



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101009
(43) 공개일자 2022년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/55 (2013.01)
A61K 38/2013 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7022964(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7027041
원출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 2019년03월14일
(85) 번역문제출일자 2022년07월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/029111
(87) 국제공개번호 WO 2014/153111
국제공개일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
61/784,669 2013년03월14일 미국(US)

(71) 출원인
암젠 인크
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원
암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
가빈, 마크 에이.
미국 98070 워싱턴주 배션 팰러세이즈 애비뉴 에
스더블유 11022
칸난, 구나세카란
미국 91320 캘리포니아주 뉴베리 파크 앰버튼 레
인 1056
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 T 조절 세포의 증식을 위한 인터류킨-2 뮤테인

(57) 요약

T 조절 세포를 우선적으로 증식시키고 활성화하고 대규모 제조에 수정 가능한, IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 분자가 본 명세서에 제공된다. N297에서의 글라이코실화 결여에도 불구하고 고도로 감소한 이펙터 기능 및 높은 안정성이 결여되거나 갖는, 변이체 인간 IgG1 Fc 분자가 또한 본 명세서에 제공된다. 또한, 포유동물 세포에서 발현될 때 글라이코실화된 링커 펩타이드가 본 명세서에 제공된다.

(52) CPC특허분류

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

리, 리

미국 98075 워싱턴주 사마미시 투헌드레드포티세븐
쓰 플레이스 에스이 1301

피어슨, 조슈아 티.

미국 98122 워싱턴주 시애틀 써티에잇쓰 예비뉴
1136

카로우, 마가레트

미국 93012 캘리포니아주 산타 로사 벨리 릿지 드
라이브 12655

명세서

청구범위

청구항 1

i) 아미노산 서열의 125번 위치가 알라닌이거나,

ii) 아미노산 서열의 125번 위치가 알라닌이고, 아미노산 서열이 V69A 및 Q74P 치환을 포함하는,

서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, T 조절 세포를 우선적으로 자극하는 인간 인터류킨-2 (IL-2) 뮤테인의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본원은 2013년 3월 14일자에 출원된 미국 가출원 제61/784,669호의 이익을 주장한다. 상기 출원은 본 명세서에 참조문헌으로 포함된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본원은 EFS 웹을 통해 전자 포맷의 서열 목록과 함께 제출되었다. 서열 목록은 40,849 바이트 크기인 2014년 2월 25일자에 생성된 A-1826-WO-PCT_ST25.txt의 텍스트 파일 명칭으로 제공된다. 서열 목록의 전자 포맷의 정보는 본 명세서에서 참조문헌으로 그 전문이 포함된다.

배경 기술

[0005] IL-2는 3개의 막관통 수용체 서브유닛에 결합한다: IL-2 결합 시 세포내 신호전달 사건을 함께 활성화하는 IL-2R β 및 IL-2R γ , 및 IL-2와 IL-2R β γ 사이의 상호작용을 안정화시키도록 작용하는 CD25(IL-2R α). IL-2R β γ 에 의해 전달된 신호는 PI3-키나제, Ras-MAP-키나제 및 STAT5 경로의 신호를 포함한다.

[0006] T 세포는 조직에서 통상적으로 존재하는 저농도의 IL-2에 반응하는 CD25의 발현을 요한다. CD25를 발현하는 T 세포는 자가면역 염증을 억제하는 데 필수적인 FOXP3+ 조절 T 세포(Treg 세포) 및 CD25를 발현하도록 활성화된 FOXP3- T 세포 둘 다를 포함한다. FOXP3- CD25+ T 이펙터 세포(Teff)는 CD4+ 또는 CD8+ 세포일 수 있고, 이들 둘 다 염증, 자가면역, 장기 이식 거부 또는 이식편 대 숙주 질환에 기여할 수 있다. IL-2 자극된 STAT5 신호전달은 정상 T-reg 세포 성장 및 생존, 및 높은 FOXP3 발현에 중요하다.

[0007] 공동 소유된 WO 2010/085495에서, 본 발명자들은 Treg 세포를 우선적으로 증식시키거나 자극하는 IL-2 뮤테인의 용도를 기술하였다. 대상체에게 투여될 때, Treg 세포에 대한 효과는 염증성 및 자가면역 질환을 치료하는 데 유용하다. 상기 문헌에 기재된 IL-2 뮤테인이 생체내 Teff 세포 상의 Treg를 증식시키는 데 유용하지만, 인간 치료제에 대한 최적 속성을 갖는 IL-2 뮤테인을 생성하는 것이 바람직할 수 있다.

발명의 내용

[0008] 고수율 제조에 수정 가능하고 최적화된 약동학적 활성을 갖는 IL-2 뮤테인이 본 명세서에 기재되어 있다. 예시적인 IL-2 뮤테인 기반 인간 치료제를 제조하기 위한 노력으로, 다수의 예상치 못하고 예측할 수 없었던 관찰이 있었다. 본 명세서에 기재된 IL-2 뮤테인은 이 노력의 결과이다.

[0009] 본 명세서에 기재된 IL-2 뮤테인은 IL-2에 대한 최소 수의 변형을 가져서, IL-2 뮤테인 및/또는 내인성 IL-2에 대해 면역 반응을 생성할 가능성을 감소시키면서 여전히 Treg 우선적 증식 및 활성화를 유지시킨다. 더구나, 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 대상체에게 투여될 때 혈청 반감기를 감소시키는 항체 Fc와 같은 분자에 융합된다. IL-2 뮤테인은 짧은 혈청 반감기가 짧다(피하 주사에 대해 3시간 내지 5시간). 본 명세서에 기재된 예시적인 IL-2 뮤테인 Fc 융합체는 인간에서 반감기가 적어도 1일, 적어도 3일, 적어도 5일, 적어도 10일, 적어도 15일, 적어도 20일 또는 적어도 25일이다. IL-2 뮤테인의 약동학에 대한 이 효과는 감소하거나 덜 빈번한 IL-2 뮤테인 치료제의 투약을 허용한다.

- [0010] 더구나, 약제학적 큰 분자를 생성할 때, 그 분자의 응집을 최소화하고 안정성을 최대화하면서 다량으로 큰 분자를 제조하는 능력에 대한 고려가 이루어져야 한다. IL-2 뮤테인 Fc-융합 분자는 이러한 속성을 나타낸다.
- [0011] 추가로, 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 IgG1 Fc 구역을 함유한다. IgG1의 이펙터 기능(예를 들어, ADCC 활성)을 무효화하는 것이 바람직할 때, 글라이신에 대한 297번 위치에서의 아스파라긴의 돌연변이(N297G; EU 넘버링 체계)가 비글라이코실화(aglycosylation) IgG1 Fc를 발생시키는 다른 돌연변이에 비해 크게 개선된 정제 효율 및 생물물리학 특성을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 바람직한 실시형태에서, 시스테인은 이황화 결합을 허용하도록 Fc로 조작되고, 그 이황화 결합은 비글라이코실화 Fc 함유 분자의 안정성을 증가시킨다. 비글라이코실화 Fc의 유용성은 IL-2 뮤테인 Fc-융합 상황을 뛰어 넘는다. 따라서, N297G 치환 및 임의로 시스테인에 대한 하나 이상의 추가의 잔기의 치환을 포함하는, Fc 함유 분자, Fc-융합 및 항체가 본 명세서에 제공된다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 양상은 글라이코실화 펩타이드 링커를 포함한다. N-글라이코실화에 수정 가능한 바람직한 링커 펩타이드는 GGNGT(서열 번호 6) 또는 YGNGT(서열 번호 7)를 포함한다.
- [0013] 또 다른 양상에서, 본 발명은 V91K 치환 및 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 인간 인터류킨-2(IL-2) 뮤테인을 제공하고, 상기 IL-2 뮤테인은 T 조절 세포를 우선적으로 자극한다. 일 실시형태에서, 인간 IL-2 뮤테인은 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 뮤테인은 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 125번 위치는 알라닌이다. 다른 실시형태에서, 125번 위치는 시스테인이다.
- [0014] 또 다른 양상에서, 본 발명은 Fc 및 인간 IL-2 뮤테인을 포함하는 Fc-융합 단백질을 제공한다. 일 실시형태에서, Fc는 인간 IgG1 Fc이다. 다른 실시형태에서, 인간 IgG1 Fc는 상기 Fc의 이펙터(effector) 기능을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 다른 실시형태에서, 인간 IgG1은 N297에서의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, N297에서의 치환은 N297G이다. 다른 실시형태에서, Fc-융합 단백질은 상기 인간 IgG Fc의 C 말단 라이신의 치환 또는 결실을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 인간 IgG Fc의 C 말단 라이신은 결실된다. 다른 실시형태에서, 링커는 상기 단백질의 Fc 및 인간 IL-2 뮤테인 부분을 연결한다. 다른 실시형태에서, 링커는 GGGGS, GGNGT 또는 YGNGT이다. 다른 실시형태에서, 링커는 GGGGS이다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 포유동물 세포에서 발현될 때 상기 Fc-융합 단백질의 글라이코실화를 변경하는 아미노산 부가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 T3 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 T3N 또는 T3A 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 T3N 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 S5 돌연변이를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 S5T 돌연변이를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc-융합 단백질은 Fc 이합체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 Fc-융합 단백질은 2종의 IL-2 뮤테인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 Fc-융합 단백질은 단일의 IL-2 뮤테인을 포함한다.
- [0015] 또 다른 양상에서, 본 발명은 인간 IL-2 뮤테인 또는 항체의 Fc 부분 및 인간 IL-2 뮤테인을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 항체의 Fc 부분 및 인간 IL-2 뮤테인은 단일 오픈 리딩 프레임(open-reading frame) 내에 코딩된다. 다른 실시형태에서, Fc는 인간 IgG1 Fc이다. 다른 실시형태에서, 인간 IgG1 Fc는 상기 Fc의 이펙터 기능을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 다른 실시형태에서, 인간 IgG1은 N297에서의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, N297에서의 치환은 N297G이다. 다른 실시형태에서, 인간 IgG1 Fc는 C 말단 라이신의 치환 또는 결실을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 인간 IgG Fc의 C 말단 라이신은 결실된다. 다른 실시형태에서, 핵산은 항체의 Fc 부분 및 인간 IL-2 뮤테인을 연결하는 링커를 추가로 코딩한다. 다른 실시형태에서, 링커는 GGGGS, GGNGT 또는 YGNGT이다. 다른 실시형태에서, 링커는 GGGGS이다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 포유동물 세포에서 발현될 때 상기 IL-2 뮤테인을 포함하는 단백질의 글라이코실화를 변경하는 아미노산 부가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 T3 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 T3N 또는 T3A 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 T3N 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 S5 돌연변이를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 S5T 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0016] 또 다른 양상에서, 본 발명은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 기재된 바와 같은 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0017] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일 실시형태에서, 단리된 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 다른 실시형태에서, 상기 숙주 세포는 원핵생물 세포이다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 이. 콜라이이다. 다른 실시형태에서, 상기 숙주 세포는 진핵생물 세포

이다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포주이다.

- [0018] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기 프로모터가 발현되는 조건 하에 상기 기재된 바와 같은 숙주 세포를 배양하는 단계 및 상기 배양물로부터 인간 IL-2 뮤테인을 수확하는 단계를 포함하는 인간 IL-2 뮤테인을 제조하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 상기 프로모터가 발현되는 조건 하에 상기 기재된 바와 같은 숙주 세포를 배양하는 단계 및 상기 배양물로부터 Fc-융합 단백질을 수확하는 단계를 포함한다.
- [0019] 또 다른 양상에서, 본 발명은 T 세포의 집단 내의 비조절 T 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율을 증가시키는 방법으로서, T 세포의 집단을 유효량의 상기 기재된 인간 IL-2 뮤테인과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 증가한다. 다른 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 적어도 50% 증가한다.
- [0020] 또 다른 양상에서, 본 발명은 T 세포의 집단 내의 비조절 T 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율을 증가시키는 방법으로서, T 세포의 집단을 유효량의 상기 기재된 Fc-융합 단백질과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 증가한다. 다른 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 적어도 50% 증가한다.
- [0021] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체의 말초 혈액 내의 비조절 T 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율을 증가시키는 방법으로서, 유효량의 상기 기재된 인간 IL-2 뮤테인을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 증가한다. 다른 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 적어도 50% 증가한다.
- [0022] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체의 말초 혈액 내의 비조절 T 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율을 증가시키는 방법으로서, 유효량의 상기 기재된 Fc-융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 증가한다. 다른 실시형태에서, CD3+FoxP3-에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 적어도 50% 증가한다.
- [0023] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체의 말초 혈액 내의 자연 살해(NK) 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율을 증가시키는 방법으로서, 유효량의 상기 기재된 인간 IL-2 뮤테인을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19- 림프구에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 증가한다. 다른 실시형태에서, CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19- 림프구에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 적어도 50% 증가한다.
- [0024] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체의 말초 혈액 내의 자연 살해(NK) 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율을 증가시키는 방법으로서, 유효량의 상기 기재된 Fc-융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19- 림프구에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 증가한다. 다른 실시형태에서, CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19- 림프구에 대한 CD3+FoxP3+ 세포의 비율은 적어도 50% 증가한다.
- [0025] 또 다른 양상에서, 본 발명은 염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료학적 유효량의 상기 기재된 IL-2 뮤테인을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0026] 또 다른 양상에서, 본 발명은 염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 치료학적 유효량의 상기 기재된 Fc-융합 단백질을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 투여는 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 대상체의 말초 혈액 내의 비조절 T 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율은 투여 후 증가한다. 다른 실시형태에서, 대상체의 말초 혈액 내의 비조절 T 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율은 투여 후 실질적으로 동일하게 있다. 다른 실시형태에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 루푸스, 이식편 대 숙주 질환, C형 간염 유발 혈관염, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 자연 유산, 아토피 질환 또는 염증성 장 질환이다.
- [0027] 또 다른 양상에서, 본 발명은 인간 IgG1 항체의 Fc 구역을 제공하고, 상기 Fc 구역은 N297G 돌연변이를 포함하고, 상기 인간 IgG1의 Fc 구역은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 포함한다. 일 실시형태에서, 인간 IgG1의 Fc 구역은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 95%의 동일성을 포함한다. 다른 실시형태에서, 인간 IgG1의 Fc 구역은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 인간 IgG1의 Fc 구역은 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 이상의 돌연변이를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 서열 번호 3에 기재된 하나 이상의 아미노산은 시스테인으로 치환된다. 다른 실시형태에서, 서열 번

호 3에 기재된 아미노산 서열의 V259, A287, R292, V302, L306, V323 또는 I332는 시스테인으로 치환된다. 다른 실시형태에서, Fc 구역은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 내의 A287C 및 L306C 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc 구역은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 내의 V259C 및 L306C 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc 구역은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 내의 R292C 및 V302C 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc 구역은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 내의 V323C 및 I332C 치환을 포함한다.

[0028] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기 기재된 Fc 구역을 포함하는 항체를 제공한다.

[0029] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기 기재된 Fc 구역을 포함하는 Fc-융합 단백질을 제공한다.

[0030] 또 다른 양상에서, 본 발명은 링커를 포함하는 폴리펩타이드를 제공하고, 링커는 GGNGT 또는 YGNGT이다. 일 실시형태에서, 링커는 N-글라이코실화를 포함한다. 다른 실시형태에서, 링커는 폴리펩타이드 구조에서 루프로 삽입되거나 루프를 대체한다.

[0031] 또 다른 양상에서, 본 발명은 비글라이코실화 IgG1 Fc 함유 분자를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 포유동물 세포 배양물에서 상기 기재된 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 발현시키는 단계 및 상기 배양물로부터 비글라이코실화 IgG1 Fc 함유 분자를 수확하는 단계를 포함한다.

[0032] 또 다른 양상에서, 본 발명은 포유동물 세포에서 발현될 때 비글라이코실화된 IgG1 Fc 함유 분자를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 Fc 구역에서의 N297에 대한 코돈을 글라이신 코돈으로 돌연변이시키는 단계를 포함한다.

[0033] 또 다른 양상에서, 본 발명은 서열 번호 18 또는 서열 번호 20의 서열로 이루어진 Fc-융합 단백질을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 Fc-융합체를 코딩하는 핵산을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포가 상기 Fc-융합 단백질을 발현하게 하는 조건 하에 그 세포를 항온처리하는 단계를 포함하는 Fc-융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 유효량의 Fc-융합 단백질을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 염증성 또는 자가면역 병증을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 염증성 또는 자가면역 병증은 이식편 대 숙주 질환이다.

[0034] 또 다른 양상에서, 본 발명은, 상기 대상체에서의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 기재된 인간 인터류킨-2(IL-2) 뮤테인 또는 상기 기재된 Fc-융합 단백질에 의한 치료에 대한 대상체의 반응을 모니터링하는 방법을 제공하고, 상기 변화는 체온의 증가, 상기 대상체의 말초 혈액에서의 CRP의 증가, 상기 대상체의 말초 혈액에서의 혈소판의 감소, 상기 대상체의 말초 혈액에서의 호중구의 감소 또는 상기 대상체의 말초 혈액에서의 알부민의 감소이고, 상기 치료는 상기 변화가 검출된 후 종료되거나, 중지되거나, 투약 빈도가 감소되거나, 투약량이 감소된다. 일 실시형태에서, 상기 변화는 적어도 0.5℃의 체온의 증가, 적어도 0.2mg/mL의 상기 대상체의 말초 혈액에서의 CRP의 증가, 적어도 0.8배의 상기 대상체의 말초 혈액에서의 혈소판의 감소, 적어도 0.8배의 상기 대상체의 말초 혈액에서의 호중구의 감소 또는 적어도 0.4배의 상기 대상체의 말초 혈액에서의 알부민의 감소를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1: 단기간 자극 검정에서, IgG-Fc의 C 말단에 대한 융합에 의한 동종이합화는 CD25에 대한 고친화도 및 감소된 효력을 갖는 IL-2 뮤테인의 활성을 변경하지 않는다.

도 2a 및 도 2b: 표시된 돌연변이를 갖고 Fc-이종이합체의 한 측의 C 말단에 융합된 IL-2 뮤테인을 T 세포에서 STAT5 인산화를 자극하는 이의 능력에 대해 시험하였다. 이 뮤테인은 또한 CD25에 대해 고친화도를 부여하는 3개의 돌연변이(V69A, N71R, Q74P)를 함유하였다. 이의 활성은 Fc 융합이 없는 3개의 형태의 IL-2(빈 기호)와 비교되었다: WT IL-2, HaWT(CD25에 대한 고친화도)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) 및 HaD(CD25에 대한 고친화도 및 감소된 신호전달 활성)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D). 게이팅된 FOXP3+CD4+ 및 FOXP3-CD4+ T 세포에 대한 포스포-STAT5 반응이 도시되어 있다.

도 3: Fc-이종이합체에 융합된 IL-2 뮤테인의 적정에 대한 반응에서의 T 세포 하위세트의 증식. 융합 단백질의 활성은 Fc 융합이 없는 3개의 형태의 IL-2(빈 기호)와 비교되었다: WT IL-2, HaWT(CD25에 대한 고친화도)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) 및 HaD(CD25에 대한 고친화도 및 감소된 신호전달 활성)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

도 4: Fc-이종이합체에 융합된 IL-2 뮤테인의 적정에 대한 반응에서의 NK 세포의 증식. 융합 단백질의 활성은 Fc 융합이 없는 3개의 형태의 IL-2(빈 기호)와 비교되었다: WT IL-2, HaWT(CD25에 대한 고친화도)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) 및 HaD(CD25에 대한 고친화도 및 감소된 신호전달 활성)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

도 5: Fc-동종이합체 N297G에 융합된 IL-2 뮤테인의 적정에 대한 반응에서의 T 세포 하위세트의 증식. Fc.뮤테인의 활성은 WT IL-2(빈 원형) 및 Fc.WT(채워진 원형)와 비교되었다. CD25에 대해 고친화도를 부여하는 돌연변이(HaMut1)는 V69A 및 Q74P이었다.

도 6: Fc-동종이합체 N297G에 융합된 IL-2 뮤테인의 적정에 대한 반응에서의 NK 세포의 증식. Fc.뮤테인의 활성은 WT IL-2(빈 원형) 및 Fc.WT(채워진 원형)와 비교되었다.

도 7a 및 도 7b: CD25에 대해 고친화도를 부여하는 돌연변이가 없는 Fc.IL-2 뮤테인은 인간화 마우스에서 Treg 증식 및 FOXP3 상향조절을 촉진한다.

도 8: Fc.IL-2 뮤테인의 1주의 저용량(동물마다 0.5 μ g)은 인간화 마우스에서 Treg 증식 및 FOXP3 상향조절을 촉진하고, 더 우수한 활성이 Fc.N88D 및 Fc.WT에 비해 Fc.V91K에 대해 관찰되었다.

도 9a: Fc.V91K 및 Fc.N88D는 CD25와의 회합을 통해 활성화된 T 세포의 표면에서 지속한다.

도 9b: Fc.WT에 비해 Fc.V91K 및 Fc.N88D에 의한 IL-2R 신호전달의 지속성.

도 10a 및 도 10b: 사이노물거스 원숭이에서의 Fc.V91K의 2주 및 4주 투약 간격의 비교, 및 IV 및 SC 투약 경로의 비교.

도 11a 내지 도 11f: 프로류킨(PROLEUKIN)(등록상표), Fc.V91K 및 Fc.N88D의 상이한 투약 섭생에 의해 치료된 사이노물거스 원숭이에서의 세포 반응, 체온 및 혈청 CRP의 동역학.

도 12a: 사이노물거스 원숭이에서의 Treg 세포, NK 세포, CD4⁺FOXP3⁻ T 세포 및 CD8⁺FOXP3⁻ T 세포의 수준에 대한 프로류킨(등록상표), Fc.V91K 또는 Fc.N88D의 투약량 증가의 효과. 각각의 데이터 점은 4개의 동물의 평균 피크 반응을 나타낸다.

도 12b: 사이노물거스 원숭이에서의 Treg 세포 및 호산구의 수준에 대한 프로류킨(등록상표), Fc.V91K 또는 Fc.N88D의 투약량 증가의 효과. 각각의 데이터 점은 4개의 동물의 평균 피크 반응을 나타낸다.

도 12c: 사이노물거스 원숭이에서의 Treg 세포 및 CRP의 수준 및 체온에 대한 프로류킨(등록상표), Fc.V91K 또는 Fc.N88D의 투약량 증가의 효과. 각각의 데이터 점은 4개의 동물의 평균 피크 반응을 나타낸다.

도 12d: 사이노물거스 원숭이에서의 Treg 세포, 혈소판, 호중구 및 알부민의 수준에 대한 프로류킨(등록상표), Fc.V91K 또는 Fc.N88D의 투약량 증가의 효과. 각각의 데이터 점은 4개의 동물의 평균 피크 반응을 나타낸다. 오른쪽 y축은 투약전 샘플에 비해 혈소판, 호중구 또는 알부민의 배수 변화 감소를 표시하도록 반대로 된다.

도 13: Fc.V91K로 치료된 사이노물거스 원숭이에서의 항약물 항체(anti-drug antibody: ADA)의 발생의 동역학.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 명세서에 사용된 제목 부분은 오직 체계화 목적이고, 기재된 대상(subject matter)을 제한하도록 구성되지 않는다. 본 명세서에 인용된 모든 참조문헌은 그 전문이 참조문헌으로 명확히 포함된다.

[0037] 표준 기술은 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 조직 배양 및 형질전환, 단백질 정제 등을 위해 이용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조업자의 사양에 따라 또는 당해 분야에서 보통 성취되는 바대로 또는 본 명세서에 기재된 바대로 수행될 수 있다. 하기 절차 및 기술은 당해 분야에 널리 공지된 종래의 방법에 따라, 본 명세서에 걸쳐 인용되고 기술된 다양한 일반적인 더 구체적인 참조문헌에 기재된 바대로, 일반적으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, N.Y.](임의의 목적을 위해 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)을 참조한다. 구체적인 정의가 제공되지 않은 한, 본 명세서에 기재된 분석 화학, 유기 화학, 및 의학 및 약제 화학과 관련하여 이용된 명명법, 및 이들의 실험 절차 및 기술은 널리 공지되고 당해 분야에서 통상 사용되는 것이다. 표준 기술은 화학 합성, 화학 분석, 약제학적 제제, 제형, 및 환자의 전달 및 치료에 이용될 수 있다.

