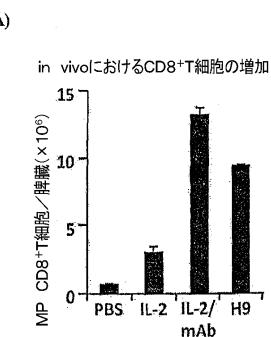
【図8】



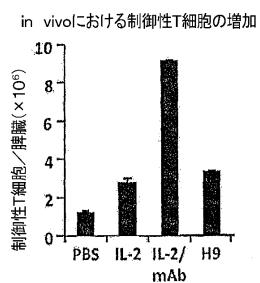
【図9】



【図10】

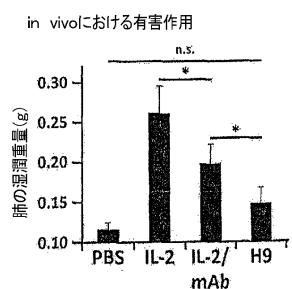


(B)

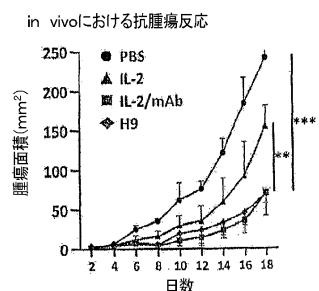


【図11】

(A)



(B)



【配列表】

0006093712000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彥

(72)発明者 ガルシア,ケナン,クリストファー

アメリカ合衆国,カリフォルニア州 94025,メンロー パーク,ケンウッド ドライブ 5
80

(72)発明者 レビン,アロン

アメリカ合衆国,カリフォルニア州 94306-1106,パロ アルト,エル カミノ リア
ル 1705, ボード オブ トラスティーズ オブ ザ リーランド スタンフォード ジュ
ニア ユニバーシティ 内

(72)発明者 リング,アーロン

アメリカ合衆国,カリフォルニア州 94306-1106,パロ アルト,エル カミノ リア
ル 1705, ボード オブ トラスティーズ オブ ザ リーランド スタンフォード ジュ
ニア ユニバーシティ 内

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表2002-515247(JP, A)

国際公開第2005/007121(WO, A1)

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1989, 86(6), pp.1982-1986

Protein Eng., 2003, 16(12), pp.1081-1087

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPI/DS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)