- [0038] **IL-2**
- [0039] 본 명세서에 기재된 IL-2 뮤테인은 야생형 인간 IL-2의 변이체이다. 본 명세서에 사용된 바대로, "야생형 인간 IL-2", "야생형 IL-2" 또는 "WT IL-2"는 하기 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미해야 한다:
- [0040] APTSSSTKKTLQLEHLLLDLMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT
- [0041] 여기서, X는 C, S, V 또는 A(서열 번호 2)이다.
- [0042] 변이체는 야생형 IL-2 아미노산 서열 내에 하나 이상의 치환, 결실 또는 삽입을 함유할 수 있다. 잔기는 본 명세서에서 1 문자 아미노산 코드와 그 뒤의 IL-2 아미노산 위치로 지칭되고, 예를 들어 K35는 서열 번호 2의 35번 위치에서의 라이신 잔기이다. 치환은 본 명세서에서 1 문자 아미노산 코드와 그 뒤의 IL-2 아미노산 위치와 그 뒤의 치환하는 1 문자 아미노산 코드로 지칭되고, 예를 들어 K35A는 알려진 잔기에 의한 서열 번호 2의 35번 위치에서의 라이신 잔기의 치환이다.
- [0043] **IL-2 뮤테인**
- [0044] T 조절(Treg) 세포를 우선적으로 자극하는 인간 IL-2 뮤테인이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 사용된 바대로 "T 조절 세포를 우선적으로 자극한다"는 뮤테인이 CD3+FoxP3⁻ T 세포에 비해 CD3+FoxP3⁺ T 세포의 증식, 생존, 활성화 및/또는 기능을 촉진한다는 것을 의미한다. Treg를 우선적으로 자극하는 능력을 측정하는 방법은 말초 혈액 백혈구의 유세포 분석법에 의해 측정될 수 있고, 이 유세포 분석법에서 전체 CD4⁺ T 세포 중에서 FOXP3+CD4⁺ T 세포의 백분율의 증가, 전체 CD8⁺ T 세포 중에서 FOXP3+CD8⁺ T 세포의 백분율의 증가, NK 세포에 대한 FOXP3⁺ T 세포의 백분율의 증가 및/또는 다른 T 세포 상의 CD25 발현의 증가에 대한 FOXP3⁺ T 세포의 표면 상의 CD25의 발현 수준의 더 우수한 증가가 관찰된다. Treg 세포의 우선적 성장은, 중아황산염 처리된 게놈 DNA로부터의 중합효소 사슬 반응(PCR) 생성물의 서열분석에 의해 검출된, 전혈로부터 추출된 DNA에서의 탈메틸화 CD3 유전자에 대한, 탈메틸화 FOXP3 프로모터 DNA(즉, Treg 특이적 탈메틸화 구역 또는 TSDR)의 표시 증가로 또한 검출될 수 있다(J. Sehouli, et al. 2011. Epigenetics 6:2, 236-246).
- [0045] Treg 세포를 우선적으로 자극하는 IL-2 뮤테인은 대상체 또는 말초 혈액 샘플에서 CD3+FoxP3⁻ T 세포에 대해 CD3+FoxP3⁺ T 세포의 비율을 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 150%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 적어도 600%, 적어도 700%, 적어도 800%, 적어도 900% 또는 적어도 1000% 증가시킨다.
- [0046] 바람직한 IL-2 뮤테인은 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열에서의 V91K 또는 N88D 치환을 포함하는 IL-2 뮤테인을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 예시적인 IL-2 뮤테인은 서열 번호 1에 기재되어 있다. C125A 치환을 포함하는 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열이 특히 바람직하다. 야생형 IL-2 서열에 대한 추가의 돌연변이의 수를 감소시키는 것이 유리할 수 있지만, 본 발명은 V91K 또는 N88D 치환 이외의 절두 또는 추가의 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 IL-2 뮤테인을 포함하고, 단 상기 뮤테인은 Treg를 우선적으로 자극하는 활성을 유지한다. 따라서, 실시형태는 Treg 세포를 우선적으로 자극하고, 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 V91K 또는 N88D를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 뮤테인을 포함한다. 특히 바람직한 실시형태에서, 이러한 IL-2 뮤테인은 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0047] 아미노산 서열의 경우, 서열 동일성 및/또는 유사성은 문헌[Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482]의 국소 서열 동일성 알고리즘, 문헌[Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443]의 서열 동일성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444]의 유사성 방법의 조사, 이 알고리즘의 컴퓨터화 실행(문헌[Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.]에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA), 바람직하게는 디폴트 설정을 이용하거나 검사에 의한 문헌[Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395]에 의해 기재된 베스트 피트(Best Fit) 서열 프로그램(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 당해 분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 결정된다. 바람직하게는, 동일성(%)은 하기 매개변수에 기초하여 FastDB에 의해 계산된다: 1의 불일치 패널티(mismatch penalty); 1의 갭 패널티; 0.33의 갭 크기 패널티; 및 30의 연결 패널티(joining penalty), 문헌["Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis*,

Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.]

- [0048] 유용한 알고리즘의 예는 PILEUP이다. PILEUP는 진행성인, 쌍 지움 정렬을 이용하여 관련 서열의 그룹으로부터의 복수의 서열 정렬을 생성한다. 이것은 정렬을 생성하기 위해 이용된 클러스터링 관계를 나타내는 나무를 또한 작도한다. PILEUP는 문헌[Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360]의 진행성 정렬 방법(이 방법은 문헌[Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153]에 기재된 것과 유사함)의 단순화를 이용한다. 3.00의 디폴트 갭 중량, 0.10의 디폴트 갭 길이 중량 및 가중된 말단 갭을 포함하는 유용한 PILEUP 매개변수.
- [0049] 유용한 알고리즘의 또 다른 예는 문헌[Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; 및 Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787]에 기재된 BLAST 알고리즘이다. 특히 유용한 BLAST 프로그램은 문헌[Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480]으로부터 얻은 WU-BLAST-2 프로그램이다. WU-BLAST-2는 여러 조사 매개변수를 이용하고, 이들 대부분은 디폴트 값으로 설정된다. 조정 가능한 매개변수는 하기 값으로 설정된다: 오버랩 스팬(overlap span) = 1, 오버랩 분획(overlap fraction) = 0.125, 워드 역치(word threshold)(T) = II. HSP S 및 HSP S2 매개변수는 동적 값이고, 특정한 서열의 조성 및 관심 있는 서열이 조사되는 특정한 데이터베이스의 조성에 따라 프로그램 그 자체에 의해 확립되지만; 값은 민감도를 증가시키도록 조정될 수 있다.
- [0050] 추가의 유용한 알고리즘은 문헌[Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402]에 보고된 바와 같은 갭핑된(gapped) BLAST이다. 갭핑된 BLAST는 BLOSUM-62 치환 점수를 이용한다; 9로 설정된 역치 T 매개변수; 비 갭핑된 연장을 촉발하는 2개 히트(hit) 방법, k의 충전 갭 길이, 10+k의 비용; 16으로 설정된 X_u , 및 데이터베이스 조사 단계에 대해 40으로 설정되고 알고리즘의 출력 단계에서 67로 설정된 X_g . 갭핑된 정렬은 약 22 비트에 상응하는 점수에 의해 촉발된다.
- [0051] 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위 또는 구역이 선결정될 수 있지만, 돌연변이 그 자체는 선결정될 필요가 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 최적화하기 위해, 무작위 돌연변이유발은 표적 코돈 또는 구역, 및 원하는 활성의 최적 조합을 위해 스크리닝된 발현된 IL-2 뮤테인에서 수행될 수 있다. 공지된 서열을 갖는 DNA에서의 미리 결정된 부위에서 치환 돌연변이를 만드는 기술, 예를 들어 M13 프라이머 돌연변이유발 및 PCR 돌연변이유발은 널리 공지되어 있다. 돌연변이체의 스크리닝은 예를 들어 본 명세서에 기재된 검정을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0052] 아미노산 치환은 통상적으로 단일 잔기의 치환이다; 삽입은 보통 약 한 개(1) 내지 약 스무 개(20)의 아미노산 잔기의 차수일 것이지만, 상당히 더 큰 삽입이 용인될 수 있다. 결실은 한 개(1) 내지 약 스무 개(20)의 아미노산 잔기의 범위이지만, 몇몇 경우에 결실은 더 클 수 있다.
- [0053] 치환, 결실, 삽입 또는 임의의 이들의 조합은 최종 유도체 또는 변이체에 도달하도록 이용될 수 있다. 일반적으로 이 변화는 분자의 변경, 특히 항원 결합 단백질의 면역원성 및 특이성을 최소화하기 위해 아주 적은 아미노산에서 수행된다. 그러나, 소정의 상황에서 더 큰 변화가 용인될 수 있다. 보존적 치환은 표 1에 도시된 하기 차트에 따라 일반적으로 이루어진다.

표 1

오리지널 잔기	예시적인 치환
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0054]

[0055]

기능 또는 면역학적 동일성의 실질적인 변화는 표 1에 기재된 것보다 덜 보존적인 치환을 선택함으로써 이루어진다. 예를 들어, 더 상당히 영향을 미치는 치환이 이루어질 수 있다: 변경 부위에서의 폴리펩타이드 골격의 구조, 예를 들어 알파 나선 또는 베타 시트 구조; 표적 부위에서의 분자의 변화 또는 소수화도; 또는 측쇄의 벌크. 일반적으로 폴리펩타이드의 특성을 더 많이 변화시킬 것으로 예상되는 치환은 (a) 친수성 잔기, 예를 들어 세린 또는 트레오닌이 소수성 잔기, 예를 들어 류실, 아이소류실, 페닐알라닌, 발릴 또는 알라닌에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것; (b) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것; (c) 양전성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 라이실, 아르기닌 또는 히스티딘이 음전성 잔기, 예를 들어 글루타미르 또는 아스파틸에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것; 또는 (d) 벌크한 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 페닐알라닌이 측쇄, 예를 들어 글라이신을 갖는 잔기에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것이다.

[0056]

변이체는 통상적으로 동일한 정량적 생물학적 활성을 나타내고, 천연 발생 유사체와 동일한 면역 반응을 발생시킬 것이지만, 변이체는 또한 필요한 바대로 IL-2 뮤테인의 특징을 변형시키도록 선택된다. 대안적으로, 변이체는 IL-2 뮤테인의 생물학적 활성 변경되도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 글라이코실화 부위는 본 명세서에 기재된 바대로 변경되거나 제거될 수 있다.

[0057]

혈청 반감기가 연장된 IL-2 뮤테인

[0058]

본 명세서에 제공된 IL-2 뮤테인은 예를 들어 Teff 또는 NK 세포에 비해 Treg를 우선적으로 증식시키므로, 환자에게 투여될 때 안정성 프로필이 야생형 IL-2 또는 프로류킨(등록상표)(알테스류킨; 노바티스(Novartis)(스위스 바젤))의 것과 다를 것으로 예상된다. 야생형 IL-2 또는 프로류킨(등록상표)과 관련된 부작용은 감기 유사 증상, 냉기/오한, 관절통, 열, 발진, 소양증, 주사 부위 반응, 저혈압, 설사, 오심, 불안, 혼란 및 우울증을 포함한다. 본 명세서에 제공된 IL-2 뮤테인은, 이러한 반감기 연장이 환자에서의 부작용 또는 불리한 사건의 가능성 또는 강도를 증가시키는 위험을 증가시키지 않으면서, 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 분자를 포함하거나 이에 융합되도록 변경될 수 있다. 이러한 연장된 혈청 반감기 뮤테인의 피하 투약은 더 적은 전신 최대 노출(C_{최대})로 연장된 표적 커버리지를 허용할 수 있다. 연장된 혈청 반감기는 뮤테인의 더 적거나 덜 빈번한 투약 섭생을 허용할 수 있다.

[0059]

본 명세서에 제공된 IL-2 뮤테인의 혈청 반감기는 실질적으로 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 연장될

수 있다. 이러한 방법은 신생아 Fc γ 수용체에 결합하거나, 연장된 혈청 반감기를 갖는 단백질, 예를 들어 IgG 또는 인간 혈청 알부민에 결합하는 펩타이드를 포함하도록 IL-2 뮤테인의 서열을 변경하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 융합 분자에 대해 연장된 반감기를 부여하는 폴리펩타이드에 융합된다. 이러한 폴리펩타이드는 IgG Fc 또는 신생아 Fc γ 수용체에 결합하는 다른 폴리펩타이드, 인간 혈청 알부민, 또는 혈청 반감기가 연장된 단백질에 결합하는 폴리펩타이드를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 IgG Fc 분자에 융합된다.

- [0060] IL-2 뮤테인은 IgG Fc 구역의 N 말단 또는 C 말단에 융합될 수 있다. 실시예에 기재된 바대로, IgG Fc 구역의 C 말단에 대한 융합은 IgG Fc의 N 말단에 융합될 때보다 더 높은 정도로 IL-2 뮤테인 활성을 유지한다.
- [0061] 본 발명의 일 실시형태는 IL-2 뮤테인을 항체의 Fc 구역에 융합함으로써 생성된 2개의 Fc-융합 폴리펩타이드를 포함하는 이합체에 관한 것이다. 예를 들어, 융합 단백질을 코딩하는 유전자 융합체를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포에서 유전자 융합을 발현시키고, 발현된 융합 단백질이 더 유사한 항체 분자를 집합하게 함으로써(이때, Fc 모이어티 사이에 사슬 간 결합이 형성되어 이합체를 생성함) 이합체를 만들 수 있다.
- [0062] 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "Fc 폴리펩타이드" 또는 "Fc 구역"은 항체의 Fc 구역으로부터 유도된 폴리펩타이드의 네이티브 및 뮤테인 형태를 포함한다. 이합체화를 촉진하는 힌지 구역을 함유하는 이러한 폴리펩타이드의 절두된 형태가 또한 포함된다. 소정의 실시형태에서, Fc 구역은 항체 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 연장된 혈청 반감기와 함께, Fc 모이어티를 포함하는 융합 단백질(및 이로부터 형성된 올리고머)은 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼 비해 친화도 크로마토그래피에 의한 손쉬운 정제의 이점을 제공한다. 바람직한 Fc 구역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 인간 IgG로부터 유도된다. 본 명세서에서, Fc 내의 특정한 잔기가 위치에 의해 확인된다. 모든 Fc 위치는 EU 넘버링 체계에 기초한다.
- [0063] 항체의 Fc 부분의 기능 중 하나는 항체가 이의 표적에 결합할 때 면역계와 소통하는 것이다. 이는 "이펙터 기능"으로 생각된다. 소통은 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포 식세포작용(ADCP) 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)을 발생시킨다. ADCC 및 ADCP는 면역계의 세포의 표면 상의 Fc 수용체에 대한 Fc의 결합을 통해 매개된다. CDC는 C1q와 같은 보체 시스템의 단백질과의 Fc의 결합을 통해 매개된다.
- [0064] IgG 하위종류는 이펙터 기능을 매개하는 이의 능력이 변한다. 예를 들어, IgG1은 ADCC 및 CDC를 매개하는 데 있어서 IgG2 및 IgG4보다 더 우수하다. 따라서, 이펙터 기능이 바람직하지 않은 실시형태에서, IgG2 Fc가 바람직할 것이다. 그러나, IgG2 Fc 함유 분자가 IgG1 Fc 함유 분자와 비교하여 제조하기 더 어렵고 덜 매력적인 생물물리학 특성, 예컨대 더 짧은 반감기를 갖는 것으로 공지되어 있다.
- [0065] 하나 이상의 돌연변이를 Fc로 도입함으로써 항체의 이펙터 기능은 증가하거나 감소할 수 있다. 본 발명의 실시형태는 이펙터 기능을 증가시키도록 조작된 Fc를 갖는 IL-2 뮤테인 Fc 융합 단백질을 포함한다(미국 7,317,091호 및 문헌[Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009]; 둘 다 그 전문이 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨). 이펙터 기능이 증가한 예시적인 IgG1 Fc 분자는 하기 치환을 갖는 것을 포함한다:
- [0066] S239D/I332E
- [0067] S239D/A330S/I332E
- [0068] S239D/A330L/I332E
- [0069] S298A/D333A/K334A
- [0070] P247I/A339D
- [0071] P247I/A339Q
- [0072] D280H/K290S
- [0073] D280H/K290S/S298D
- [0074] D280H/K290S/S298V
- [0075] F243L/R292P/Y300L
- [0076] F243L/R292P/Y300L/P396L

- [0077] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
- [0078] G236A/S239D/I332E
- [0079] K326A/E333A
- [0080] K326W/E333S
- [0081] K290E/S298G/T299A
- [0082] K290N/S298G/T299A
- [0083] K290E/S298G/T299A/K326E
- [0084] K290N/S298G/T299A/K326E
- [0085] IgG Fc 함유 단백질의 이펙터 기능을 증가시키는 또 다른 방법은 Fc의 푸코실화를 감소시키는 것에 의한다. Fc에 부착된 바이안테너리(biantennary) 복합체 형태의 올리고사카라이드로부터의 코어 푸코스의 제거는, 항원 결합 또는 CDC 이펙터 기능을 변경하지 않으면서, ADCC 이펙터 기능을 크게 증가시킨다. 항체와 같은 Fc 함유 분자의 푸코실화를 감소시키거나 무효화하기 위한 몇몇 방식이 공지되어 있다. 이것은 FUT8 녹아웃 세포주, 변이체 CHO 라인 Lec13, 래트 하이브리도마 세포주 YB2/0, 특이적으로 FUT8 유전자에 대한 작은 간섭 RNA를 포함하는 세포주, 및 β -1,4-*N*-아세틸글루코사미닐전환효소 III 및 골지 α -만노시다제 II를 동시발현하는 세포주를 포함하는 소정의 포유동물 세포주에서 재조합 발현을 포함한다. 대안적으로, Fc 함유 분자는 비포유동물 세포, 예컨대 식물 세포, 효모 또는 원핵생물 세포, 예를 들어 이. 콜라이에서 발현될 수 있다.
- [0086] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 이펙터 기능을 감소시키도록 조작된 Fc를 포함한다. 이펙터 기능이 감소한 예시적인 Fc 분자는 하기 치환을 갖는 것을 포함한다:
- [0087] N297A 또는 N297Q(IgG1)
- [0088] L234A/L235A(IgG1)
- [0089] V234A/G237A(IgG2)
- [0090] L235A/G237A/E318A(IgG4)
- [0091] H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2)
- [0092] C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1)
- [0093] C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1)
- [0094] L234F/L235E/P331S(IgG1)
- [0095] S267E/L328F(IgG1).
- [0096] 인간 IgG1이 N297(EU 넘버링 시스템)에서의 글라이코실화 부위를 갖고 글라이코실화가 IgG1 항체의 이펙터 기능에 기여하는 것으로 공지되어 있다. 서열 번호 3에 예시적인 IgG1 서열이 제공된다. 그룹은 비글라이코실화 항체를 만들기 위한 노력으로 돌연변이된 N297을 갖는다. 돌연변이는 N297을 물리화학적 성질에서 아스파라긴을 닮은 아미노산, 예컨대 글루타민으로 치환하는 것(N297Q) 또는 극성 기가 없는 아스파라긴을 모방하는 알라닌(N297A)으로 치환하는 것에 집중한다.
- [0097] 본 명세서에 사용된 바대로, "비글라이코실화 항체"(aglycosylated antibody) 또는 "비글라이코실화 fc"(aglycosylated fc)는 Fc의 297번 위치에서의 잔기의 글라이코실화 상태를 의미한다. 항체 또는 다른 분자는 하나 이상의 다른 위치에서 글라이코실화를 함유할 수 있지만, 비글라이코실화 항체 또는 비글라이코실화 Fc-융합 단백질인 것으로 여전히 생각될 수 있다.
- [0098] 이펙터 기능이 없는 IgG1 Fc를 만들기 위한 노력으로, 글라이신에 대한 인간 IgG1의 N297 아미노산의 돌연변이, 즉, N297G가 그 잔기에서의 다른 아미노산 치환에 비해 훨씬 더 우수한 정제 효율 및 생물물리학 특성을 제공하는 것으로 발견되었다. 실시예 8을 참조한다. 따라서, 바람직한 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 N297G 치환을 갖는 인간 IgG1 Fc를 포함한다. N297G 치환을 포함하는 Fc는 분자가 인간 IgG1 Fc를 포함하는 임의의 상황에서 유용하고, IL-2 뮤테인 Fc-융합의 상황에서 이용에 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 항체는 N297G 치환을 갖는 Fc를 포함한다.

- [0099] N297G 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc를 포함하는 Fc는 추가의 삽입, 결실 및 치환을 또한 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 인간 IgG1 Fc는 N297G 치환을 포함하고, 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일, 적어도 91% 동일, 적어도 92% 동일, 적어도 93% 동일, 적어도 94% 동일, 적어도 95% 동일, 적어도 96% 동일, 적어도 97% 동일, 적어도 98% 동일 또는 적어도 99% 동일하다. 특히 바람직한 실시형태에서, C 말단 라이신 잔기는 치환되거나 결실된다. C 말단 라이신의 N297G 치환 및 결실을 포함하는 인간 IgG1의 아미노산 서열은 서열 번호 4에 기재되어 있다.
- [0100] 글라이코실화 IgG1 Fc 함유 분자는 글라이코실화 IgG1 Fc 함유 분자보다 덜 안정한 것으로 나타났다. Fc 구역은 비글라이코실화 분자의 안정성을 증가시키도록 추가로 조작될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산은 이합체 상태에서 이황화 결합을 형성하도록 시스테인으로 치환된다. 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열의 잔기 V259, A287, R292, V302, L306, V323 또는 I332는 시스테인으로 치환될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 잔기의 특정한 쌍은 치환이어서 이들은 서로와 이황화 결합을 우선적으로 형성하고, 따라서 이황화 결합 혼합화를 제한하거나 방지한다. 바람직한 쌍은 A287C와 L306C, V259C와 L306C, R292C와 V302C, 및 V323C와 I332C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0101] 하나 이상의 잔기 V259, A287, R292, V302, L306, V323 또는 I332가 시스테인으로 치환된 Fc 함유 분자가 본 명세서에 제공된다. 바람직한 Fc 함유 분자는 A287C와 L306C, V259C와 L306C, R292C와 V302C, 또는 V323C와 I332C 치환을 포함하는 것을 포함한다.
- [0102] IgG1 Fc에 이루어질 수 있는 추가의 돌연변이는 Fc 함유 폴리펩타이드 중에서 이중이합체 형성을 촉진하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, Fc 구역은 세포에서 동시발현될 때 2개의 상이한 Fc 함유 폴리펩타이드 사슬의 이중이합체 형성을 촉진하는 "손잡이(knob)" 및 "홀(hole)"을 생성하도록 조작된다. 미국 제7,695,963호. 다른 실시형태에서, Fc 구역은 세포에서 동시발현될 때 2개의 상이한 Fc 함유 폴리펩타이드의 동종이합체 형성을 저지하면서 이중이합체 형성을 조장하는 정전기 스티어링(electrostatic steering)을 이용하도록 변경된다. WO 09/089,004(본 명세서에서 그 전문이 참조문헌으로 포함됨). 바람직한 이중이합체 Fc는 Fc의 1개의 사슬이 D399K 및 E356K 치환을 포함하고 Fc의 다른 사슬이 K409D 및 K392D 치환을 포함하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc의 1개의 사슬이 D399K, E356K 및 E357K 치환을 포함하고 Fc의 다른 사슬이 K409D, K392D 및 K370D 치환을 포함한다.
- [0103] 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 단량체인 것, 즉 오직 단일의 IL-2 뮤테인 분자를 함유하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 융합 단백질의 Fc-구역은 이중이합체 형성을 촉진하는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 융합 단백질은 Fc-구역(IL-2 뮤테인 Fc-융합 폴리펩타이드에서의 이 구역에 상반 돌연변이를 갖지만 IL-2 뮤테인이 결여됨)과 동시발현된다. 2개의 Fc 함유 폴리펩타이드의 이중이합체가 형성될 때, 생성된 단백질은 오직 단일의 IL-2 뮤테인을 포함한다.
- [0104] 단량체 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 생성하는 또 다른 방법은 IL-2 뮤테인을 단량체 Fc, 즉 이합체화하지 않는 Fc 구역에 융합하는 것이다. 안정한 단량체 Fc는 이합체화를 저지하고 단량체 형태의 분자를 안정화시키는 돌연변이를 포함한다. 바람직한 단량체 Fc는 WO 2011/063348(본 명세서에서 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다. 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc 융합 단백질은 Y349, L351, L368, V397, L398, F405 또는 Y407에서의 트레오닌 치환과 함께 392번 및 409번 위치에서의 음으로 하전된 아미노산을 포함하는 Fc를 포함한다.
- [0105] 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 Fc와 IL-2 뮤테인 사이의 링커를 포함한다. 많은 상이한 링커 폴리펩타이드가 당해 분야에 공지되어 있고, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 상황에서 사용될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 Fc와 IL-2 뮤테인 사이에 GGGGS(서열 번호 5), GGNGT(서열 번호 6) 또는 YGNGT(서열 번호 7)로 이루어진 펩타이드의 하나 이상의 카피를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, Fc 구역과 IL-2 뮤테인 구역 사이의 폴리펩타이드 구역은 GGGGS(서열 번호 5), GGNGT(서열 번호 6) 또는 YGNGT(서열 번호 7)의 단일 카피를 포함한다. 본 명세서에 기재된 바대로, 링커 GGNGT(서열 번호 6) 또는 YGNGT(서열 번호 7)는 적절한 세포에서 발현될 때 글라이코실화되고, 이러한 글라이코실화는 용액 중에서 및/또는 생체내 투여될 때 단백질을 안정화시키는 것을 도울 수 있다. 따라서, 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 융합 단백질은 Fc 구역과 IL-2 뮤테인 구역 사이의 글라이코실화 링커를 포함한다.
- [0106] 글라이코실화 링커가 폴리펩타이드의 상황에 위치할 때 유용할 수 있는 것으로 생각된다. 폴리펩타이드의 아미노산 서열로 삽입되거나 폴리펩타이드의 아미노산 서열 내의 하나 이상의 아미노산을 대체하는 GGNGT(서열 번호 6) 또는 YGNGT(서열 번호 7)를 포함하는 폴리펩타이드가 본 명세서에 제공된다. 바람직한 실시형태에서, GGNGT

(서열 번호 6) 또는 YGNGT(서열 번호 7)는 폴리펩타이드 3차 구조의 루프 내로 삽입된다. 다른 실시형태에서, 루프의 하나 이상의 아미노산은 GGNGT(서열 번호 6) 또는 YGNGT(서열 번호 7)로 대체된다.

- [0107] Fc의 C 말단 부분 및/또는 IL-2 뮤테인의 아미노 말단 부분은 포유동물 세포에서 발현될 때 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 글라이코실화 프로필을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 T3 치환, 예를 들어 T3N 또는 T3A를 추가로 포함한다. IL-2 뮤테인은 S5 치환, 예컨대 S5T를 추가로 포함한다.
- [0108] IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 공유 변형이 본 발명의 범위 내에 포함되고, 일반적으로(그러나, 항상 그렇지는 않음) 번역 후 수행된다. 예를 들어, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 몇몇 유형의 공유 변형은 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 특정한 아미노산 잔기를 선택된 측쇄, 또는 N 또는 C 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화 물질과 반응시킴으로써 분자로 도입된다.
- [0109] 시스테인 잔기는 가장 흔히 α -할로아세테이트(및 상응하는 아민), 예컨대 클로로아세테산 또는 클로로아세테아마이드와 반응하여, 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 생성한다. 시스테인 잔기는 또한 브로모트라이플루오로아세톤, α -브로모- β -(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-나이트로-2-피리딜 다이설파이드, 메틸 2-피리딜 다이설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-나이트로페놀 또는 클로로-7-나이트로벤조-2-옥사-1,3-다이아졸과의 반응에 의해 유도체화된다.
- [0110] 히스티딘 잔기는 pH 5.5-7.0에서 다이에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 유도체화되는데, 왜냐하면 이 물질은 히스티딘 측쇄에 대해 비교적 특이적이기 때문이다. 파라-브로모페닐 브로마이드가 또한 유용하고; 반응은 바람직하게는 pH 6.0에서 0.1M 나트륨 카코딜레이트 중에 수행된다.
- [0111] 라이시닐 및 아미노 말단 잔기는 숙신산 또는 다른 카복실산 무수물과 반응한다. 이 물질에 의한 유도체화는 라이시닐 잔기의 전하를 반대로 하는 효과를 갖는다. 알파-아미노 함유 잔기를 유도체화하기 위한 다른 적합한 시약은 이미도에스터, 예컨대 메틸 피콜린이미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로하이드라이드; 트라이나이트로벤젠설포산; O-메틸아이소우레아; 2,4-펜탄다이온; 및 글라이옥살레이트와의 트랜스아미나제 촉매화 반응을 포함한다.
- [0112] 아르기닐 잔기는 하나 또는 몇몇 종래의 시약, 이들 중에서 페닐글라이옥살, 2,3-뷰탄다이온, 1,2-사이클로헥산다이온 및 닐하이드린과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 작용기의 높은 pK_a 때문에 반응이 알칼리 조건 하에 수행될 것을 요한다. 더욱이, 이 시약은 라이신의 기 및 아르기닌 엘프론-아미노기와 반응할 수 있다.
- [0113] 티로실 잔기의 특정한 변형이 이루어질 수 있고, 방향족 다이아조늄 화합물 또는 테트라나이트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼 라벨을 티로실 잔기로 도입하는 것이 특히 중요하다. 가장 흔히, N-아세틸이미다졸 및 테트라나이트로메탄은 각각 O-아세틸 티로실 중 및 3-나이트로 유도체를 형성하도록 사용된다. 티로실 잔기는 방사면역검정에서 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조하기 위해 125 I 또는 131 I를 이용하여 요오드화되고, 상기 기재된 클로르아민 T 방법이 적합하다.
- [0114] 카복실 측기(아스파틸 또는 글루타미드)는 카보다이이미드($R'-N=C=N-R'$)(여기서, R 및 R'는 임의로 상이한 알킬기, 예컨대 1-사이클로헥실-3-(2-몰폴리닐-4-에틸) 카보다이이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-다이메틸펜틸) 카보다이이미드)와의 반응에 의해 선택적으로 변형된다. 더욱이, 아스파틸 및 글루타미드 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.
- [0115] 이작용성 물질에 의한 유도체화는 다양한 방법에서 사용하기 위한 수불용성 지지 매트릭스 또는 표면에 항원 결합 단백질을 가교결합시키는 데 유용하다. 흔히 사용되는 가교결합제는 예를 들어 1,1-비스(다이아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스터, 예를 들어 4-아지도살리실산과의 에스터, 호모이작용성 이미도에스터, 예를 들어 다이숙신이미드 에스터, 예컨대 3,3'-다이티오비스(숙신이미드프로피오네이트) 및 이작용성 말레이미드, 예컨대 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄을 포함한다. 유도체화 물질, 예컨대 메틸-3-[(p-아지도페닐)다이티오]프로피오이미데이트는 광의 존재 하에 가교결합을 형성할 수 있는 광 활성화 가능한 중간체를 생성한다. 대안적으로, 반응성 수불용성 매트릭스, 예컨대 사이아노젠 브로마이드 활성화 탄수화물 및 미국 특허 제3,969,287호; 제3,691,016호; 제4,195,128호; 제4,247,642호; 제4,229,537호; 및 제4,330,440호에 기재된 반응성 기질이 단백질 부동화에 이용된다.
- [0116] 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기는 흔히 각각 상응하는 글루타미드 및 아스파틸 잔기로 탈아미드화된다. 대안적

으로, 이들 잔기는 온화한 산성 조건 하에 탈아미드화된다. 이들 잔기 중 어느 한 형태가 본 발명의 범위 내에 해당한다.

- [0117] 다른 변형은 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 하이드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 α -아미노기의 메틸화(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), N 말단 아민의 아세틸화 및 임의의 C 말단 카복실기의 아미드화를 포함한다.
- [0118] 본 발명의 범위 내에 포함된 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 또 다른 유형의 공유 변형은 단백질의 글라이코실화 패턴을 변경하는 것을 포함한다. 당해 분야에 공지된 바대로, 글라이코실화 패턴은 단백질의 서열 둘 다(예를 들어, 하기 기재된 바대로 특정한 글라이코실화 아미노산 잔기의 존재 또는 부재), 또는 단백질이 생성되는 숙주 세포 또는 유기체에 따라 달라질 수 있다. 특정한 발현 시스템은 하기 기재되어 있다.
- [0119] 폴리펩타이드의 글라이코실화는 통상적으로 N 연결 또는 O 연결된다. N 연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. 트라이-펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소 부착을 위한 인지 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드에서의 이 트라이-펩타이드 서열 중 어느 하나의 존재는 가능한 글라이코실화 부위를 생성한다. O 연결 글라이코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나의 하이드록시아미노산, 가장 흔히 세린 또는 트레오닌에 대한 부착을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신이 또한 사용될 수 있다.
- [0120] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질에 대한 글라이코실화 부위의 부가는 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 수행될 수 있어서, 이것은 (N 연결 글라이코실화 부위에 대해) 하나 이상의 상기 기재된 트라이-펩타이드 서열을 함유한다. (O 연결 글라이코실화 부위에 대해) 시작 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가, 또는 이들 잔기에 의한 치환에 의해 또한 변경될 수 있다. 용이함을 위해, 원하는 아미노산로 번역되는 코돈이 생성되도록 특히 미리 선택된 염기에서 표적 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA를 돌연변이시킴으로써 DNA 수준에서의 변화를 통해 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 아미노산 서열은 바람직하게는 변경된다.
- [0121] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 증가시키는 또 다른 수단은 단백질에 대한 글라이코사이드의 화학 또는 효소 커플링에 의한다. 이 절차는 이것이 N 및 O 연결 글라이코실화에 대한 글라이코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서 단백질의 생성을 요하지 않는다는 점에서 유리하다. 이용된 커플링 모드에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 유리 설프하이드릴기, 예컨대 시스테인의 것, (d) 유리 하이드록실기, 예컨대 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 것, (e) 방향족 잔기, 예컨대 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것 또는 (f) 글루타민의 아마이드기에 부착될 수 있다. 이 방법은 WO 87/05330(1987년 9월 11일에 공개) 및 문헌[Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306]에 기재되어 있다.
- [0122] 출발물질인 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소로 수행될 수 있다. 화학 탈글라이코실화는 화합물 트라이플루오로메탄설폰산 또는 동등 화합물에 대한 단백질의 노출을 요한다. 이러한 처리는, 폴리펩타이드가 온전하게 있도록 하면서, 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 개열을 발생시킨다. 화학 탈글라이코실화는 문헌[Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52] 및 문헌[Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131]에 기재되어 있다. 폴리펩타이드 상의 탄수화물 모이어티의 효소 개열은 문헌[Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350]에 기재된 바대로 다양한 엔도- 및 엑소-글라이코시다제의 사용에 의해 성취될 수 있다. 가능한 글라이코실화 부위에서의 글라이코실화는 문헌[Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105]에 기재된 바대로 화합물 투니카마이신의 사용에 의해 방지될 수 있다. 투니카마이신은 단백질-N-글라이코사이드 계통의 형성을 차단한다.
- [0123] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 또 다른 유형의 공유 변형은, 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 기재된 방식으로, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 다양한 폴리올, 예컨대 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리프로필렌 글라이콜 또는 폴리옥시알킬렌(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 다양한 비단백질성 중합체에 연결하는 것을 포함한다. 또한, 중합체, 예컨대 PEG의 부가를 수월하게 하도록 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 내의 다양한 위치에서 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시형태는 PEG화 IL-2 뮤테인 및

IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 포함한다. 이러한 PEG화 단백질은 비-PEG화 단백질에 비해 증가한 반감기 및/또는 감소한 면역원성을 가질 수 있다.

[0124] **IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드**

[0125] IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 핵산이 본 발명 내에 포함된다. 본 발명의 양상은 (예를 들어, 축퇴성으로 인해) 본 명세서에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 변이체를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 단리된 핵산에 의해 코딩된 폴리펩타이드는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 성분이다.

[0126] 핵산의 단리를 위한 프로브 또는 프라이머로서 또는 데이터베이스 조사에 대한 질의 서열로서 사용되는, 본 명세서에 기재된 아미노산 서열에 상응하는 뉴클레오타이드 서열은 아미노산 서열로부터의 "백 번역"에 의해 얻어질 수 있다. 널리 공지된 중합효소 사슬 반응(PCR) 절차는 IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 단리하고 증폭하기 위해 이용될 수 있다. DNA 단편의 조합의 원하는 말단을 한정하는 올리고뉴클레오타이드는 5' 및 3' 프라이머로서 사용된다. 올리고뉴클레오타이드는 DNA 단편의 증폭된 조합의 발현 벡터로의 삽입을 수월하게 하기 위해 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인지 부위를 추가로 함유할 수 있다. PCR 기술이 문헌[Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; 및 *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990)]에 기재되어 있다.

[0127] 본 발명의 핵산 분자는 단일 가닥 및 이중 가닥 형태 둘 다의 DNA 및 RNA, 및 상응하는 보체 서열을 포함한다. "단리된 핵산"은 천연 발생 공급원으로부터 단리된 핵산의 경우에 핵산이 단리된 유기체의 게놈에 존재하는 인접한 유전자 서열로부터 분리된 핵산이다. 예를 들어, PCR 생성물, cDNA 분자 또는 올리고뉴클레오타이드와 같은, 주형으로부터 효소에 의해 또는 화학적으로 합성된 핵산의 경우에, 이러한 과정으로부터 생긴 핵산이 단리된 핵산인 것으로 이해된다. 단리된 핵산 분자는 별개의 단편의 형태의 핵산 분자 또는 더 큰 핵산 작제물의 성분으로서의 핵산 분자를 의미한다. 바람직한 일 실시형태에서, 핵산은 오염시키는 내인성 물질이 실질적으로 없다. 핵산 분자는 바람직하게는 표준 생물화학 방법에 의해 이의 성분 뉴클레오타이드 서열의 확인, 조작 및 회수가 가능하게 하는 분량 또는 농도로, 실질적으로 순수한 형태로, 적어도 한번 단리된 DNA 또는 RNA로부터 유도된다(예컨대, 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)]에 기재된 것). 이러한 서열은 바람직하게는 진핵생물 유전자에 통상적으로 존재하는, 인트론 또는 내부 비번역된 서열에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공되고/되거나 작제된다. 비번역된 DNA의 서열은 오픈 리딩 프레임으로부터 5' 또는 3'에 존재할 수 있고, 여기서 이것은 코딩 구역의 조작 또는 발현을 방해하지 않는다.

[0128] 본 발명에 따른 변이체는, 변이체를 코딩하는 DNA를 제조하고, 이후 본 명세서에 기재된 바대로 세포 배양물에서 재조합 DNA를 발현시키기 위해, 카세트 또는 PCR 돌연변이유발 또는 당해 분야에 널리 공지된 다른 기술을 이용하여, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 DNA에서 뉴클레오타이드의 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 보통 제조된다. 그러나, IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합은 확립된 기술을 이용하여 **실�험실내** 합성에 의해 제조될 수 있다. 변이체는 Treg 증식과 같은 천연 발생 유사체와 동일한 정량적 생물학적 활성을 통상적으로 나타내지만, 변이체는 또한 변형된 특징(하기 더 완전히 기재됨)을 갖도록 선택될 수 있다.

[0129] 당해 분야의 당업자가 이해하는 바대로, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 극도로 많은 수의 핵산이 만들어질 수 있고, 이들 모두는 본 발명의 IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩한다. 따라서, 특정한 아미노산 서열이 확인되면서, 당해 분야의 당업자는 코딩된 단백질의 아미노산 서열을 변경하지 않는 방식으로 하나 이상의 코돈의 서열을 단순히 변형시킴으로써 임의의 수의 상이한 핵산을 만들 수 있다.

[0130] 본 발명은 또한 상기와 같은 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트의 형태의 발현 시스템 및 작제물을 제공한다. 또한, 본 발명은 이러한 발현 시스템 또는 작제물을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0131] 통상적으로, 임의의 숙주 세포에서 사용된 발현 벡터는 플라스미드 유지와 외인성 뉴클레오타이드 서열의 클로닝 및 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 소정의 실시형태에서 "플랭킹 서열"(flanking sequence)이라 일괄적으로 불리는 이러한 서열은 통상적으로 하나 이상의 하기 뉴클레오타이드 서열을 포함할 것이다: 프로모터, 하나 이상의 인핸서 서열, 복제 기원, 전사 종결 서열, 도너 및 억셉터 스플라이스 부위를 함유하는 완전한 인트론 서열, 폴리펩타이드 분비를 위한 리더 서열을 코딩하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현하

고자 하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 구역, 및 선택 가능한 마커 구성성분. 이러한 서열의 각각은 하기 기재되어 있다.

[0132] 임의로, 벡터는 "태그" 코딩 서열, 즉 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 코딩 서열의 5' 또는 3' 말단에 위치한 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유할 수 있다; 올리고뉴클레오타이드 서열은 폴리His(예컨대, 핵사His(서열 번호 21)) 또는 또 다른 "태그", 예컨대 FLAG, HA(헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스) 또는 myc(이를 위해 상업적으로 구입 가능한 항체가 존재함)를 코딩한다. 이 태그는 폴리펩타이드의 발현 시 폴리펩타이드에 통상적으로 융합되고, 숙주 세포로부터의 IL-2 뮤테인의 친화도 정제 또는 검출을 위한 수단으로서 작용할 수 있다. 친화도 정제는 예를 들어 친화도 매트릭스로서 태그에 대한 항체를 사용하는 칼럼 크로마토그래피에 의해 성취될 수 있다. 임의로, 태그는 개질을 위해 소정의 펩티다제를 사용하는 것과 같은 다양한 수단에 의해 정제된 IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질로부터 후속하여 제거될 수 있다.

[0133] 플랭킹 서열은 상동성(즉, 숙주 세포와 동일한 종 및/또는 균주 유래), 이종성(즉, 숙주 세포 종 또는 균주와 다른 종 유래), 하이브리드(즉, 하나 초과와 공급원으로부터의 플랭킹 서열의 조합), 합성 또는 네이티브일 수 있다. 그러므로, 플랭킹 서열의 공급원은 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 유기체, 임의의 척추동물 또는 무척추동물 유기체, 또는 임의의 식물일 수 있고, 단 플랭킹 서열은 숙주 세포 기계에서 기능성이고 이에 의해 활성화될 수 있다.

[0134] 본 발명의 벡터에서 유용한 플랭킹 서열은 당해 분야에 널리 공지된 임의의 여러 방법에 의해 얻어질 수 있다. 통상적으로, 본 명세서에서 유용한 플랭킹 서열은 맵핑함으로써 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 분해에 의해 미리 확인될 것이고, 따라서 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 적절한 조직 공급원으로부터 분리될 수 있다. 몇몇 경우에, 플랭킹 서열의 완전 뉴클레오타이드 서열이 공지될 수 있다. 여기서, 플랭킹 서열은 핵산 합성 또는 클로닝에 대해 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 합성될 수 있다.

[0135] 플랭킹 서열의 모두 또는 오직 일부가 공지되든, 중합효소 사슬 반응(PCR)을 이용하여 및/또는 동일한 또는 또 다른 종으로부터의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 플랭킹 서열 단편과 같은 적합한 프로브를 갖는 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 이것이 얻어질 수 있다. 플랭킹 서열이 공지되지 않은 경우, 플랭킹 서열을 함유하는 DNA의 단편은 예를 들어 코딩 서열 또는 심지어 또 다른 유전자 또는 유전자들을 함유할 수 있는 DNA의 더 큰 조각으로부터 분리될 수 있다. 분리는 적절한 DNA 단편을 제조한 후 아가로스 겔 정제, 퀴아젠(등록상표) 칼럼 크로마토그래피(캘리포니아주 챗스워스) 또는 당업자에게 공지된 다른 방법을 이용하여 분리시키기 위해 제한 엔도뉴클레아제에 의해 성취될 수 있다. 이 목적을 성취하기 위한 적합한 효소의 선택은 당해 분야의 당업자에게 용이하게 명확할 것이다.

[0136] 복제 기원은 통상적으로 상업적으로 구입한 원핵생물 발현 벡터의 일부이고, 그 기원은 숙주 세포에서 벡터의 증폭을 돕는다. 선택된 벡터가 복제 기원 부위를 함유하지 않는 경우, 이것은 공지된 서열에 기초하여 화학적으로 합성되고, 벡터에 결합될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 pBR322(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 매사추세츠 비벌리)로부터의 복제 기원은 대부분의 그람 음성 박테리아에 적합하고, 다양한 바이러스 기원(예를 들어, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 소낭성 스토마티투스 바이러스(vesicular stomatitis virus: VSV) 또는 파필로마바이러스, 예컨대 HPV 또는 BPV)이 포유동물 세포에서 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기원 성분은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않다(예를 들어, 오로지 SV40 기원이 바이러스 초기 프로모터를 또한 함유하므로 이것이 대개 사용된다).

[0137] 전사 종결 서열은 통상적으로 폴리펩타이드 코딩 구역의 말단의 3'에 위치하고 전사를 종결시키도록 작용한다. 보통, 원핵생물 세포에서의 전사 종결 서열은 G-C 농후 단편 이후의 폴리-T 서열이다. 서열이 라이브러리로부터 쉽게 클로닝되거나 심지어 벡터의 일부로서 상업적으로 구입되지만, 이것은 핵산 합성에 대한 방법, 예컨대 본 명세서에 기재된 것을 이용하여 또한 용이하게 합성될 수 있다.

[0138] 선택 가능한 마커 유전자는 선택 가능한 배양 배지에서 성장한 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 통상적인 선택 마커 유전자는 (a) 원핵생물 숙주 세포의 경우 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 테트라사이클린 또는 카나마이신에 대한 내성을 부여하는 단백질; (b) 세포의 영양요구성 결핍을 보완하는 단백질; 또는 (c) 복합 배지 또는 한정 배지로부터 이용 가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다. 구체적인 선택 가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자 및 테트라사이클린 내성 유전자이다. 유리하게는, 네오마이신 내성 유전자는 원핵생물 및 진핵생물 숙주 세포 둘 다에서 선택을 위해 또한 사용될 수 있다.

- [0139] 다른 선택 가능한 유전자는 발현될 유전자를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 증폭은 성장 또는 세포 생존에 중요한 단백질의 생성에 필요한 유전자가 재조합 세포의 지속적인 생성의 염색체 내에 탠덤식으로 반복되는 과정이다. 포유동물 세포에 적합한 선택 가능한 마커의 예는 다이하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase: DHFR) 및 프로모터 무 타이르니딘 키나제 유전자를 포함한다. 포유동물 세포 형질전환체는 오직 형질전환체가 박테리아에 존재하는 선택 가능한 유전자에 의해 생존하도록 독특하게 적합화된 선택 압박 하에 놓인다. 배지 중의 선택 물질의 농도가 연속하여 증가하여, 선택 가능한 유전자, 및 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질과 같은 또 다른 유전자를 코딩하는 DNA 둘 다를 증폭시키는 조건 하에 형질전환된 세포를 배양함으로써 선택 압박이 부여된다. 그 결과, 증가한 분량의 폴리펩타이드, 예컨대 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 증폭된 DNA로부터 합성된다.
- [0140] 리보솜 결합 부위는 보통 mRNA의 번역 개시에 필요하고, 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열(원핵생물) 또는 코작(Kozak) 서열(진핵생물)을 특징으로 한다. 구성성분은 통상적으로 프로모터의 3' 및 발현하고자 하는 폴리펩타이드의 코딩 서열의 5'에 위치한다. 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 코딩 구역은 내부 리보솜 결합 부위(internal ribosome binding site: IRES)에 작동 가능하게 연결되어, 단일 RNA 전사체로부터의 2개의 오픈 리딩 프레임의 번역을 허용할 수 있다.
- [0141] 진핵생물 숙주 세포 발현 시스템에서 글라이코실화가 바람직한 것과 같은 몇몇 경우에, 글라이코실화 또는 수율을 개선하기 위해 다양한 프리서열(presequence) 또는 프로서열(prosequence)을 조작할 수 있다. 예를 들어, 특정한 신호 펩타이드의 펩티다제 개열 부위를 변경하거나, 프로서열을 부가할 수 있고, 이것은 글라이코실화에 또한 영향을 미칠 수 있다. 최종 단백질 생성물은 (성숙 단백질의 제1 아미노산에 대해) -1 위치에서 발현에 따른 하나 이상의 추가의 아미노산을 가질 수 있고, 이것은 완전히 제거되지 않을 수 있다. 예를 들어, 최종 단백질 생성물은 아미노 말단에 부착된 펩티다제 개열 부위에서 발견되는 1개 또는 2개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 대안적으로, 몇몇 효소 개열 부위의 사용은, 효소가 성숙 폴리펩타이드 내의 이 부위에서 절단되는 경우, 원하는 폴리펩타이드의 약간 절단된 형태를 발생시킬 수 있다.
- [0142] 본 발명의 발현 및 클로닝 벡터는 숙주 유기체에 의해 인식되고 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 분자에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 통상적으로 함유할 것이다. 프로모터는 구조적 유전자의 전사를 제어하는 구조적 유전자의 시작 코돈의 상류(일반적으로 약 100 내지 1000bp 내)에 위치한(즉, 5') 비전사 서열이다. 프로모터는 종래에 2개의 종류 중 하나로 그룹화된다: 유도성 프로모터 및 구성적 프로모터. 유도성 프로모터는 배양 조건의 여러 변화, 예컨대 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도 변화에 반응하여 이의 제어 하에 DNA로부터 증가한 전사 수준을 개시시킨다. 구성적 프로모터는 반면 이것이 작동 가능하게 연결된, 즉 유전자 발현을 제어하지 않거나 거의 제어하지 않는 유전자를 균일하게 전사시킨다. 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식된 다수의 프로모터가 널리 공지되어 있다.
- [0143] 효모 숙주와 사용하기에 적합한 프로모터가 또한 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 효모 인헨서는 유리하게는 효모 프로모터와 사용된다. 포유동물 숙주 세포와 사용하기에 적합한 프로모터가 널리 공지되어 있고, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 2), 소 파필로마 바이러스, 조류 육종 바이러스, 거대세포바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 유인원 바이러스 40(SV40)과 같은 바이러스의 게놈으로부터 얻은 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 다른 적합한 포유동물 프로모터는 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들어 열 충격 프로모터 및 액틴 프로모터를 포함한다.
- [0144] 중요할 수 있는 추가의 프로모터는 SV40 초기 프로모터(Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); CMV 프로모터(Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); 라우스 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복부에 함유된 프로모터(Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797); 헤르페스 타이미딘 키나제 프로모터(Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); 메탈로티오닌 유전자로부터의 프로모터 및 조절 서열(Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); 및 원핵생물 프로모터, 예컨대 베타-락타마제 프로모터(Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); 또는 tac 프로모터(DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 조직 특이성을 나타내고 형질전환 동물에서 이용되는 하기의 동물 전사 제어 구역이 또한 중요하다: 췌장 선포 세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 제어 구역(Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 제어 구역(Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); 림프 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 제어 구역(Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); 고환, 유방, 림프 세포 및 비만 세포에서 활성

인 마우스 유방 종양 바이러스 제어 구역(Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495); 간에서 활성인 알부민 유전자 제어 구역(Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1 :268-276); 간에서 활성인 알파-태아-단백질 유전자 제어 구역(Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58); 간에서 활성인 알파 1-안티트립신 유전자 제어 구역(Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); 골수 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 제어 구역(Mogham *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); 뇌에서의 올리고수지상 세포에서 활성인 수초 염기성 단백질 유전자 제어 구역(Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-712); 골격근에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 제어 구역(Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); 및 시상하부에서 활성인 생식선자극 방출 호르몬 유전자 제어 구역(Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-1378).

[0145] 인헨서 서열은 더 고등의 진핵생물에 의해 전사를 증가시키도록 벡터로 삽입될 수 있다. 인헨서는 전사를 증가시키도록 프로모터에서 작용하는 보통 약 10-300bp 길이의 DNA의 시스 작용 구성성분이다. 인헨서는 비교적 배향 및 위치 독립적이고, 전사 단위의 5' 및 3' 둘 다의 위치에서 발견된다. 포유동물 유전자로부터 구입 가능한 몇몇 인헨서 서열(예를 들어, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-태아-단백질 및 인슐린)이 공지되어 있다. 그러나, 통상적으로, 바이러스로부터의 인헨서가 사용된다. 당해 분야에 공지된 SV40 인헨서, 거대세포바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서는 진핵생물 프로모터의 활성화를 위한 예시적인 인헨서 작용의 구성성분이다. 인헨서는 벡터에서 코딩 서열의 5' 또는 3'에 위치할 수 있지만, 이것은 통상적으로 프로모터로부터의 5' 부위에 위치한다. 적절한 네이티브 또는 이중성 신호 서열을 코딩하는 서열(리더 서열 또는 신호 펩타이드)은 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 세포의 분비를 촉진하도록 발현 벡터로 혼입될 수 있다. 신호 펩타이드 또는 리더의 선택은 단백질이 생성되는 숙주 세포의 유형에 따라 달라지고, 이중성 신호 서열은 네이티브 신호 서열을 대체할 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 작용성인 신호 펩타이드의 예는 하기를 포함한다: US 특허 제4,965,195호에 기재된 인터류킨-7(IL-7)에 대한 신호 서열; 문헌[Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312:768]에 기재된 인터류킨-2 수용체에 대한 신호 서열; EP 특허 제0367 566호에 기재된 인터류킨-4 수용체 신호 펩타이드; 미국 특허 제4,968,607호에 기재된 I형 인터류킨-1 수용체 신호 펩타이드; EP 특허 제0 460 846호에 기재된 II형 인터류킨-1 수용체 신호 펩타이드.

[0146] 벡터는 벡터가 숙주 세포 계층으로 통합될 때 발현을 촉진하는 하나 이상의 구성성분을 함유할 수 있다. 예는 EASE 구성성분(Aldrich *et al.* 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) 및 기질 부착 구역(matrix attachment region: MAR)을 포함한다. MAR은 염색질의 구조적 조직화를 매개하고, "위치" 효과로부터 통합된 벡터를 보호할 수 있다. 따라서, MAR은 벡터가 안정한 형질전환체를 생성하도록 사용될 때 특히 유용하다. 다수의 천연 및 합성 MAR 함유 핵산이 당해 분야, 예를 들어 미국 특허 제6,239,328호; 제7,326,567호; 제6,177,612호; 제6,388,066호; 제6,245,974호; 제7,259,010호; 제6,037,525호; 제7,422,874호; 제7,129,062에 공지되어 있다.

[0147] 본 발명의 발현 벡터는 시작 벡터, 예컨대 상업적으로 구입 가능한 벡터로부터 작제될 수 있다. 이러한 벡터는 원하는 플랜킹 서열의 전부를 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 본 명세서에 기재된 하나 이상의 플랜킹 서열이 벡터에 이미 존재하지 않는 경우, 이것은 개별적으로 얻어지고 벡터로 결합될 수 있다. 각각의 플랜킹 서열을 얻기 위해 이용된 방법은 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0148] 벡터를 작제하고 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 벡터의 적절한 부위로 삽입한 후, 완성된 벡터를 증폭 및/또는 폴리펩타이드 발현을 위해 적합한 숙주 세포로 삽입할 수 있다. 선택된 숙주 세포로의 발현 벡터의 형질전환을 형질감염, 감염, 인산칼슘 공침, 전기천공, 마이크로주사, 리포펙션, DEAE-덱스트란 매개 형질감염 또는 다른 공지된 기술을 포함하는 널리 공지된 방법에 의해 성취할 수 있다. 선택된 방법은, 부분적으로, 사용되는 숙주 세포의 유형의 기능일 것이다. 이 방법 및 다른 적합한 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 예를 들어 상기 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌(2001)에 기재되어 있다.

[0149] 숙주 세포는 적절한 조건 하에 배양될 때 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 합성하고, 이들은 후속하여 (숙주 세포가 배지로 이를 분비하는 경우) 배양 배지로부터 또는 (이것이 분비되지 않는 경우) 이것을 생성하는 숙주 세포로부터 직접 수집될 수 있다. 적절한 숙주 세포의 선택은 원하는 발현 수준, 활성에 바람직하거나 필요한 폴리펩타이드 변형(예컨대, 글라이코실화 또는 인산화) 및 생물학적으로 활성인 분자로의 폴딩의 용이성과 같은 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물일 수 있다.

[0150] 발현에 대한 숙주로서 이용 가능한 포유동물 세포주는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 미국 배양 수집 협회(American Type Culture Collection: ATCC)로부터 구입 가능한 불활화 세포주를 포함하지만 이것으로 제한되지 않고, 당해 분야에 공지된 발현 시스템에서 사용된 임의의 세포주는 본 발명의 제조법 폴리펩타이드를 제조하기

위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포는 원하는 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된다. 이용될 수 있는 숙주 세포 중에는 원핵생물, 효모 또는 더 고등의 진핵생물 세포가 있다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 이. 콜라이 또는 바실러스를 포함한다. 더 고등의 진핵생물 세포는 곤충 세포 및 포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예는 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주(ATCC CRL 1651)(Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175), L 세포, 293 세포, C127 세포, 3T3 세포(ATCC CCL 163), 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 이들의 유도체, 예컨대 Veggie CHO 및 혈청 비함유 배지 중에 성장하는 관련 세포주(Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), HeLa 세포, BHK(ATCC CRL 10) 세포주, 및 문헌[McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821]에 기재된 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CVI로부터 유도된 CVI/EBNA 세포주(ATCC CCL 70), 인간 배아 신장 세포, 예컨대 293, 293 EBNA 또는 MSR 293, 인간 상피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 다른 형질전환된 영양류 세포주, 정상 이배체 세포, 1차 조직의 실험실내 배양으로부터 유도된 세포 균주, 1차 외식편, HL-60, U937, HaK 또는 주카트(Jurkat) 세포를 포함한다. 임의로, 포유동물 세포주, 예컨대 HepG2/3B, KB, NIH 3T3 또는 S49 등은 다양한 신호 형질도입 또는 리포터 검정에서 폴리펩타이드를 사용하는 것이 바람직할 때 폴리펩타이드의 발현에 사용될 수 있다.

[0151] 대안적으로, 더 저등의 진핵생물, 예컨대 효모 또는 원핵생물, 예컨대 박테리아에서 폴리펩타이드를 제조할 수 있다. 적합한 효모는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스치조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 균주, 칸디다 또는 이중성 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 효모 균주를 포함한다. 적합한 박테리아 균주는 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 이중성 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 박테리아 균주를 포함한다. 폴리펩타이드가 효모 또는 박테리아에서 만들어지는 경우, 작용성 폴리펩타이드를 얻기 위해, 예를 들어 적절한 부위의 인산화 또는 글라이코실화에 의해 내부에 생성된 폴리펩타이드를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 공유 부착은 공지된 화학 또는 효소 방법을 이용하여 성취될 수 있다.

[0152] 하나 이상의 곤충 발현 벡터에서 본 발명의 단리된 핵산을 적합한 제어 서열에 작동 가능하게 연결하고, 곤충 발현 시스템을 이용함으로써 폴리펩타이드를 또한 제조할 수 있다. 바콜로바이러스/곤충 세포 발현 시스템에 대한 재료 및 방법은 예를 들어 인비트로젠(Invitrogen)(미국 캘리포니아주 샌 디에고)(MaxBac(등록상표) 키트)사제의 키트 형태로 상업적으로 구입 가능하고, 이러한 방법은 문헌[Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) 및 Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988)]에 기재된 바대로 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 본 명세서에 개시된 핵산 작제물로부터 유도된 RNA를 사용하여 폴리펩타이드를 제조하기 위해 세포 비함유 번역 시스템을 또한 이용할 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유동물 세포 숙주와 사용하기에 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 문헌[Pouwels *et al.* (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985)]에 기재되어 있다. 바람직하게는 적어도 하나의 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포는 "재조합 숙주 세포"이다.

[0153] 소정의 양상에서, 본 발명은 T 조절 세포를 우선적으로 자극하고 V91K 치환 및 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 인간 IL-2 뮤테인을 코딩하는 단리된 핵산을 포함한다. 단리된 핵산은 본 명세서에 제공된 임의의 예시적인 IL-2 뮤테인을 코딩할 수 있다.

[0154] 본 명세서에 기재된 임의의 예시적인 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산이 또한 포함된다. 바람직한 실시형태에서, 항체의 Fc 부분 및 인간 IL-2 뮤테인은, 임의로 Fc 구역과 IL-2 뮤테인 사이에 코딩된 링커와 함께, 단일 오픈 리딩 프레임 내에 코딩된다.

[0155] 또 다른 양상에서, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 IL-2 뮤테인- 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 코딩 핵산을 포함하는 발현 벡터가 본 명세서에 제공된다.

[0156] 또 다른 양상에서, 상기 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포가 본 명세서에 제공된다. 숙주 세포는 원핵생물 세포, 예컨대 이. 콜라이일 수 있거나, 진핵생물 세포, 예컨대 포유동물 세포일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주이다.

[0157] 또 다른 양상에서, 인간 IL-2 뮤테인을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 상기 방법은 인간 IL-2 뮤테인에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 발현되는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 후속하여, 인간 IL-2 뮤테인을 상기 배양물로부터 수확한다. IL-2 뮤테인을 배양 배지 및/또는 숙주 세포 용해물로부터 수확

할 수 있다.

[0158] 또 다른 양상에서, 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 상기 방법은 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 발현되는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 후속하여, 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 상기 배양물로부터 수확한다. 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 배양 배지 및/또는 숙주 세포 용해물로부터 수확할 수 있다.

[0159] 약제학적 조성물

[0160] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 IL-2 뮤테인을 약제학적으로 효과적인 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 보존제 및/또는 아췌번트와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인은 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 상형 내에 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 액체, 냉동 및 동결건조 조성물을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0161] 바람직하게는, 제형 물질은 이용되는 투약량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이다. 구체적인 실시형태에서, 치료학적 유효량의 치료학적 분자를 함유하는 IL-2 뮤테인, 예를 들어 IL-2 뮤테인 Fc-융합체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0162] 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 예를 들어 조성물의 pH, 오스몰농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균성, 안정성, 분해 또는 방출 속도, 흡수 또는 투과를 변경하거나 유지시키거나 보존하기 위해 제형 물질을 함유할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 적합한 제형 물질은 아미노산(예컨대, 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 프롤린 또는 라이신); 항미생물제; 항산화제(예컨대, 소르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨); 완충제(예컨대, 붕산염, 중탄산염, 트리스-HCl, 시트르산염, 인산염 또는 다른 유기 산); 벌크화제(예컨대, 만니톨 또는 글라이신); 킬레이트화제(예컨대, 에틸렌다이아민 테트라아세트산(EDTA)); 착화제(예컨대, 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-사이클로덱스트린 또는 하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린); 충전제; 당류; 이당류; 및 다른 탄수화물(예컨대, 글루코스, 만노스 또는 텍스트린); 단백질(예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제, 향료 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체(예컨대, 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩타이드; 염 형성 반대이온(예컨대, 나트륨); 보존제(예컨대, 염화벤즈알코늄, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페닐 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소); 용매(예컨대, 글라이세린, 프로필렌 글라이콜 또는 폴리에틸렌 글라이콜); 당 알코올(예컨대, 만니톨 또는 소르비톨); 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제(예컨대, 플루로닉스, PEG, 소르비탄 에스터, 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 킬록사팔); 안정성 향상제(예컨대, 수크로스 또는 소르비톨); 등장성 향상제(예컨대, 알칼리 금속 할라이드, 바람직하게는 염화나트륨, 염화칼륨, 만니톨 소르비톨); 전달 비히클; 희석제; 부형제 및/또는 약제학적 아췌번트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company]을 참조한다.

[0163] 소정의 실시형태에서, 최적의 약제학적 조성물은 예를 들어 의도된 투여 경로, 전달 포맷 및 원하는 투약량에 따라 당해 분야의 당업자에 의해 결정될 것이다. 예를 들어, 상기 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE S]을 참조한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 조성물은 본 발명의 항원 결합 단백질의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 청소 속도에 영향을 미칠 수 있다. 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물 중의 1차 비히클 또는 담체는 성질상 수성 또는 비수성일 수 있다. 예를 들어, 적합한 비히클 또는 담체는 가능하게는 비경구 투여를 위해 조성물에 혼한 다른 물질이 보충된 주사용수, 생리학적 식염수 용액 또는 인공 뇌척수액일 수 있다. 천연 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수는 추가의 예시적인 비히클이다. 구체적인 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 트리스 완충제 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세테이트 완충제를 포함하고, 소르비톨 또는 이에 적합한 치환물을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 조성물은 원하는 정도의 순도를 갖는 선택된 조성물을 동결건조 케이크 또는 수용액의 형태의 임의의 제형 물질(상기 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 문헌)과 혼합함으로써 저장에 준비될 수 있다. 추가로, 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 생성물은 적절한 부형제, 예컨대 수크로스를 사용하여 동결건조물로서 제형화될 수 있다.

[0164] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 전달에 선택될 수 있다. 대안적으로, 상기 조성물은 흡입에 또는 소화관을 통한 전달에, 예컨대 경구로의 전달에 선택될 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용되는 조성물의 제법은 당해 분야의 당업자 내에 있다. 제형 성분은 바람직하게는 투여 부위에 허용되는 농도로 존재한다. 소정의 실시형태에서, 완충제는 생리학적 pH에서 또는 약간 더 낮은 pH에서, 통상적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에 조성물을

유지시키도록 사용된다.

- [0165] 비경구 투여가 고려될 때, 본 발명에서 사용하기 위한 치료학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 비히클 중에 원하는 IL-2 뮤테인 조성물을 포함하는 발열원 비함유, 비경구로 허용되는 수용액의 형태로 제공될 수 있다. 비경구 주사에 특히 적합한 비히클은 무균 증류수이고, 여기서 IL-2 뮤테인 조성물은 적절히 보존된 무균 등장성 용액으로서 제형화된다. 소정의 실시형태에서, 제제는 데푹 주사를 통해 전달될 수 있는 생성물의 제어 또는 지속 방출을 제공할 수 있는, 주사용 마이크로구, 생체침식성(bio-erodible) 입자, 중합체 화합물(예컨대, 폴리락트산 또는 폴리글라이콜산), 비드 또는 리포솜과 같은 물질과의 원하는 분자의 제형을 수반할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 순환 시 지속 기간을 촉진하는 효과를 갖는 히알루론산을 또한 사용할 수 있다. 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 조성물을 도입하기 위해 이식형 약물 전달 장치를 사용할 수 있다.
- [0166] 지속 또는 제어 전달 제형 중의 IL-2 뮤테인 조성물을 포함하는 제형을 포함하는 추가의 약제학적 조성물이 당해 분야의 당업자에게 명확할 것이다. 다양한 다른 지속 또는 제어 전달 수단, 예컨대 리포솜 담체, 생체침식성 마이크로입자, 또는 다공성 비드 및 데푹 주사를 제형화하기 위한 기술은 당해 분야의 당업자에게 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 약제학적 조성물의 전달을 위한 다공성 중합체 마이크로입자의 제어 방출을 기술한 국제 특허 출원 제PCT/US93/00829호(참조문헌 포함됨)를 참조한다. 지속 방출 제제는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 지속 방출 매트릭스는 폴리에스터, 하이드로겔, 폴리락타이드(미국 특허 제3,773,919호 및 유럽 특허 출원 공보 EP 058481(이들 각각 참조문헌으로 포함됨)에 개시됨), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), 폴리 (2-하이드록시에틸-메타크릴레이트)(Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 및 Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), 에틸렌 비닐 아세테이트(상기 랑거(Langer) 등의 문헌(1981)) 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시뷰티르산(유럽 특허 출원 공보 EP 133,988)을 포함할 수 있다. 지속 방출 조성물은 당해 분야에 공지된 임의의 몇몇 방법에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692]; 유럽 특허 출원 공보 EP 036,676; EP 088,046 및 EP 143,949(참조문헌으로 포함됨)를 참조한다.
- [0167] 생체내 투여에 사용된 약제학적 조성물은 통상적으로 무균 제제로서 제공된다. 무균화는 무균 여과 막을 통한 여과에 의해 성취될 수 있다. 조성물이 동결건조될 때, 이 방법을 이용한 무균화는 동결건조 및 재구성 전에 또는 후에 수행될 수 있다. 비경구 투여를 위한 조성물은 동결건조 형태 또는 용액 중에 저장될 수 있다. 비경구 조성물은 일반적으로 무균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어 정맥 용액 백 또는 피하 주사침에 의해 관통 가능한 스톱퍼를 갖는 바이알에 위치한다.
- [0168] 본 발명의 양상은 국제 특허 출원 WO 06138181A2(PCT/US2006/022599)(본 명세서에서 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)에 기재된 바대로 약제학적 조성물로서 사용될 수 있는 자가 완충 IL-2 뮤테인 제형을 포함한다.
- [0169] 상기 기재된 바대로, 소정의 실시형태는, IL-2 뮤테인 조성물 이외에, 하나 이상의 부형제, 예컨대 이 부문 및 본 명세서의 어딘가에 예시적으로 기재된 것을 포함하는 IL-2 뮤테인 조성물, 특히 약제학적 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 제공한다. 부형제는 매우 다양한 목적에, 예컨대 제형의 물리적, 화학적 또는 생물학적 특성의 조정, 예컨대 점도의 조정, 및/또는 유효성을 개선하거나/하고 이러한 제형을 안정화시키기 위한 본 발명의 공정, 및 예를 들어 제조, 선적, 저장, 사용 전 준비, 투여 동안에 및 이후 생기는 스트레스로 인한 분해 및 부패에 대한 공정에 대해 이와 관련하여 본 발명에서 사용될 수 있다.
- [0170] 특히 부분적으로 부형제 및 본 발명에 따른 자가 완충 단백질 제형에 대한 이것의 공정, 특히 단백질 약제학적 생성물 및 수의학 및/또는 인간 의학 용도를 위한 공정에 관한 다양한 설명, 예컨대 Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002) 내에 Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" 및 Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002) (이들 각각 본 명세서에서 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)이 단백질 안정화 및 제형 재료 및 이와 관련하여 유용한 방법에서 이용 가능하다.
- [0171] 예를 들어, 제형의 이온 농도 및/또는 등장성을 조정하고/하거나 단백질 또는 본 발명에 따른 조성물의 다른 성분의 용해도 및/또는 물리적 안정성을 개선하기 위해 본 발명의 소정의 실시형태에 따라 염을 사용할 수 있다.
- [0172] 널리 공지된 바대로, 이온은 단백질의 표면 상의 하전 잔기에 결합함으로써 및 단백질 내의 하전 기 및 극성 기

를 차폐하고 이의 정전 상호작용, 인력 및 반발 상호작용의 강도를 감소시킴으로써 단백질의 네이티브 상태를 안정화시킬 수 있다. 이온은 특히 단백질의 변성 펩타이드 계통(-CONH)에 결합함으로써 단백질의 변성 상태를 또한 안정화시킬 수 있다. 더욱이, 단백질 내의 하전 기 및 극성 기와의 이온 상호작용은 분자 간 정전 상호작용을 감소시키고 이에 의해 단백질 응집 및 불용성을 또한 감소시키거나 방지할 수 있다.

[0173] 이온 중은 단백질에 대한 이의 효과가 상당히 다르다. 본 발명에 따라 약제학적 조성물을 제형화하는 데 사용될 수 있는 이온의 다수의 분류별 순위 및 단백질에 대해 이의 효과가 개발되었다. 일 예는 호프마이스터(Hofmeister) 시리즈이고, 이것은 용액 중의 단백질의 배좌 안정성에 대한 이의 효과에 의해 이온 및 극성 비이온 용질을 순위 매긴다. 안정화 용질은 "코스모트로픽(kosmotropic)이라 불린다". 탈안정화 용질은 "카오트로픽(chaotropic)"이라 불린다. 코스모트로프는 흔히 용액으로부터 단백질을 침전("염석")시키기 위해 높은 농도(예를 들어, >1몰 황산암모늄)로 사용된다. 카오트로프는 흔히 단백질을 변성하고/하거나 안정화("염용")시키기 위해 사용된다. "염용" 및 "염석"에 대한 이온의 상대 유용성은 호프마이스터 시리즈에서 이의 위치를 규정한다.

[0174] 유리 아미노산은 벌크화제, 안정화제 및 항산화제, 및 다른 표준 용도로서 본 발명의 다양한 실시형태에 따라 IL-2 뮤테인 제형에서 사용될 수 있다. 라이신, 프롤린, 세린 및 알라닌은 제형 중에 단백질을 안정화시키기 위해 사용될 수 있다. 글라이신은 정확한 케이크 구조 및 특성을 보장하도록 동결건조에서 유용하다. 아르기닌은 액체 및 동결건조 제형 둘 다에서 단백질 응집을 저해하는 데 유용할 수 있다. 메티오닌이 항산화제로서 유용하다.

[0175] 폴리올은 당, 예를 들어 만니톨, 수크로스 및 소르비톨, 및 다가 알코올, 예를 들어 글라이세롤 및 프로필렌 글라이콜 등, 및 본 명세서의 논의의 목적을 위해, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 및 유연 물질을 포함한다. 폴리올은 코스모트로픽이다. 이들은 물리적 및 화학적 분해 과정으로부터 단백질을 보호하기 위해 액체 및 동결건조 제형 둘 다에서 유용한 안정화제이다. 폴리올은 또한 제형의 등장성을 조정하는 데 유용하다.

[0176] 본 발명의 실시형태를 선택하는 데 있어서 유용한 폴리올 중에서 동결건조 제형 중의 케이크의 구조적 안정성을 보장하기 위해 흔히 사용되는 만니톨이 있다. 이것은 케이크에 구조적 안정성을 보장한다. 이것은 일반적으로 동결보호제, 예를 들어 수크로스와 사용된다. 등장성을 조정하기 위한 바람직한 물질 중에서, 제조 공정 동안 벌크의 제제의 수송 동안의 동결-해동 스트레스에 대해 보호하기 위한 안정화제로서, 소르비톨 및 수크로스가 있다. 환원 당(유리 알데하이드 또는 케톤기를 함유), 예컨대 글루코스 및 락토스는 표면 라이신 및 아르기닌 잔기를 당화반응시킬 수 있다. 따라서, 이들은 일반적으로 본 발명에 따라 사용하기 위한 바람직한 폴리올 중에 있지 않다. 또한, 산성 조건 하에 프럭토스 및 글루코스로 가수분해되고, 결과적으로 당화반응을 발생시키는 이러한 반응성 종을 형성하는 당, 예컨대 수크로스는 또한 이와 관련하여 본 발명의 바람직한 폴리올 중에 있지 않다. PEG는 단백질을 안정화시키기 위해 저온보호물질로서 유용하고, 이와 관련하여 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0177] IL-2 뮤테인 제형의 실시형태는 계면활성제를 추가로 포함한다. 단백질 분자는 표면 상의 흡착 및 변성 및 공기-액체, 고체-액체 및 액체-액체 계면에서의 결과적인 응집이 쉽게 될 수 있다. 이러한 효과는 일반적으로 단백질 농도와 역비례로 변경된다. 이 해로운 상호작용은 일반적으로 단백질 농도와 역비례로 변경되고, 통상적으로 생성물의 선적 및 취급 동안 생성된 것과 같은 물리적 교반에 의해 악화된다.

[0178] 계면활성제는 일상적으로 표면 흡수를 방지하거나 최소화하거나 감소시키기 위해 사용된다. 이와 관련하여 본 발명에서 유용한 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 소르비탄 폴리옥사이드의 다른 지방산 에스터, 및 폴록사머 188을 포함한다.

[0179] 계면활성제는 또한 단백질 배좌 안정성을 제어하기 위해 흔히 사용된다. 이의 관련하여 계면활성제의 사용은 단백질 특이적인데, 왜냐하면 임의의 소정의 계면활성제가 통상적으로 일부 단백질을 안정화시키고 다른 단백질을 탈안정화시킬 것이기 때문이다.

[0180] 폴리소르베이트는 산화 분해되기 쉽고, 대개 공급된 바대로 충분한 분량의 퍼옥사이드를 함유하여 단백질 잔기 측쇄, 특히 메티오닌의 산화를 발생시킨다. 결과적으로, 폴리소르베이트는 조심스럽게 사용되어야 하고, 사용될 때, 이의 최저 유효 농도로 사용되어야 한다. 이와 관련하여, 폴리소르베이트는 부형제가 이의 최저 유효 농도에서 사용되어야 한다는 일반 규칙의 예가 된다.

[0181] IL-2 뮤테인 제형의 실시형태는 하나 이상의 항산화제를 추가로 포함한다. 적절한 수준의 주변 산소 및 온도를 유지시키고 광에 대한 노출을 피함으로써 약제학적 제형에서 단백질의 해로운 산화가 어느 정도로 방지될 수 있다. 또한 단백질의 산화 분해를 방지하기 위해 항산화제 부형제가 사용될 수 있다. 이와 관련하여 유용한 항산

화제 중에 환원제, 산소/유리 라디칼 소거제 및 킬레이트화제가 있다. 본 발명에 따라 치료학적 단백질 제형에서 사용하기 위한 항산화제는 바람직하게는 수용성이고 생성물의 반감기에 걸쳐 이의 활성을 유지한다. EDTA는 이와 관련하여 본 발명에 따라 바람직한 항산화제이다.

[0182] 항산화제는 단백질을 손상시킬 수 있다. 예를 들어, 환원제, 예컨대 글루타티온은 특히 분자 간 다이설파이드 계통을 파괴할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용하기 위한 항산화제는 무엇보다도 제형 중의 단백질을 손상시키는 이것의 가능성을 제거하거나 충분히 감소시키도록 선택된다.

[0183] 본 발명에 따른 제형은 단백질 보조인자이고 단백질 배위 착물을 형성하기 위해 필요한, 소정의 인슐린 현탁액을 형성하는 데 필요한 아연과 같은 금속 이온을 포함할 수 있다. 금속 이온은 또한 단백질을 분해하는 일부 과정을 저해할 수 있다. 그러나, 금속 이온은 또한 단백질을 분해하는 물리 및 화학 공정을 촉매화한다.

[0184] 마그네슘 이온(10 내지 120mM)은 아이소아스파르트산으로의 아스파르트산의 이합체화를 저해하도록 사용될 수 있다. Ca^{+2} 이온(100mM 이하)은 인간 테옥시리보뉴클레아제의 안정성을 증가시킬 수 있다. 그러나, Mg^{+2} , Mn^{+2} 및 Zn^{+2} 는 rhdNase를 탈안정화시킬 수 있다. 유사하게, Ca^{+2} 및 Sr^{+2} 는 VIII 인자를 안정화시킬 수 있고, 이것은 Mg^{+2} , Mn^{+2} 및 Zn^{+2} , Cu^{+2} 및 Fe^{+2} 에 의해 탈안정화될 수 있고, 이의 응집은 Al^{+3} 이온에 의해 증가할 수 있다.

[0185] IL-2 뮤테인 제형의 실시형태는 하나 이상의 보존제를 추가로 포함한다. 보존제는 동일한 용기로부터 하나 초과를 추출을 수반하는 다회 투여 비경구 제형을 개발할 때 필요하다. 이의 1차 기능은 미생물 성장을 저해하고 약물 제품의 사용의 반감기 또는 기한에 걸쳐 생성물 무균성을 보장하는 것이다. 흔히 사용되는 보존제는 벤질 알코올, 페놀 및 m-크레졸을 포함한다. 보존제가 소분자 비경구에 의한 사용의 긴 역사를 갖지만, 보존제를 포함하는 단백질 제형의 개발은 도전일 수 있다. 보존제는 거의 항상 단백질에 대해 탈안정화 효과(응집)를 갖고, 이것은 다회 투여 단백질 제형에서의 이의 사용을 제한하는 데 있어서 주요 인자가 된다. 현재까지, 대부분의 단백질 약물은 오직 단일 사용을 위해 제형화된다. 그러나, 다회 투여 제형이 가능할 때, 이것은 환자 편의 가능성 및 시장성 증가의 부가 이점을 갖는다. 우수한 예는 인간 성장 호르몬(hGH)이고, 여기서 보존된 제형의 개발은 더 편리한 다회 사용 주사 펜 보존제를 상업화시켰다. hGH의 보존된 제형을 함유하는 적어도 4개의 이러한 펜 장치가 현재 시장에서 구입 가능하다. 노르티트로핀(Norditropin)(액체, 노보 노디스크(Novo Nordisk)), 누트로핀(Nutropin) AQ(액체, 제네테크(Genentech)) 및 게노트로핀(Genotropin)(동결건조-이중 챔버 카트리지, 파마시아 앤드 업존(Pharmacia & Upjohn))은 페놀을 함유하는 반면, 소마트로프(Somatropo)(엘리 릴리(Eli Lilly))는 m-크레졸과 제형화된다.

[0186] 일 실시형태에서, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인의 Fc-융합체, 예를 들어 Fc.IL-2(V91K) 또는 Fc.IL-2(N88D) 등은 10mM L-글루탐산, 3.0%(w/v) L-프롤린(pH 5.2) 중에 10mg/ml로 제형화된다. 다른 실시형태에서, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인의 Fc-융합체, 예를 들어 Fc.IL-2(V91K) 또는 Fc.IL-2(N88D) 등은 10mM KPi, 161mM L-아르기닌(pH 7.6) 중에 제형화된다.

[0187] 몇몇 양상은 보존된 투약량 형태의 제형화 및 개발 동안 고려될 필요가 있다. 약물 제품 중의 효과적인 보존제 농도가 최적화되어야 한다. 이는 단백질 안정성을 손상시키지 않으면서 항미생물 유효성을 부여하는 농도 범위의 투약량 형태에서 소정의 보존제를 시험하는 것을 요한다.

[0188] 또 다른 양상에서, 본 발명은 동결건조 제형의 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인의 Fc-융합체를 제공한다. 동결 건조 생성물은 보존제 없이 동결건조되고 사용 시 희석제를 함유하는 보존제에 의해 재구성될 수 있다. 이는 보존제가 단백질과 접촉하는 시간을 단축시켜, 관련 안정성 위험을 상당히 최소화한다. 액체 제형에 의해, 보존제 유효성 및 안정성은 전체 생성물 반감기(약 18 내지 24개월) 동안 유지되어야 한다. 주의한 중요한 점은 보존제 유효성이 활성 약물 및 모든 부형제 성분을 함유하는 최종 제형 중에 나타내야 한다는 점이다.

[0189] IL-2 뮤테인 제형은 일반적으로 무엇보다도, 생체이용률 및 지속성의 범위로, 특정한 질환의 특정한 치료에 대해 특정한 투여 투약량 및 투여 빈도를 위해, 특정한 투여 방식 및 방법에 대해 설계될 것이다. 제형은 따라서 경구, 귀, 눈, 직장 및 질내, 및 정맥내 및 동맥내 주사, 근육내 주사 및 피하 주사를 포함하는 비경구 경로(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의한 전달을 위해 본 발명에 따라 설계될 수 있다.

[0190] 약제학적 조성물이 제형화되면, 이것은 용액, 현탁액, 젤, 에멀션, 고체, 결정, 또는 탈수 또는 동결건조 분말로서 무균 바이알 중에 저장될 수 있다. 이러한 제형은 사용 준비(ready-to-use) 형태 또는 투여 전에 재구성되는 형태(예를 들어, 동결건조)로 저장될 수 있다. 본 발명은 또한 단일-용량 투여 단위를 제조하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 각각 건조된 단백질을 갖는 제1 용기 및 수성 제형을 갖는 제2 용기 둘 다를 함유

할 수 있다. 본 발명의 소정의 실시형태에서, 단일 및 다중 챔버 프리필드 주사기(예를 들어, 액체 주사기 및 용해 실린저(lyosyringe))를 함유하는 키트가 제공된다.

[0191] 사용되는 치료학적 유효량의 IL-2 뮤테인 함유 약제학적 조성물은 예를 들어 치료학적 상황 및 목적에 따라 달라질 것이다. 당해 분야의 당업자는 치료에 대한 적절한 투약량 수준이 부분적으로 전달된 분자, IL-2 뮤테인이 사용되는 적응증, 투여 경로 및 환자의 몸집(체중, 표면적 또는 장기 크기) 및/또는 컨디션(연령 및 일반적인 건강)에 따라 변할 것이라는 것을 알 것이다. 소정의 실시형태에서, 임상적 투약량을 적정하고 최적의 치료학적 효과를 얻기 위해 투여 경로를 변경할 수 있다. 통상적인 투약량은 상기 언급된 인자에 따라 약 0.1 μ g/kg 내지 약 1mg/kg 이하 또는 이것 초과 범위일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 투약량은 0.5 μ g/kg 내지 약 100 μ g/kg 이하, 임의로 2.5 μ g/kg 내지 약 50 μ g/kg 이하의 범위일 수 있다.

[0192] 치료학적 유효량의 IL-2 뮤테인은 바람직하게는 질환 증상의 중증도의 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 또는 지속기간의 증가, 또는 질환 고통으로 인한 손상 또는 불능의 예방을 발생시킨다.

[0193] 약제학적 조성물은 의학 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 약제학적 조성물을 투여하기 위한 의학 장치의 예는 미국 특허 제4,475,196호; 제4,439,196호; 제4,447,224호; 제4,447,233호; 제4,486,194호; 제4,487,603호; 제4,596,556호; 제4,790,824호; 제4,941,880호; 제5,064,413호; 제5,312,335호; 제5,312,335호; 제5,383,851호; 및 제5,399,163호(모두 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0194] 자가면역 또는 염증성 장애를 치료하는 방법

[0195] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 IL-2 뮤테인은 자가면역 또는 염증성 장애를 치료하기 위해 사용된다. 바람직한 실시형태에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 사용한다.

[0196] 본 명세서에 개시된 IL-2 뮤테인에 의한 치료에 특히 수정 가능한 장애는 염증, 자가면역 질환, 아토피 질환, 방종양성 자가면역 질환, 연골 염증, 관절염, 류마티스성 관절염, 연소성 관절염, 연소성 류마티스성 관절염, 소수관절 연소성 류마티스성 관절염, 다관절 연소성 류마티스성 관절염, 전신 발병 연소성 류마티스성 관절염, 연소성 강직성 척추염, 연소성 장병성 관절염, 연소성 반응성 관절염, 연소성 레이터 증후군, SEA 증후군(혈청 반응음성, 골근부착부질환, 관절증 증후군), 연소성 피부근염, 연소성 건선 관절염, 연소성 피부경화증, 연소성 전신 홍반 루푸스, 연소성 혈관염, 소수관절염 류마티스성 관절염, 다관절 류마티스성 관절염, 전신 발병 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 장병성 관절염, 반응성 관절염, 레이터 증후군, SEA 증후군(혈청반응음성, 골근 부착부질환, 관절증 증후군), 피부근염, 건선 관절염, 피부경화증, 혈관염, 근염, 다발성 근염, 피부근염, 결절성 다발성 동맥염, 베게너 육아종증, 동맥염, 류마티스성 다발성 근육통(polyomyalgia rheumatica), 유육종증, 경화증, 일차성 담즙성 경화증, 경화성 담관염, 쇼그렌 증후군, 건선, 반상형 건선, 물방울 건선, 역형건선, 농포성 건선, 홍피성 건선, 피부염, 아토피 피부염, 죽상동맥경화증, 루푸스, 스틸병, 전신 홍반 루푸스(SLE), 중증 근무력증, 염증성 장 질환(IBD), 크론씨병, 궤양성 대장염, 셀리악병, 다발 경화증(MS), 천식, COPD, 비부비동염, 폴립을 동반한 비부비동염, 호산구성 식도염, 호산구성 기관지염, 갈랑-바레 질환, I형 진성 당뇨병, 갑상선염(예를 들어, 그레이브병), 애디슨병, 레이노 현상, 자가면역 간염, GVHD, 장기이식 거부, 신장 손상, C형 간염 유발 혈관염, 자연 유산 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0197] 바람직한 실시형태에서, 자가면역 또는 염증성 장애는 루푸스, 이식편 대 숙주 질환, C형 간염 유발 혈관염, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 자연 유산, 아토피 질환 및 염증성 장 질환이다.

[0198] 다른 실시형태에서, 자가면역 또는 염증성 장애를 갖거나 이를 발생시킬 위험에 있는 환자는 IL-2 뮤테인(예를 들어, 임의로 본 명세서에 기재된 유형의 Fc-융합 분자의 일부로서, 본 명세서에 개시된 IL-2 뮤테인, 예컨대 본 명세서에 개시된 IL-2 뮤테인 Fc-융합체, 또는 당해 분야에 공지된 또 다른 IL-2 뮤테인 또는 야생형 IL-2)에 의해 치료되고, 치료에 대한 환자의 반응은 모니터링된다. 모니터링되는 환자의 반응은 치료에 대한 환자의 임의의 검출 가능한 또는 측정 가능한 반응, 또는 이러한 반응의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들어, 반응은 체온 또는 열, 본능, 발한, 두통, 오심, 피로, 배고픔, 목마름, 예민한 정신 등과 같은 환자의 생리학적 상태의 변화일 수 있다. 대안적으로, 반응은 예를 들어 환자로부터 취한 말초 혈액의 샘플에서의 세포 유형 또는 유전자 생성물(예를 들어, 단백질, 펩타이드 또는 핵산)의 양의 변화일 수 있다. 일 실시형태에서, 환자의 치료 섭생은 환자가 치료에 대한 검출 가능한 또는 측정 가능한 반응을 갖는 경우 또는 이러한 반응이 특정한 역치를 거스르는 경우 변경된다. 변경은 투약 빈도의 감소 또는 증가, 또는 용량당 투여되는 IL-2 뮤테인의 양의 감소 또는 증가, 또는 투약으로부터의 "휴약"(즉, 특정 시간 기간 동안, 또는 치료 의사가 치료가 계속되어야 한다고 결정할 때까지, 또는 환자의 모니터링된 반응이 치료가 재개되거나 재개될 수 있다는 것을 나타낼 때까지의 일

시적인 치료 중지) 또는 치료의 종료일 수 있다. 일 실시형태에서, 반응은 환자의 온도 또는 CRP 수준의 변화이다. 예를 들어, 반응은 환자의 체온의 증가, 또는 말초 혈액의 샘플에서의 CRP 수준의 증가, 또는 둘 다일 수 있다. 특정한 일 실시형태에서, 환자의 체온이 적어도 0.1°C, 0.2°C, 0.3°C, 0.4°C, 0.5°C, 0.7°C, 1°C, 1.5°C, 2°C 또는 2.5°C로 치료 기간 동안 증가하는 경우 환자의 치료는 감소하거나 중지되거나 종료된다. 또 다른 특정한 실시형태에서, 환자의 말초 혈액의 샘플에서의 CRP의 농도가 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1, 1.5 또는 2mg/mL로 치료 기간 동안 증가하는 경우 환자의 치료는 감소하거나 중지되거나 종료된다. 모니터링되고 치료를 변경하거나 감소하거나 중지하거나 종료할지를 결정하는 데 사용될 수 있는 다른 환자 반응은 모세관 누출 증후군의 발전 또는 악화(저혈압 및 심혈관 불안정), 호중구 기능 손상(예를 들어, 감염의 발생 또는 악화를 야기하거나 이것이 검출됨), 혈소판감소증, 혈전성 맥관병증, 주사 부위 반응, 혈관염(예컨대, C형 간염 바이러스 혈관염), 또는 염증성 증상 또는 질환을 포함한다. 모니터링되고 치료를 변경하거나 감소하거나 증가시키거나 중지하거나 종료할지를 결정하는 데 사용될 수 있는 추가의 환자 반응은 NK 세포, Treg 세포, FOXP3⁻ CD4 T 세포, FOXP3⁺ CD4 T 세포, FOXP3⁻ CD8 T 세포 또는 호산구의 수의 증가를 포함한다. 이 세포 유형의 증가는 예를 들어 말초 혈액의 단위당 이러한 세포의 수의 증가(예를 들어, 혈액 1밀리리터당 세포의 증가로 표시됨)로서 또는 혈액 샘플에서의 또 다른 유형의 세포 또는 세포들과 비교하여 이러한 세포 유형의 백분율의 증가로서 검출될 수 있다. 모니터링될 수 있는 또 다른 환자 반응은 환자의 말초 혈액의 샘플에서의 CD25⁺ 세포 상의 세포 표면 결합 IL-2 뮤테인의 양의 증가이다.

[0199] **Treg 세포를 증식시키는 방법**

[0200] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 대상체 또는 샘플 내의 Treg 세포를 증식시키기 위해 사용될 수 있다. 비조절 T 세포에 대한 Treg의 비율을 증가시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 상기 방법은 T 세포의 집단을 유효량의 인간 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합과 접촉시키는 단계를 포함한다. T 세포의 집단 내의 CD3+FoxP3⁻ 세포에 대한 CD3+FoxP3⁺ 세포의 비율을 결정함으로써 비율을 측정할 수 있다. 인간 혈액에서의 통상적인 Treg 빈도는 전체 CD4+CD3⁺ T 세포의 5-10%이지만, 기재된 질환에서 상기 이 백분율은 더 낮거나 더 높을 수 있다. 바람직한 실시형태에서, Treg의 백분율은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 적어도 600%, 적어도 700%, 적어도 800%, 적어도 900%, 또는 적어도 1000% 증가한다. Treg의 최대 배수 증가는 특정한 질환에 대해 변할 수 있지만; IL-2 뮤테인 치료를 통해 얻을 수 있는 최대 Treg 빈도는 전체 CD4+CD3⁺ T 세포의 50% 또는 60%이다. 소정의 실시형태에서, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 대상체에 투여되고, 대상체의 말초 혈액 내의 비조절 T 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율은 증가한다.

[0201] IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 다른 세포 유형에 비해 Treg를 우선적으로 증식시키므로, 이들은 또한 대상체의 말초 혈액 내의 자연 살해(NK) 세포에 대한 조절 T 세포(Treg)의 비율을 증가시키기 위해 유용하다. CD19⁻ 및 CD3⁻인 CD16⁺ 및/또는 CD56⁺ 림프구에 대한 CD3+FOXP3⁺ 세포의 비율을 결정함으로써 비율을 측정할 수 있다.

[0202] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 환자의 말초 혈액 내의 비조절 T 세포 또는 NK 세포에 대한 Treg의 비율을 상당히 확대시키지 않으면서 환자 내의 질환 또는 장애에 치료학적 효과를 가질 수 있는 것으로 고려된다. 치료학적 효과는 자가면역 또는 염증의 부위에서의 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 Fc-융합 단백질의 국소 활성화로 인할 수 있다.

[0203] **실시예**

[0204] 실제적 및 예언적 둘 다의 하기 실시예는 본 발명의 구체적인 실시형태 또는 특징을 예시하기 위한 목적을 위해 제공되고, 이의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0205] **실시예 1 - CD25에 대해 고친화도를 부여하는 돌연변이의 수의 감소**

[0206] CD25에 대한 친화도가 증가하고 IL-2Rβ γ를 통한 신호전달 강도가 감소한 IL-2 뮤테인은 Treg 성장 및 기능을 우선적으로 촉진한다. 가능한 면역원성을 감소시키기 위해, CD25에 대해 고친화도를 성취하기 위해 필요한 돌연변이의 최소 수가 추구되었다. V69A 및 Q74P를 나타내는 이의 3개의 수용체(PDB 코드 - 2B5I)와 복합체인 IL-2의 결정 구조는 CD25와 상호작용하는 나선 구조에 위치한다. 이것은 높은 CD25 결합 친화도에 대해 2개의 독립적인 IL-2 돌연변이유발 스크린에서 V69A 및 Q74P가 왜 빈번히 단리되는지를 설명할 수 있다(Rao et al. 2005;

Thanos et al. 2006). 이 실시예는, 라오(Rao) 등의 스크린에서 확인된 IL-2 뮤테인 "2-4"에서의 어떠한 다른 돌연변이가 V69A 및 Q74P 단독에 의해 관찰된 친화도를 초과하여 친화도를 증가시키는 데 가장 중요한지를 조사한다. 활성화 T 세포의 표면 상에 CD25를 결합시키기 위한 유세포 분석법에 의해 하기 단백질을 스크리닝하였다. 모든 작제물은 또한 정제 및 검출을 위해 C 말단 FLAG 및 폴리-His 태그를 포함하였다. 특이적 돌연변이는 괄호에 제공된다.

HaMut1D (V69A,Q74P,N88D,C125A) (서열 번호 8)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut2D (N30S,V69A,Q74P,N88D,C125A) (서열 번호 9)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut3D (K35R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (서열 번호 10)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut4D (T37A,V69A,Q74P,N88D,C125A) (서열 번호 11)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLARMITFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut5D (K48E,V69A,Q74P,N88D,C125A) (서열 번호 12)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut6D (E68D,V69A,Q74P,N88D,C125A) (서열 번호 13)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEDALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut7D (N71R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (서열 번호 14)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut8D (K35R,K48E,E68D,N88D,C125A) (서열 번호 15)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEDVLNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut 7D는 오리지널 단리물 "2-4"(약 200pM)와 거의 동일한 친화도로 CD25와 결합하고, 이는 돌연변이 N71R이 V69A, Q74P 단독(HaMut 1D, 약 2nM)에 의해 관찰된 친화도를 초과하여 친화도를 크게 증가시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 다른 작제물은, 친화도가 WT IL-2보다 오직 약간 더 높은 HaMut 8D를 제외하고, HaMut 1D와 유사하거나 이보다 약간 고친화도를 보유한다.

실시예 2 - 개선된 반감기를 위한 IgG1-Fc 도메인에 융합된 IL-2 뮤테인

IL-2 뮤테인에 의한 Treg 풍부화(enrichment)를 성취하기 위해 필요한 투약 빈도를 감소시키기 위해, IL-2와 IgG1-Fc 도메인 사이의 다양한 융합을 평가하였다. Fc 도메인은 IgG1에 의해 매개된 이펙터 기능, 예컨대 표적 세포 용해를 무효화하기 위해 점 돌연변이를 함유하였다. 이용된 Fc 이펙터 기능 돌연변이는 A327Q, Ala Ala(L234A+L235A) 또는 N297G이었다. Treg 선택적 IL-2 뮤테인이 IL-2 효력의 부분 감소를 가지므로, IL-2R 신호전달에 상당히 영향을 미치지 않는 방식으로 Fc에 IL-2를 융합시키는 것이 중요하다. 따라서, Fc 융합의 존재 및 부재 하의 IL-2R 활성화에 대해 IL-2 뮤테인을 시험하였다.

Fc 융합에 의한 IL-2 이합체화가 IL-2R에 대한 증가한 친화성(avidity)으로 인해 IL-2R 신호전달 강도를 증가시키는지를 결정하기 위해, 더 약한 IL-2 뮤테인 (haD5)(US20110274650)은, GGGGS(서열 번호 5) 링커 서열에 의해 분리된, Fc의 아미노 말단에 융합된다. 이 뮤테인은 IL-2R 신호전달에 영향을 미치는 3개의 돌연변이(E15Q, H16N, N88D), CD25에 대해 고친화도를 부여하는 8개의 돌연변이(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P)(Rao et al. 2005) 및 시스테인 미스페어링(mispairing) 및 응집을 방지하는 C125S를 보유한다. Fc에 대한 융합은 이러한 방식으로 haD5의 생물학적 활성을 완전히 폐지하는 반면, 세포 표면 CD25에 대한 이의 고친화

도 결합은 아마도 이합체화로부터의 친화성 증가로 인해 증대된다.

- [0219] IL-2 뮤테인이 또한 Fc 이중이합체의 N 또는 C 말단에 융합되어서, Fc 이합체의 오직 1개의 사슬이 IL-2 도메인을 뚫는다. 2개의 비대칭 Fc 사슬 사이의 이중이합체 페어링은 1개의 Fc 사슬에서 도입된 라이신과 다른 Fc 사슬에서 도입된 아스파르트산 사이의 정전 상호작용에 의해 촉진된다. IL-2 뮤테인 haD6은 하나의 구성이 바람직한 경우에 하나의 Fc 사슬 또는 다른 사슬의 N 말단에 융합되어, haD6.FcDD 및 haD6.FcKK라 칭하는 2개의 단백질 작제물을 생성시킨다. 뮤테인 haMut7D는 또한 1개 또는 2개의 GGGGS(서열 번호 5) 링커를 갖는 Fc 이중이합체의 C 말단에 융합된다(FcKK(G4S)haMut7D, FcKK(G4S)2haMut7D). Fc 이중이합체의 N 말단에 대한 IL-2 뮤테인 haD6의 융합은 pSTAT5 및 T 세포 증식 실험 둘 다에서 유리 haD6에 비해 부분적인 활성 손실을 발생시킨다. 반대로, 1개 또는 2개의 GGGGS(서열 번호 5) 링커를 갖는 Fc 이중이합체의 C 말단에 대한 haMut7D의 융합은 haMut7D의 효력을 변경하지 않는다.
- [0220] Fc 동중이합체의 C 말단에 대한 IL-2 뮤테인의 융합을 또한 조사하였다. 전체 PBMC는 T75 조직 배양 플라스크 내에서 100ng/mL 항-CD3(OKT3)에 의해 100mL당 30,000만개의 세포로 활성화되었다. 배양 3일에, 세포를 3회 세척하고 3일 동안 새로운 배지에 두었다. 이후, 세포를 50μL의 최종 용적에서 1pM 내지 10nM의 10x 용량 적정 범위에서 IL-2 변이체로 자극하였다. BD 포스플로우(phosflow) 완충제 키트를 사용하여 STAT5 인산화의 수준을 측정하였다. 간단히 말하면, 1mL의 BD 용해/고정 포스플로우 완충제를 첨가하여 자극을 중지시켰다. 세포를 37°C에서 20분 동안 고정하고 얼음에서 1x BD 포스플로우 펄(perme) 완충제로 투과시킨 후 CD4, CD25, FOXP3 및 pSTAT5에 대해 염색하였다.
- [0221] 도 1에서 볼 수 있는 것처럼, 뮤테인 haMut1D 및 haMut7D의 바이오활성은 Fc 동중이합체의 C 말단에 대한 융합에 의해 변경되지 않았다. 따라서, IL-2의 N 말단과 Fc의 C 말단 사이의 융합은 Fc-IL-2 동중이합체의 상황에서도 IL-2 뮤테인의 효현체 활성을 손상시키지 않는다. 이 작제물에서, 제조 개선을 위해 C125S 대신에 C125A 돌연변이를 사용하였다.
- [0222] **실시예 3 - 우선적 Treg 성장을 성취하기 위한 IL-2 뮤테인 효력의 조율**
- [0223] IL-2 뮤테인의 초기 패널은 단독으로 또는 IL-2R 신호전달에 영향을 미치는 1개 또는 2개의 추가의 돌연변이와 함께 N88D를 함유하였다. N88D 시리즈보다 유사한 또는 약간 더 강력한 효현작용(agonism)을 갖는 뮤테인을 확인하는 목표로, 뮤테인의 제2 패널을 설계하였다(모두 단일 점 돌연변이를 가짐). 예측된 IL-2Rβ-상호작용 아미노산(결정 구조, PDB 코드 - 2B5I)에 기초하여 24개의 신호전달 돌연변이의 패널을 확인하였다. 뮤테인과 IL-2Rβ 사이의 결합 자유 에너지의 예측된 감소에 기초하여 특정한 치환을 선택하였다. EGAD 컴퓨터 알고리즘(캘리포니아 대학교(미국 샌 디에고), 한델(Handel) 실험실)을 이용하여 결합 자유 에너지를 계산하였다. 돌연변이체의 결합 자유 에너지는 $\Delta \Delta G_{\text{돌연변이체}} = \mu (\Delta G_{\text{돌연변이체}} - \Delta G_{\text{야생형}})$ 으로 정의된다. 여기서, $\mu (=0.1$, 일반적으로)는 실험 에너지와 비교할 때 1의 기울기를 갖도록 예측된 결합 친화도의 변화를 정규화하기 위해 사용된 스케일링 인자이다(Pokala and Handel 2005). 분해의 자유 에너지(ΔG)는 복합체 상태($\Delta G_{\text{결합}}$)와 유리 상태($\Delta G_{\text{유리}}$) 사이의 에너지 차이로서 정의된다. 분해 에너지(ΔG_{mut})는 각각의 치환에 대해 계산되었다.
- [0224] 하기 치환(H16E, H16Q, L19K, D20R, D20K, D20H, D20Y, M23H, D84K, D84H, S87Y, N88D, N88K, N88I, N88H, N88Y, V91N, V91K, V91H, V91R, I92H, E95K, E95R 또는 E95I)을 갖는 IL-2 뮤테인의 패널은 Fc 이중이합체에 대한 C 말단 융합으로 표시된다. 이 작제물은 또한 높은 CD25 결합 친화도를 위한 haMut7 돌연변이(V69A, N71R, Q74P) 및 효과적인 폴딩을 위한 C125A를 함유하였다.
- [0225] 실시예 2의 T 세포 STAT5 인산화 검정에서 패널을 효력에 대해 스크리닝하고, H16E, D84K, V91N, V91K 및 V91R은 야생형 IL-2보다 적고 N88D보다 큰 활성을 보유하는 것으로 발견되었다(도 2).
- [0226] H16E, D84K, V91N, V91K 및 V91R은 야생형 IL-2보다 적고 N88D보다 큰 활성을 보유한다.
- [0227] T 세포 및 NK 성장 검정에서 선택된 뮤테인을 또한 시험하였다.
- [0228] T 세포 검정을 위해, 전체 PBMC를 100ng의 OKT3에 의해 300만개/mL로 활성화하였다. 2일에, 세포를 3회 세척하고 5일 동안 새로운 배지에 두었다. 이후 세포를 CFSE로 표지하고 24웰 플레이트 내에서 FACS 분석 전에 7일 동안 IL-2 함유 배지에서 0.5백만개/웰로 추가로 배양하였다. T 세포 하위세트의 증식은 도 3에 CFSE 희석으로 제시되어 있다(중앙 CFSE 형광).
- [0229] NK 세포 검정을 위해, 96웰 플레이트 내에서 10만개/웰로 3일 동안 IL-2 함유 배지에서 MACS 분류된 CD16+ NK

세포를 배양하였다. $0.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -타이미딘을 항온처리의 최종 18시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 결과가 도 4에 도시되어 있다.

[0230] 돌연변이체 H16E, D84K, V91N, V91K, 및 V91R 돌연변이체는 WT IL-2와 유사하게 Treg 성장을 자극할 수 있지만, 다른 T 세포에서 대략 10배 덜 강력하고(도 3), NK 세포에서 대략 100배 덜 강력하였다(도 4).

[0231] Fc 이중이합체와 뮤테인 haMut7(V69A, N71R, Q74P, C125A) 사이의 거리가 일련의 개별적인 아미노산 절두에 의해 감소한 Fc.IL-2 융합 단백질의 별개의 패널을 설계하였다.

Fc.haMut7 Fc...TQKSLSLSPGKGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 22)

Trunc1 Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 23)

Trunc2 Fc...TQKSLSLS-STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 24)

Trunc3 Fc...TQKSLSLS--TKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 25)

Trunc4 Fc...TQKSLSLS---KKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 26)

Trunc5 Fc...TQKSLSLS----KTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 27)

Trunc6 Fc...TQKSLSLS-----TQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 28)

Trunc7 Fc...TQKSLSLS-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 29)

Trunc8 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (서열 번호 30)

[0232]

[0233] Trunc1-Trunc4는 도 2, 도 3 및 도 4에 기재된 바대로 STAT5 인산화 및 T 세포 및 NK 세포 증식에 의해 측정된 바대로 전장 모 작제물 Fc.haMut7과 동일한 효력을 보유하였다. Trunc5 및 Trunc6은 N88D 돌연변이(haD 및 haMut7D)에 의해 자극된 것보다 더 약한 반응이자만 더 강하게 자극되었고, V91K에 의해 자극된 것과 매우 유사하였다. Trunc7은 N88D 뮤테인보다 더 약하고, Trunc8은 매우 적은 활성을 가졌다. 그러나, NK 세포에서 시험될 때, Trunc5 및 Trunc6은 V91K보다 더 강한 효현제이어서, Treg 선택도가 근위 Fc 도메인에 의한 입체 장애보다 신호전달 돌연변이에 의해 더 용이하게 성취된다는 것을 나타낸다.

[0234] 실시예 4 - Fc 동종이합체의 상황에서의 높은 CD25 친화도 돌연변이

[0235] 높은 CD25 결합 친화도를 부여한 돌연변이는 CD25-높은 T 세포에 대해 향성(tropism)을 증가시키고, 장기간 CD25::IL-2뮤테인 회합 및 연장된 신호전달을 촉진하므로 유리하게 생각된다. 그러나, 돌연변이 수의 감소는 면역원성 가능성을 감소시킬 수 있다. haMut1 고친화도 돌연변이 V69A 및 Q74P의 존재 및 부재 하의 N88D 또는 V91K 뮤테인은 Fc 동종이합체의 C 말단에 대한 융합으로 표시되고 생물활성에 대해 비교되었다. pSTAT5 자극 검정에서, 동종이합체화는 단량체 뮤테인에 비해 신호 강도에 영향을 미치지 않았다. 고친화도 돌연변이 V69A 및 Q74P의 회귀는 또한 pSTAT5 신호전달에 영향을 미치지 않았다. T 세포 성장 검정에서, 고친화도 돌연변이는 종래의 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포에서는 활성을 감소시키지만 조절 T 세포에서는 활성을 감소시키지 않았다(도 5). 고친화도 돌연변이는 또한 NK 세포에서 증식성 반응을 변경시키지 않았다(도 6).

[0236] 고친화도 돌연변이가 생체내 T 세포 반응에 영향을 미치는지를 결정하기 위해, 인간화 마우스(인간 CD34+ 조혈 줄기 세포와 재구성된 NOD.SCID.II2rg-Null 마우스(NOD.SCID.II2rg-null mouse))에 Fc.IL-2 뮤테인 융합 단백질을 투약하고 Treg 증식을 모니터링하였다. 7주령 NOD.SCID.II2rg-Null(NSG) 마우스(잭슨 랩스(Jackson Labs)(메인 바 하버))에 조사하고(180 rad), 94,000개의 인간 태아 간 CD34⁺ 조혈 줄기 세포와 재구성하였다. 21주에, 마우스를 키메라현상(%) (PBL의 유세포 분석법에 의해 결정)의 동일 분포에 기초하여 6개의 그룹으로 분포시키고 0일 및 7일에 표시된 Fc.뮤테인 융합 단백질 또는 PBS의 1 μg 의 피하 주사를 주었다. 11일에, 혈액에서의 T 세포 하위세트 빈도를 유세포 분석법에 의해 결정하였다. 동물당 1 μg 의 저용량으로, 고친화도 돌연변이는 N88D 또는 V91K 돌연변이 단독에 의해 관찰된 것을 초과하여 Treg 증식을 개선하지 않았다(도 7).

[0237] Treg 증식은 FOXP3⁺D4⁺ T 세포가 인간 B 및 T 세포, 및 마우스 골수 세포의 혼합물을 포함하는 전체 말초 혈액 백혈구(PBL)에 비해 풍부화를 증가시키지 않는다는 점에서 선택적이다. 더욱이, 더 높은 용량에서, 고친화도 돌연변이는 CD25⁺FOXP3⁺ T 세포의 증가를 촉진하여, Treg 선택도를 감소시켰다. 따라서, Fc 동종이합체의

상황에서, 고친화도 돌연변이는 우선적 Treg 성장을 촉진하는 데 필요한 것으로 생각되지 않았다.

Fc.WT IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(C125A) (서열 번호 16)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINIVLELK
GSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIISTLT

[0238]

Fc.haMut1V91K IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V69A, Q74P, V91K, C125A) (서열 번호 17)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLISINIVLELK
GSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIISTLT

[0239]

Fc.V91K (또는 Fc.IL-2(V91K)) IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V91K, C125A) (서열 번호 18)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINIVLELK
GSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIISTLT

[0240]

Fc.haMut1N88D IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V69A, Q74P, N88D, C125A) (서열 번호 19)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLISINIVLELK
GSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIISTLT

[0241]

Fc.N88D (또는 Fc.IL-2(N88D)) IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(N88D, C125A) (서열 번호 20)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINIVLELK
GSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIISTLT

[0242]

[0243]

실시예 5 - Fc.IL-2 뮤테인의 연장된 세포 표면 CD25 회합

[0244]

인간화 마우스 연구로부터의 예상치 못한 결과는, 이의 감소한 신호전달 역량에도 불구하고, 뮤테인이 Fc.WT IL-2에 비해 더 튼튼한 Treg 풍부화를 유도한다는 것이다. Fc.WT에 의해 관찰된 것에 비해 더 높은 Treg 풍부화 및 FOXP3 상향조절이 1 μ g/마우스의 용량(도 7) 및 더 낮은 0.5 μ g/마우스의 용량(도 8)에서 관찰되었다. 이 효력 증가는 생체내 T 세포에 의한 소비 감소로부터 생길 수 있어서, 연장된 신호전달에 더 많은 Fc.IL-2 뮤테인이 이용 가능하게 한다.

[0245]

그러나, 실험실내 및 생체내 PK 연구는 활성화된 T 세포 배양물로부터의 상청액 또는 투약된 마우스로부터의 혈청에서 Fc.WT에 비해 Fc.V91K 또는 Fc.N88D의 지속성을 상당히 증가시킨다는 것을 입증하지 못했다. Fc 융합체가 2종의 IL-2 뮤테인 도메인을 품으므로, 엔도솜 재순환 증가는 CD25에 대한 결합성 증가로 인해 연장된 세포 표면 회합을 발생시킬 수 있다. 실제로, Fc.V91K 및 Fc.N88D가 Fc.WT보다 더 효과적으로 융합 단백질의 짧은 노출 후 이전에 활성화된 T 세포의 표면 상에 지속하는 것으로 발견되었다(도 9a 및 도 9b).

[0246] 1차 PBMC를 2일 동안 100ng/ml의 OKT3에 의해 예비자극하였다. 세포를 수확하고 4회 세척하고 배지에 밤새 두었다. 이후, 세포를 37℃에서 30분 동안 400pM의 Fc.IL-2에 의해 펄스화하였다. 펄스화 후, 세포를 1회 세척 후 T0에 대해 수확하거나, 12ml의 따뜻한 배지 중에 추가로 3회 세척하고 4시간 동안 배양하였다. 세포 회합 Fc.IL-2를 검출하기 위해, 세포를 항-인간 IgG-FITC(색은 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)(펜실베이니아 웨스트 그로브)) 및 항-CD25-APC(도 9a)에 의해 염색하였다.

[0247] Fc.WT에 비해 Fc.V91K 및 Fc.N88D에 의한 IL-2R 신호전달의 지속성을 동일한 시점에서 포스포-STAT5의 세포내 면역검출에 의해 관찰하였다. FOXP3+CD4+ T 세포에 대한 포스포-STAT5 MFI가 도시되어 있다(도 9b).

[0248] **실시예 6 - 융합 서열 최적화**

[0249] 마우스에서의 전임상 연구에서, 온전한 분자의 혈청 농도가 오직 인간 Fc 부분의 것과 비교될 때 Fc.IL-2 뮤테인은 차등 노출을 나타내어, 순환하는 인간 Fc 분해대사산물을 나타낸다. Fc.IL-2 뮤테인의 생체내 안정성 및 약동학을 최적화하기 위해, 융합 서열 변형은 세망내피계를 통한 재순환 동안 전순 순환에서 Fc.IL-2 뮤테인의 단백질 제거 분해에 대한 이의 영향을 특징으로 한다. 실험실내 및 생체내 단백질 제거 분해에 대해 하기 작제물을 평가하였다.

[0250]

(Ala_Ala)_G4S	...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQ...	ha7N88D (서열 번호 31)
(N297G_delK)_G4S	...TQKSLSLSPG GGGGSAPTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K (서열 번호 32)
(N297G_KtoA)_AAPT	...TQKSLSLSPGA_____APTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K (서열 번호 33)
(N297G_KtoA)_AAPA	...TQKSLSLSPGA_____APASSSTKKTQLQ...	ha1V91K (서열 번호 34)

[0251] 온전한 Fc.IL-2 뮤테인의 농도에 대한 전체 인간 Fc의 시간에 따른 농도를 비교하는 정량적 면역검정에 의해 안정성을 측정하였다. Fc.IL-2 뮤테인의 단백질 제거를 항-IL-2 및 항-인간 Fc 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 검증한 후, 분해대사산물을 면역표화하고 질량 분광법으로 규명하였다. 실험실내 및 생체내 샘플로부터의 (Ala_Ala)_G4S의 분해대사산물의 질량 분광법에 의한 규명은 단백질 제거 개월 부위로서 Fc 도메인의 C 말단 Lys를 확인하였다. Fc 도메인((N297G_delK)_G4S 및 (N297G_KtoA)_AAPT)의 C 말단 라이신의 결실 또는 돌연변이는 C 말단 라이신을 갖는 Fc 작제물((Ala_Ala)_G4S)과 비교하여 37℃에서 마우스 혈청에서 연장된 실험실내 안정성을 발생시켰다. 이 연장된 실험실내 혈청 안정성은, 시간에 따른 Fc.IL-2 뮤테인 혈청 농도 곡선 아래의 면적(AUC)에 의해 측정된 바대로, 마우스의 더 큰 노출로 변환되었다. C 말단 Fc 라이신이 결여된 Fc.IL-2 뮤테인의 이 연장된 안정성은 사이노몰거스 원숭이 및 인간으로부터의 혈청에서 실험실내 또한 관찰되었다. Ala에 대한 IL-2의 Thr-3의 돌연변이((N297G_KtoA)_AAPA)는 마우스 혈청에서 및 재조합 인간 카텝신 D 및 L과의 별개의 항온처리에서 ((N297G_KtoA)_AAPT와 비교하여) 37℃에서 실험실내 안정성을 감소시켰다. 이 감소한 실험실내 혈청 안정성은 (N297G_KtoA)_AAPT와 비교하여 (N297G_KtoA)_AAPA에 대해 생체내 마우스에서 더 낮은 노출(AUC)로 변환되었다. 질량 분광법에 의한 실험실내 및 생체내 샘플로부터의 (N297G_KtoA)_AAPA의 분해대사산물의 규명은, (N297G_KtoA)_AAPT의 동등한 샘플에 대해 관찰되지 않은, 단백질 제거가 되기 쉬운 잔기로서 IL-2 뮤테인 도메인의 Lys 8 및 Lys 9를 확인하였다. (N297G_KtoA)_AAPT의 안정성에 대한 (N297G_KtoA)_AAPA의 37℃에서의 안정성 감소는 사이노몰거스 원숭이 및 인간으로부터의 혈청에서 실험실내 또한 관찰되었다.

[0252] 이 구역에서의 글라이코실화의 중요성 때문에, 융합 단백질의 제조능력을 가능하게 개선하기 위해, 하기한 바대로 0 연결 글라이코실화보다 N 연결을 촉진하도록 융합 서열을 변경하였다.

오리지널

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K,C125A) TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQ (서열 번호 32)

변경된

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A) TQKSLSLSPGKGGGGSAPN~~SS~~STKKTQLQ (서열 번호 35)

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,S5T,V91K,C125A) TQKSLSLSPGKGGGGSAPN~~ST~~STKKTQLQ (서열 번호 36)

IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGNGTAP~~SS~~STKKTQLQ n (서열 번호 37)

IgG1Fc(N297G_delK)::YGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGYGNGTAP~~SS~~STKKTQLQ (서열 번호 38)

[0253]

[0254] **실시예 7 - 사이노몰거스 원숭이 PK/PD 결정**

[0255] 표준 IL-2 면역 자극 치료는 바람직하지 않은 부작용을 피하기 위해 투약 사이클 사이에 약물 비함유 휴약(노출

무)을 요한다. 반대로, Treg 증식 또는 자극 치료는 Treg 자극에 충분한 지속된 트로프 약물 수준(혈청 $C_{최소}$)으로 그러나 면역 활성화를 발생시키는 약물 수준보다 낮은 최대 노출(혈청 $C_{최대}$)로 연장된 노출을 요할 수 있다. 이 실시예는, 전염증성 면역 활성화에 필요한 것으로 생각되는 약물 수준보다 낮은 최대 노출(혈청 $C_{최대}$)을 유지하면서, 연장된 표적 커버리지(혈청 $C_{최소}$)에 대한 사이노몰거스 원숭이에서의 반감기 연장된 뮤테인의 투약 전략을 나타낸다.

[0256] 사이노몰거스 원숭이에 4개의 그룹(A-D)에서 Fc.V91K(IgG1Fc(N297G_deIK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A)를 투약하였고, 3개의 그룹(A-C)은 피하로 투약되고 1개의 그룹(D)은 정맥내로 투약되었다. 각각의 그룹의 경우, 4개의 생물학적으로 순수한(naive) 수컷 사이노몰거스 원숭이에 하기 기재된 투약 전략에 따라 투약하였다. 반감기 연장된 뮤테인의 피하 투약은 더 높은 림프계 흡수를 허용하여 더 낮은 최대 노출(혈청 $C_{최대}$) 및/또는 더 튼튼한 약동학적 반응(Treg 증식)을 발생시켰다. A 그룹에 대한 투약 전략은 사이클 1 동안 0일, 2일 및 4일에 투약된 킬로그램당 3개의 연속 10 마이크로그램 및 14일에 킬로그램당 10 마이크로그램으로 이루어져서, 더 낮은 최대 노출($C_{최대}$)을 유지시키면서 킬로그램당 50 마이크로그램의 더 높은 초기 용량과 유사한 연장된 표적 커버리지를 허용하였다. B 그룹에 대한 투약 전략은 A 그룹과 비교를 위해 0일 및 14일에 투약된 킬로그램당 50 마이크로그램이다. C 그룹에 대한 투약 전략은 0일 및 28일에 투약된 킬로그램당 50 마이크로그램이다. Treg 풍부화를 지속시키는 데 트로프 커버리지가 필요한지 또는 투약 사이클 사이의 약물 비함유 휴약이 유리한지의 결정을 허용한다. 정맥내 투약 암 D 그룹에 대한 투약 전략은 0일에 투약된 킬로그램당 50 마이크로그램이어서, 피하 투약의 것과 최대 노출($C_{최대}$) 및 Treg 풍부화 차이의 비교를 허용한다.

[0257] 약동학(온전한 분자 및 전체 인간 Fc에 대한 정량적 면역검정), 항약물 항체, 보관된(shed) 가용성 CD25 및 혈청 사이토카인(IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-4 및 IL-13)을 기재된 각각의 용량 그룹에 대해 하기 시점에서 측정하였다:

[0258] A 그룹: 투약전(제1 사이클; 1 용량), 48(투약전 제1 사이클; 2 용량), 96(투약전 제1 사이클; 3 용량), 100, 104, 120, 168, 216, 264, 336(투약전 제2 사이클), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 및 1008시간.

[0259] B 그룹: 투약전(제1 사이클), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336(투약전 제2 사이클), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 및 1008시간.

[0260] C 그룹: 투약전(제1 사이클), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 672(투약전 제2 사이클), 676, 680, 696, 744, 792, 840, 912, 1008, 1080 및 1176시간.

[0261] D 그룹: 투약전(제1 사이클), 0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504 및 672시간.

[0262] 약력학(말초 혈액 Treg, 비조절 CD4 및 CD8 T 세포, 및 NK 세포의 면역표현형 분석 및 열거(enumeration))을 기재된 각각의 용량 그룹에 대해 하기 시점에서 측정하였다:

[0263] A 그룹: 투약전(제1 사이클; 1 용량), 96(투약전 제1 사이클; 3 용량), 168, 336(투약전 제2 사이클), 456 및 576시간.

[0264] B 그룹: 투약전(제1 사이클), 120, 240, 336(투약전 제2 사이클), 456 및 576시간.

[0265] C 그룹: 투약전(제1 사이클), 120, 240, 672(투약전 제2 사이클), 792 및 912시간.

[0266] D 그룹: 투약전(제1 사이클), 120 및 240시간.

[0267] 투약전 및 용량 그룹마다 초기 용량 후 24시간에 모든 동물 및 용량 그룹에 대해 혈액학 및 임상 화학을 평가하였다. 하기 매개변수를 평가한다.

[0268] 혈액학:

[0269] • 백혈구 수(전체 및 절대 차이)

[0270] • 적혈구 수

[0271] • 헤모글로빈

- [0272] · 헤마토크리트
- [0273] · 평균 미립자 헤모글로빈, 평균 미립자 용적, 평균 미립자 헤모글로빈 농도(계산됨)
- [0274] · 절대 망상적혈구
- [0275] · 혈소판 수
- [0276] · 혈액 세포 형태
- [0277] · 적혈구 분포 폭
- [0278] · 평균 혈소판 용적

[0279] 임상 화학:

- [0280] · 알칼리 포스파타제
- [0281] · 전체 빌리루빈(전체 빌리루빈이 1mg/dl를 초과하는 경우 직접 빌리루빈을 가짐)
- [0282] · 아스파르테이트 아미노전환효소
- [0283] · 알라닌 아미노전환효소
- [0284] · 감마 글루타밀 전환효소
- [0285] · 우레아 질소
- [0286] · 크레아티닌
- [0287] · 전체 단백질
- [0288] · 알부민
- [0289] · 글로불린 및 A/G(알부민/글로불린) 비율(계산됨)
- [0290] · 글루코스
- [0291] · 전체 콜레스테롤
- [0292] · 트라이글라이세라이드
- [0293] · 전해질(나트륨, 칼륨, 염소)
- [0294] · 칼슘
- [0295] · 인

[0296] **실시예 8 - 비글라이코실화 IgG1 Fc**

[0297] 천연 발생 IgG 항체는 중쇄의 불변 도메인 2(CH2)에서 글라이코실화 부위를 보유한다. 예를 들어, 인간 IgG1 항체는 Asn297 위치(EU 넘버링)에 위치한 글라이코실화 부위를 갖는다. 현재까지, 비글라이코실화 항체를 제조하기 위한 전략은 물리화학적 특성의 면에서 Asn을 닮은 아미노산(예를 들어, Gln) 또는 극성기가 없는 Asn 측쇄를 모방하는 Ala 잔기에 의한 Asn 잔기의 대체를 수반한다. 이 실시예는 글라이신에 의한 Asn의 대체(N297G)의 이점을 입증한다. N297G Fc는 더 우수한 생물물리학 특성 및 제조능력 속성(예를 들어, 정제 동안 회수)을 갖는 비글라이코실화 분자이다.

[0298] Fc 단편 및 IgG 항체의 복수의 공지된 결정 구조의 검사는 특히 글라이코실화된 Asn297번 위치에서 글라이코실화 루프 분절 주위의 상당한 배좌 유연성을 나타냈다. 많은 공지된 결정 구조에서, Asn297은 양의 골격 2면각 각도를 채택하였다. Gly는 측쇄 원자의 결여로 인해 양의 골격 2면각 각도를 채택하는 높은 경향을 갖는다. 따라서, 이 배좌 및 구조 이유에 기초하여, Gly는 N297Q 또는 N297A보다 Asn에 대해 더 우수한 대체일 수 있다.

[0299] Gly에 의한 Asn297의 돌연변이는 정제 공정에서 훨씬 개선된 회수(또는 효율) 및 생물물리학 특성을 갖는 비글라이코실화 분자를 생성시킨다. 예를 들어, 단백질 A 풀(pool)로부터의 회수 백분율(최종 수율)은 N297Q에 대한 45.6% 및 N297A에 대한 39.6%와 비교하여 N297G 돌연변이에 대해 82.6%이었다. SPHP 칼럼 분석은 N297Q 및 N297A 돌연변이체에 대한 더 낮은 회수 백분율이 꼬리의 피크로 인한 것이라고 나타내고, 이는 높은 분자량 응

집 및/또는 미스폴딩된 종을 나타낸다. 이 결과는 더 큰 2ℓ 스케일 실행에서 재확인되었다.

[0300] 바이오약제 산업에서, 분자가 대규모 제조 및 정제에 수정 가능하지 않다는 위험을 완화하기 위한 다수의 속성에 대해 대규모 제조에 대한 잠재적 필요성, 예를 들어 약물로서 사용될 가능성을 갖는 분자를 평가하였다. 제조능력 평가에서, N297G는 pH 변화에 대한 튼튼함을 나타낸다. N297G는 응집 문제를 갖지 않는 반면; N297Q 및 N297A는 각각 20% 및 10%의 응집 증가를 가졌다. N297G가 더 우수한 제조능력 속성을 갖지만, 이것은 이것이 시험되는 모든 작용성 검정에서 N297Q 및 N297A와 유사하였다. 예를 들어, ADCC 검정에서, N297G는 N297Q 및 N297A와 유사하게 세포독성이 결여되었다.

[0301] 실시예 9 - 안정화된 비글라이코실화 IgG1 Fc

[0302] 이 실시예는 조작된 이황화 결합(들)을 도입함으로써 IgG 항체 스캐폴드의 안정성을 개선하는 방법을 기술한다. 천연 발생 IgG 항체는 안정한 분자이다. 그러나, 몇몇 치료학적 분야의 경우, 돌연변이를 제조하거나 비글라이코실화 분자를 생성하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, ADCC 회피의 필요 및 Fc감마 수용체에 대한 결합이 존재하는 치료학적 적응증에서 비글라이코실화 IgG 분자를 사용할 수 있다. 그러나, 비글라이코실화 IgG1은 글라이코실화 IgG1보다 훨씬 더 높은 용점(CH2 도메인 용점은 약 10℃만큼 감소함; 70℃ 내지 60℃)을 갖는다. 관찰된 더 낮은 용점은 비글라이코실화 IgG1의 다양한 생물물리학 특성에 부정적으로 영향을 미친다. 예를 들어, 비글라이코실화 IgG1은 글라이코실화 IgG1과 비교하여 낮은 pH에서 증가한 응집 수준을 갖는다.

[0303] 이황화 결합을 조작하기 위해, C-알파 원자 사이의 거리 계산을 수반하는 구조 기반 방법을 처음에 이용하여 Cys에 대한 돌연변이에 대해 Fc 구역에서 54개의 잔기 쌍을 확인하였다. 이 54개의 부위는 4개의 잔기 쌍(V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C 및 V323C-I332C)으로 추가로 좁혀졌다. 이용된 기준은 (i) CH2 도메인 내의 위치, (ii) 루프, 턴(turn) 및 탄수화물로부터 멀 것, (iii) Fc감마 수용체 및 FcRn 상호작용 부위로부터 멀 것, (iv) 용매 접근성(바람직한 매립 위치) 등을 포함한다.

[0304] 비글라이코실화 N297G Fc의 상황에서 쌍 지는 시스테인 치환을 생성하였다. 비환원 펩타이드 맵핑 분석은 그 상황에서 예상되고 설계된 바대로 4개 중 3개의 조작된 부위가 이황화 결합을 형성한다는 것을 나타낸다. V259C-L306C 돌연변이는 이황화 결합을 정확히 형성하지 않고 CH2 도메인에 이미 존재하는 네이티브 이황화와 미스페어링을 발생시켰다. 다른 3개의 설계, R292C-V302C, A287C-L306C 및 V323C-I332C는 예상되고 설계된 바대로 정확히 이황화 결합을 형성하였다. N297G 돌연변이에 대한 이황화 결합의 부가는 N297G 돌연변이 단독에 비해 열안정성에서의 약 15℃ 개선을 발생시켰다. R292C-V302C, A287C-L306C 및 V323C-I332C 이황화 변이체 중에서, R292C-V302C 및 A287C-L306C는 래트에게 투여될 때 우수한 약동학(각각 11일 및 9일의 $t_{1/2}$)을 가졌다. 이는 5일의 $t_{1/2}$ 를 갖는 이전에 공개된 CH2 도메인 이황화 결합(Gong et al., J. Biol. Chem. 2009 284: 14203-14210)에 대해 래트에서 관찰된 약동학 프로파일과 반대이었다.

[0305] CH2 도메인에서의 이황화 결합의 조작은 글라이코실화 IgG1 분자와 동등하게 비글라이코실화 분자의 안정성을 개선한다(시차 주사 열량측정법에 의해 결정된 용점의 10℃ 내지 15℃ 개선). 본 명세서에 기재된 조작된 부위는 이황화 혼합화를 발생시키지 않고, 이황화는 집단의 대략 100%에서 예상된 바대로 형성되었다. 더 중요하게는, CH2 도메인에서의 공개된 이황화 결합 부위와 달리, 본 명세서에 기재된 이황화 결합은 래트 PK에 영향을 미치지 않는다.

[0306] 실시예 10

[0307] 사이노물거스 원숭이 및 인간으로부터의 T 및 NK 세포에서의 반응에 대한 V91K 및 N88D 돌연변이의 효과를 실험실내 비교하였다. CD25(전혈 pSTAT5 반응에서 $CD4^+CD25^+$ 게이팅된 T 세포)의 존재에서, 사이노물거스 IL-2R 신호전달에 대한 V91K 돌연변이의 효과는 인간 IL-2R에서의 이의 활성 감소와 비교하여 무시할만 하였다. 그러나, CD25(전혈 pSTAT5 반응 및 NK 세포 증식에서 $CD25^-$ 게이팅된 T 세포 둘 다)의 부재에서, V91K 돌연변이는 더 실질적으로 사이노물거스 IL-2R 신호전달을 감소시켰다. 반대로, Fc.N88D는 사이노물거스 전혈에서의 $CD25^+$ T 세포에서의 신호전달 감소를 나타내고, 이것은 인간 전혈에서의 T 세포에서 Fc.V91K의 신호전달 효과와 더 유사하였다. 표 2에 요약된 실험실내 데이터는 사이노물거스 원숭이에서의 더 약한 효현제, Fc.N88D에 의해 관찰된 치료학적 차이 인간 대상체에서의 Fc.V91K의 효과를 예측할 것이라는 것을 제시한다.

표 2

인간 및 사이노물거스 원숭이 세포의 실험실내 반응에 대한 V91K 또는 N88D 돌연변이의 효과의 요약

	전혈 pSTAT5		NK 세포 증식
	CD25+ T 세포	CD25- T 세포	
사이노물거스 원숭이에서의 V91K	Ø	↓	↓
인간에서의 V91K	↓	↓↓	↓↓
사이노물거스 원숭이에서의 N88D	↓	↓↓	↓↓
인간에서의 N88D	↓↓	↓↓	↓↓↓

[0308]

[0309] 실시예 - 11

[0310] 사이노물거스 원숭이에서 2개의 생체내 연구를 수행하였다. 완전 또는 부분 약동학(PK) 및 약력학(PD) 트로프가 제2 용량에 대한 반응의 양을 변경시키는지(도 10a 및 10b) 결정하기 위해 Fc.V91K의 2주 및 4주 투약 간격과 비교하도록 제1 사이노물거스 원숭이 연구를 설계하였다. 강한 Treg 반응을 제공하는 것으로 예상된 제1 용량(50µg/kg) 및 치료학적 창 의 하한을 조사하기 위한 제2 용량(10µg/kg)을 이용하였다. 10µg/kg가 너무 낮은 것으로 공지되어 있지 않으므로, 반응의 가능성을 증가시키기 위해 1일, 3일 및 5일에 용량을 주었다. 이 투약 섭생은 단일 50µg/kg 피하(SC) 용량으로, 그러나 더 낮은 C_{최대}에 의해 성취되는 것과 5일 후 동일한 노출을 주었다. 혈액 구획에 대해 림프에서 더 높은 약물 노출에 따른 PD의 잠재적 차이를 조사하도록 50µg/kg 정맥내(IV) 그룹이 또한 포함되었다. 이 연구의 결과는 각각의 용량 수준이 부작용(AE), 또는 Teff 또는 NK 성장 없이 강한 Treg 성장 반응을 유도하고, 14일 또는 28일에서의 제2 용량에 대한 반응이 동등하다는 것을 확립하였다.

표 3

제 1 사이노물거스 원숭이 연구에 대한 연구 설계

그룹	동물 수	투약 (일)	용량 Fc.V91K
1	4	1, 3, 5, 15	10 µg/kg SC
2	4	1, 15	50 µg/kg SC
3	4	1, 29	50 µg/kg SC
4	4	1	50 µg/kg IV

[0311]

[0312] 1, 3, 100, 200µg/kg(SC)의 Fc.V91K 용량을 갖는 치료학적 창 의 마진을 조사하고 이를 3, 10, 100, 200µg/kg(SC)의 용량에서의 더 약한 효현제 Fc.N88D 및 3, 10, 30, 100µg/kg(SC QDx5)에서의 프로류킨(등록상표)과 비교하기 위해 제2 사이노물거스 원숭이 연구를 설계하였다. 공개된 인간 및 비인간 영장류 연구(Hartemann et al., 2013, Lancet Diabetes Endocrin 1:295-305; Saadoun et al., 2011, NEJM 365:2067-77; Aoyama et al., 2012, Am J Transplantation 12:2532-37)에 기초하여 프로류킨(등록상표) 용량을 선택하고, HCV 혈관염 및 1형 당뇨병(T1D)에서의 저용량 IL-2 임상 실험을 모방하도록 QDx5 투여하였다.

표 4

제 2 사이노물거스 원숭이 연구에 대한 연구 설계

그룹	동물 수	시험 물품	제 1 사이클 치료 치료 일: 용량 (SC)	제 2 사이클 치료 치료 일: 용량 (SC)
1	4	프로류킨®	1-5 일: 3 µg/kg	14-18 일: 30 µg/kg
2	4	프로류킨®	1-5 일: 10 µg/kg	14-18 일: 100 µg/kg
3	4	Fc.V91K	1 일: 1 µg/kg	14 일: 100 µg/kg
4	4	Fc.V91K	1 일: 3 µg/kg	14 일: 200 µg/kg
5	4	Fc.N88D	1 일: 3 µg/kg	14 일: 100 µg/kg
6	4	Fc.N88D	1 일: 10 µg/kg	14 일: 200 µg/kg

[0313]

[0314]

도 11a 내지 도 11f에서, 세포 반응, 체온 및 혈청 CRP의 동역학이 도시되어 있다. x축에서의 시간표는 제1 용량의 일자로서 1일보다는 0일로 시작한다.

[0315]

조합에서, 2개의 사이노물거스 원숭이 연구는 IL-2 뮤테인이 프로류킨(등록상표)에 의해 성취된 것보다 더 넓은 치료학적 창을 갖는 더 큰 Treg 풍부화를 유도한다는 것을 입증한다(도 12a 및 도 12b). 프로류킨(등록상표)에 의해, Treg 풍부화는 NK 및 호산구 성장과 필적하였다. 임의의 특정한 이론에 구속됨이 없이, 호산구 성장은 IL-2 치료에 대한 널리 공지된 반응이고, 아마도 CD25⁺ 선천적 림프 세포로부터의 IL-2 유도된 IL-5의 결과이다. CD4 및 CD8 Teff 성장은 Treg를 CD4 T 세포의 25-35%로 증가시키는 용량에서 발생하였다. 반대로, Fc.V91K 및 Fc.N88D는 NK 세포 및 호산구에 비해 더 높은 선택도로 Treg 성장을 유도하고, Teff 성장을 촉진하는 용량은 Treg를 CD4 T 세포의 >40%로 풍부화하는 용량보다 높다.

[0316]

문헌에 보고된 저용량 IL-2 임상 실험에서, 발생한 제1 AE는 독감 유사 증상 및 열이었다. 따라서, 치료학적 창과 비교하는 것 이외에, 이 연구의 목표는 열에 앞선 바이오마커를 발견하는 것이다. 도 12c에 도시된 바대로, 2개의 더 높은 용량의 프로류킨(등록상표)에 의해, CRP 수준은 체온에 필적하는 것으로 발견되었다. Fc.V91K에 의해, 보통의 체온 상승이 가장 높은 용량에서 검출되었고, 다음의 더 낮은 용량에서 적은 CRP 증가가 관찰되었다. 따라서, 본 발명의 분자에 의한 치료에 대한 대상체의 반응을 모니터링하고/하거나 환자에서의 용량 상승의 상한을 한정하기 위해 CRP를 이용할 수 있다.

[0317]

Fc.V91K 또는 Fc.N88D 치료된 동물에서 덜 뚜렷하거나 존재하지 않는 소정의 독성이 또한 프로류킨(등록상표) 치료된 동물에서 관찰되었다(도 12d). 혈소판, 호중구 및 알부민의 수준은 모두 프로류킨(등록상표)에 의한 치료에 의해 감소하는 것으로 발견되지만, 유사한 또는 더 높은 Treg 풍부화를 유발하는 Fc.V91K 또는 Fc.N88D의 용량은 이 매개변수의 약간의 감소를 생성하거나 생성하지 않았다. 종합하면, 이 데이터는 Fc.V91K- 또는 Fc.N88D에 의한 환자의 치료에 대한 치료학적 창이 프로류킨(등록상표)에 의한 것보다 상당히 큰 것으로 예상된다는 것을 나타낸다.

[0318]

실시예 - 12

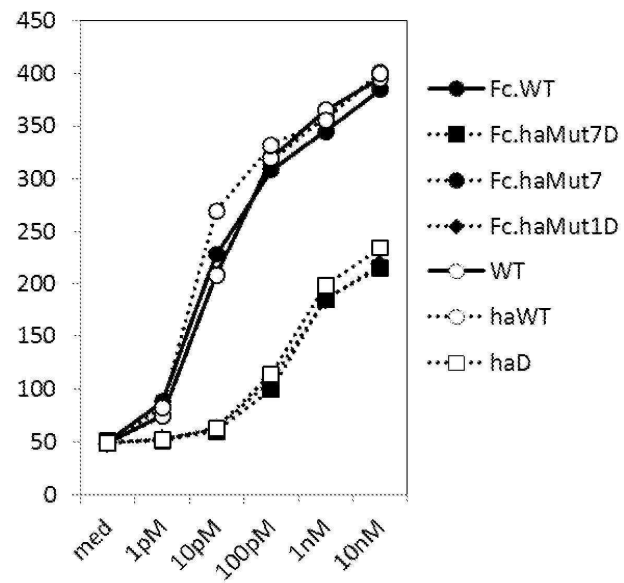
[0319]

선택된 시점에서, 실시예 11의 제1 사이노물거스 연구로부터의 혈청을 항약물 항체(ADA)에 대해 시험하였다(도 13). 샘플에 대한 ADA 신호/노이즈 데이터(여기서, Fc.V91K 특이성은 경쟁에 의해 확인됨)가 도시되어 있다. ADA가 시험된 시점은 x축 위의 수직 라인으로 도시되어 있다. 1 그룹에서, 하나의 동물은 마지막 용량의 적어도 15일 후 ADA를 생성하고, 2 그룹에서, 동물은 ADA에 대해 양성으로 시험되지 않았고, 3 그룹에서, ADA는 제1 용량의 15일 이상 후에 3개의 동물에서 일치하게 나타났다. 162일에 50µg/kg에 의한 1 그룹 및 2 그룹의 반복 투약 시, 추가의 동물은 4주 후(190일) ADA에 대해 양성으로 시험되지 않았다. 가장 강한 ADA 신호를 생성한 3 그룹에서의 2개의 동물(210, 212)은 감소한 PD 반응을 나타냈다(이 동물에서 제2 용량 후 관찰된 감소한 C_{최대}와 일치함). 제4 그룹에서의 동물(50µg/kg IV)은 ADA에 대해 양성으로 시험되지 않았다. ADA는 사이노물거스 IL-2와 인간 IL-2(V91K, C125A) 사이의 8개의 아미노산 차이로 인해 예상된 것처럼 IL-2 및 Fc 도메인 둘 다에 대해 특이적이었다. ADA의 중화 활성을 시험하지 않았다.

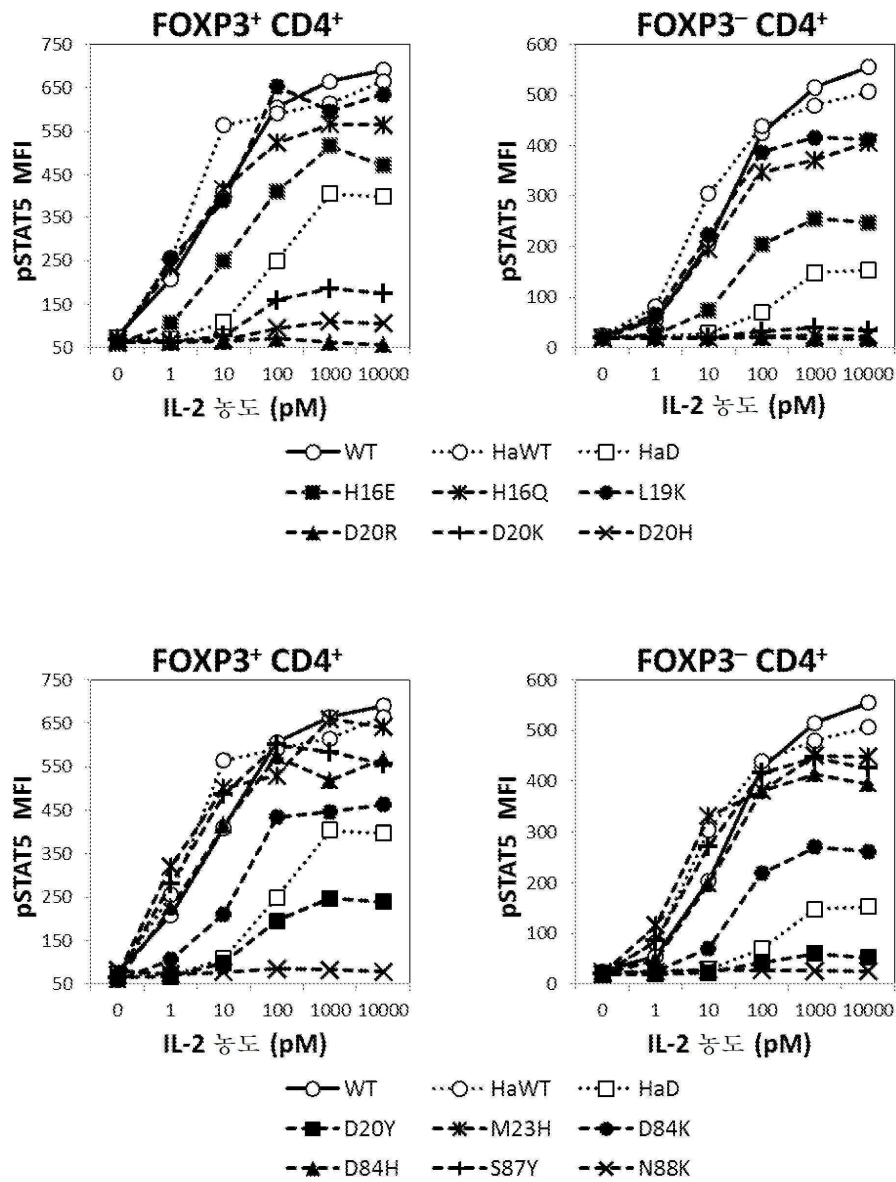
도면

도면1

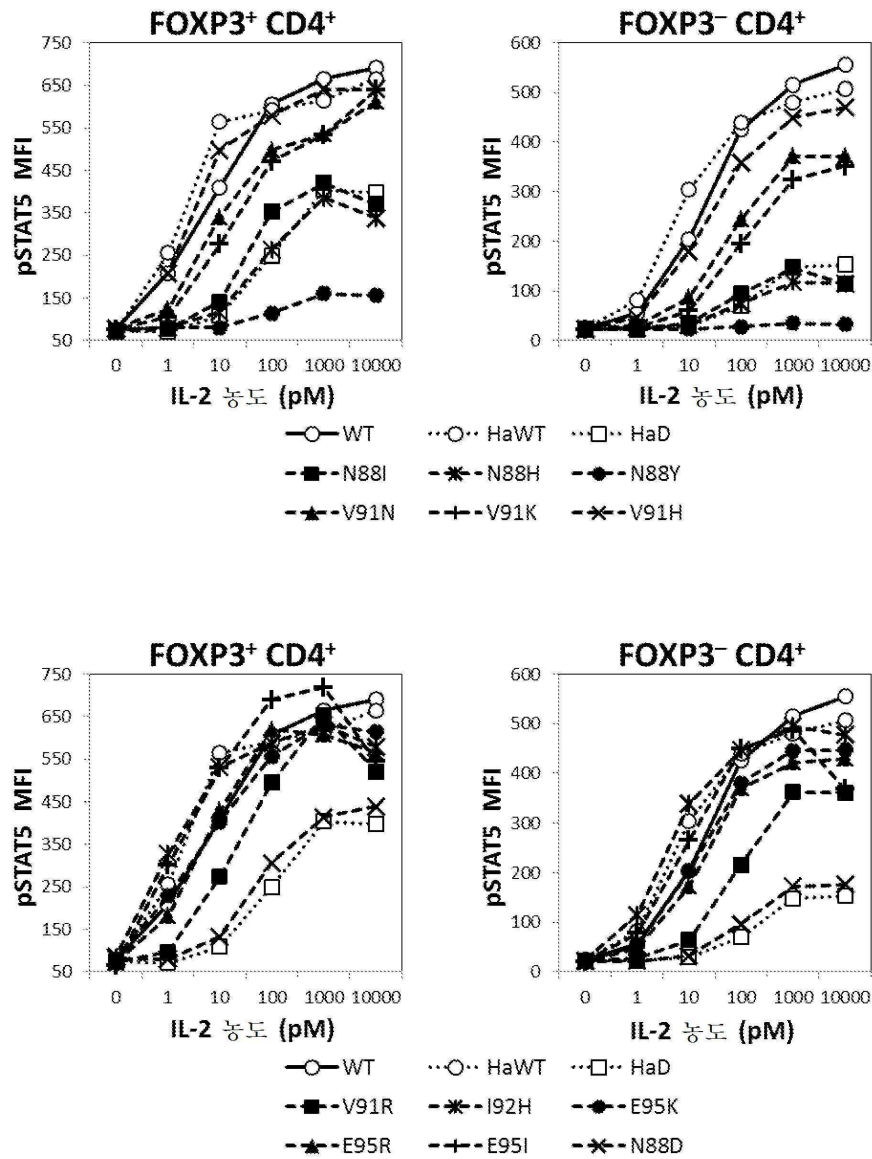
포스포-STAT5
(MFI)



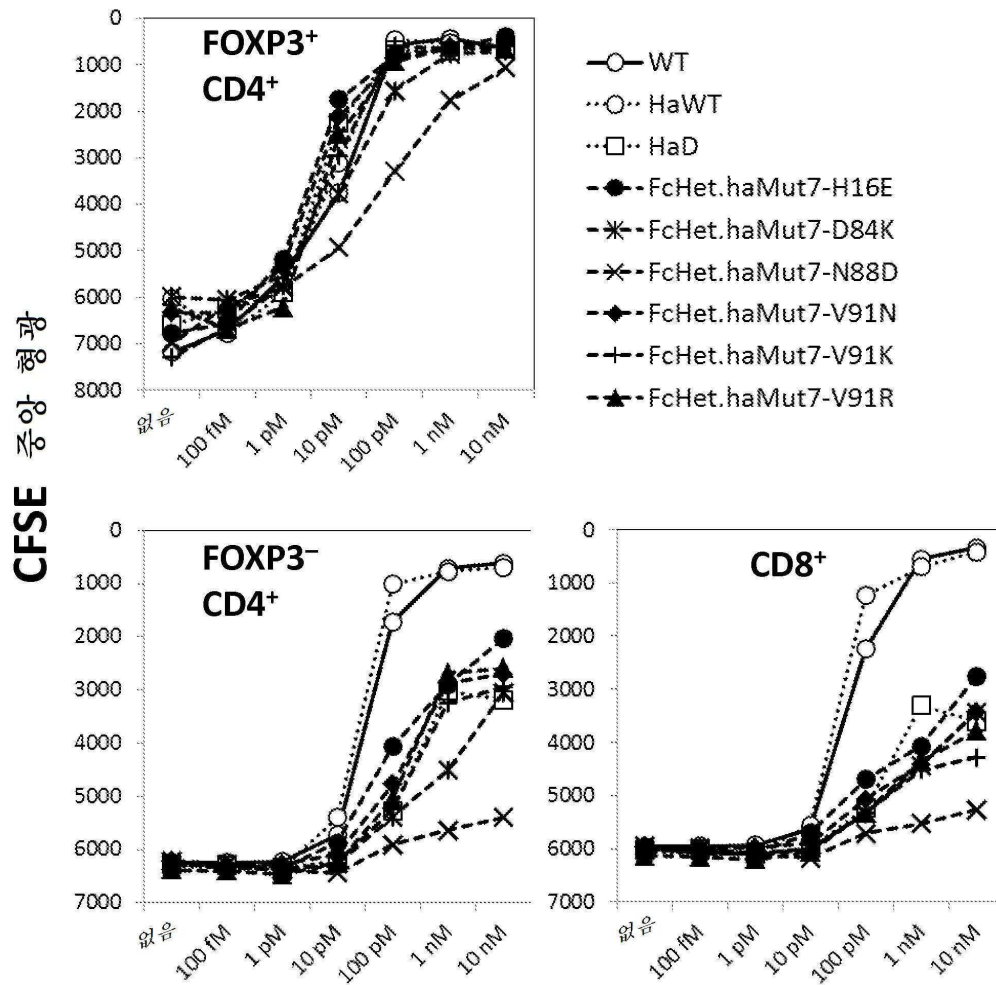
도면2a



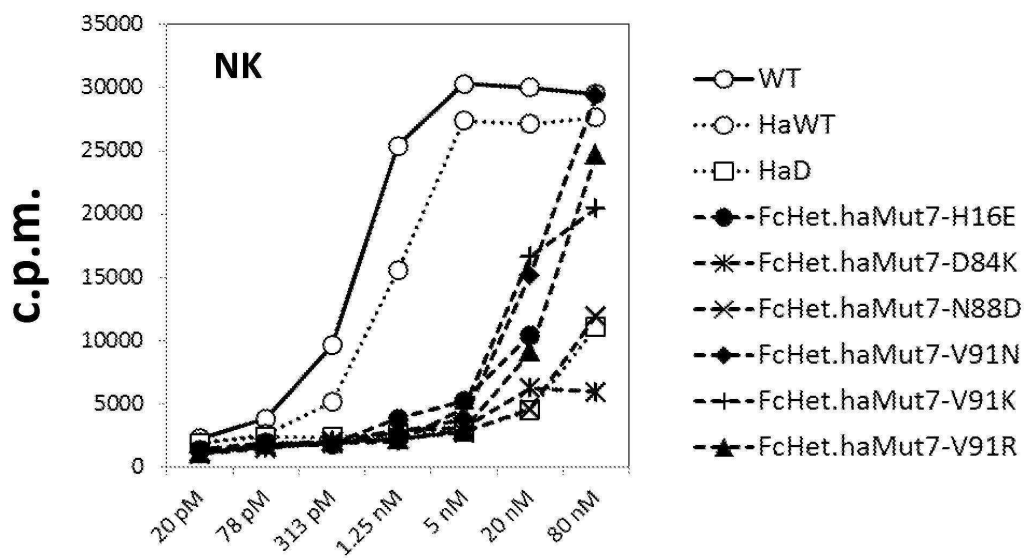
도면2b



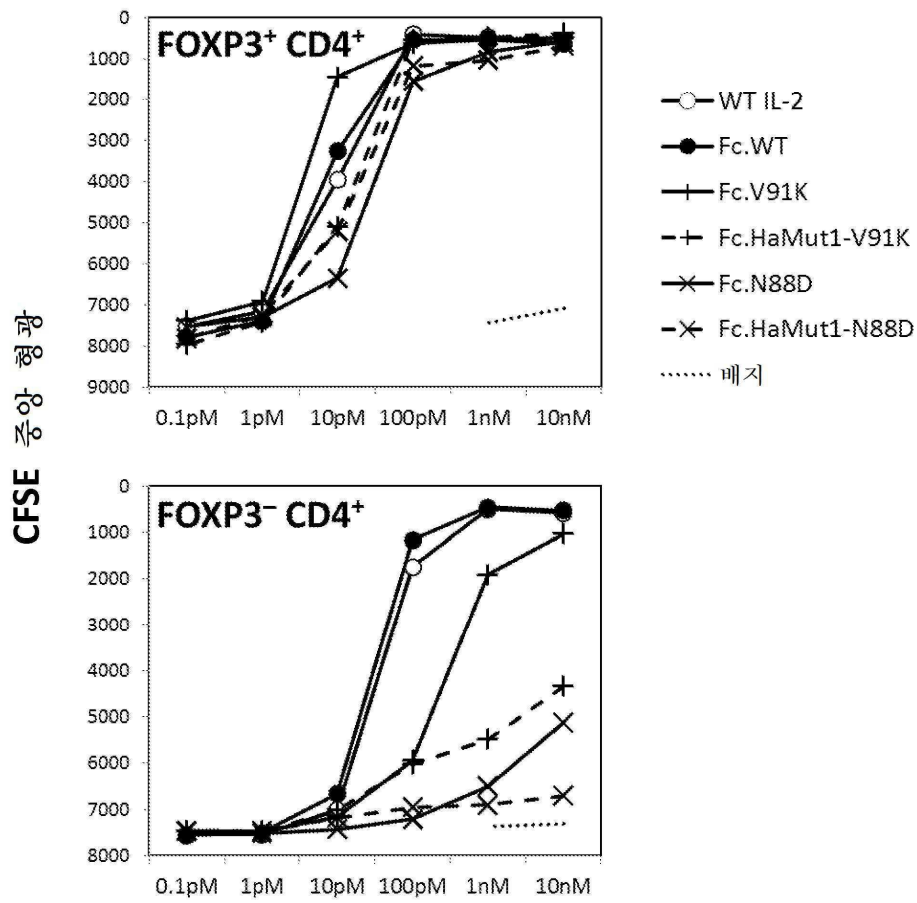
도면3



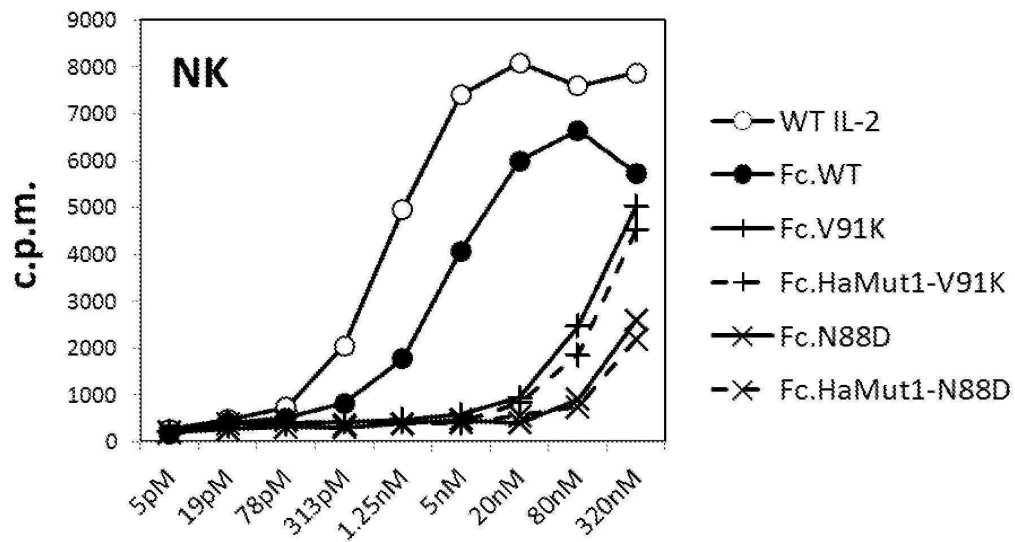
도면4



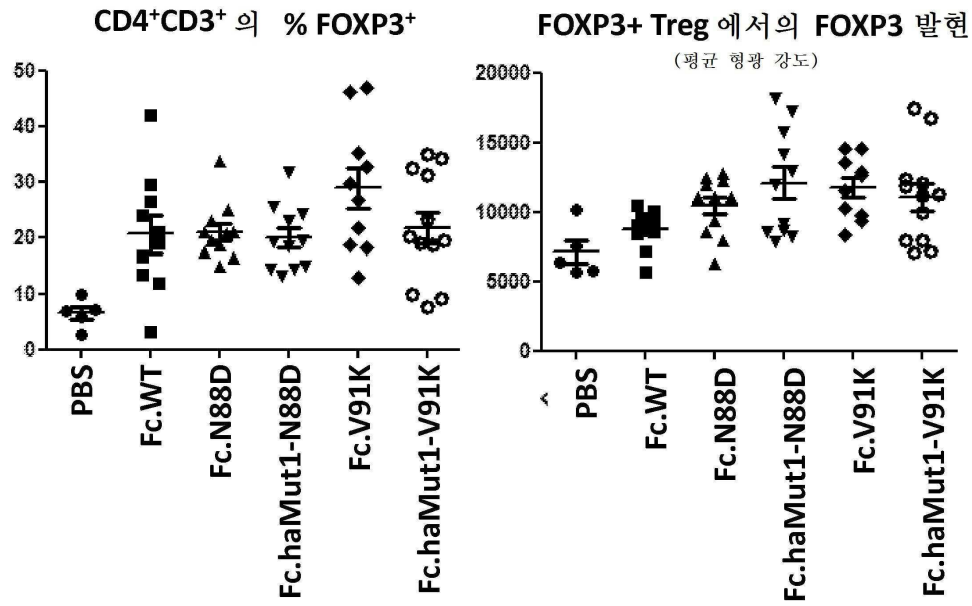
도면5



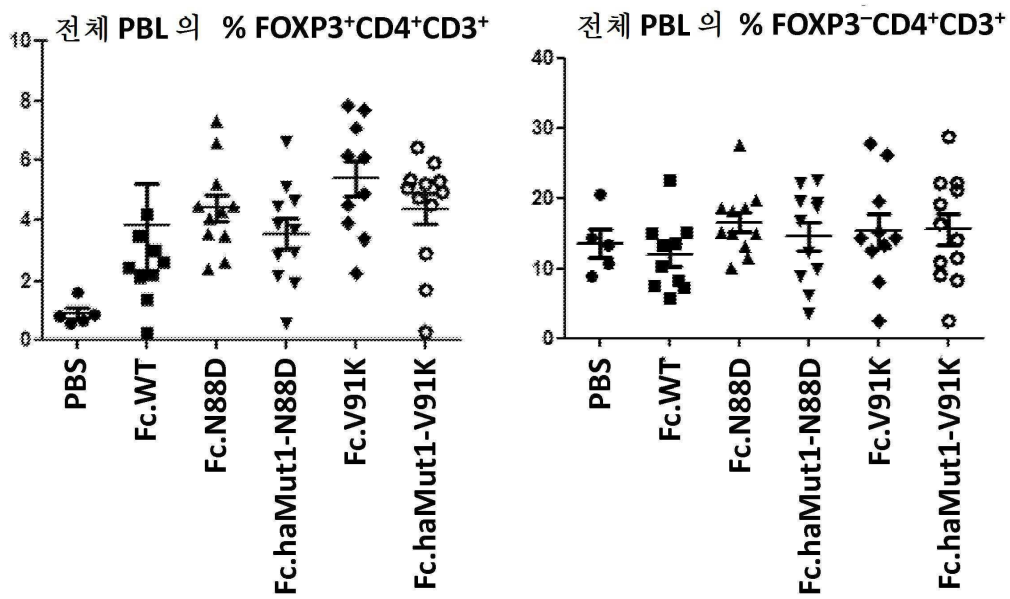
도면6



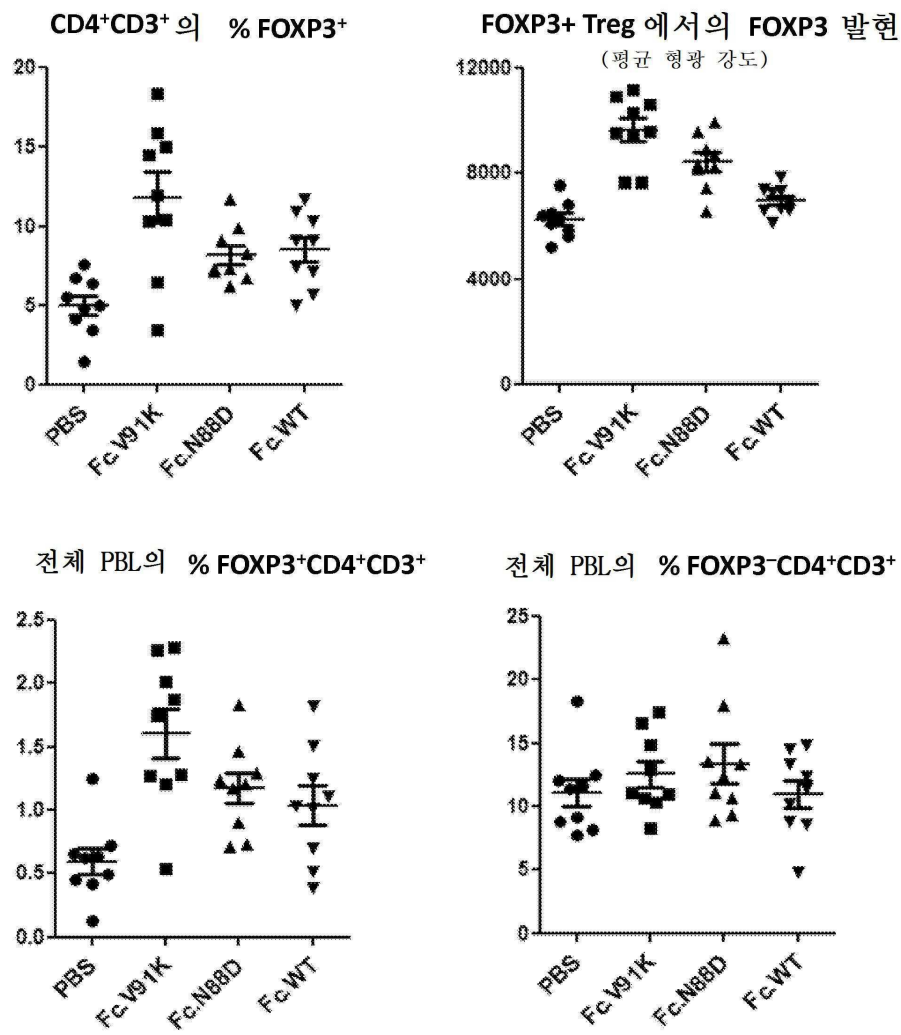
도면7a



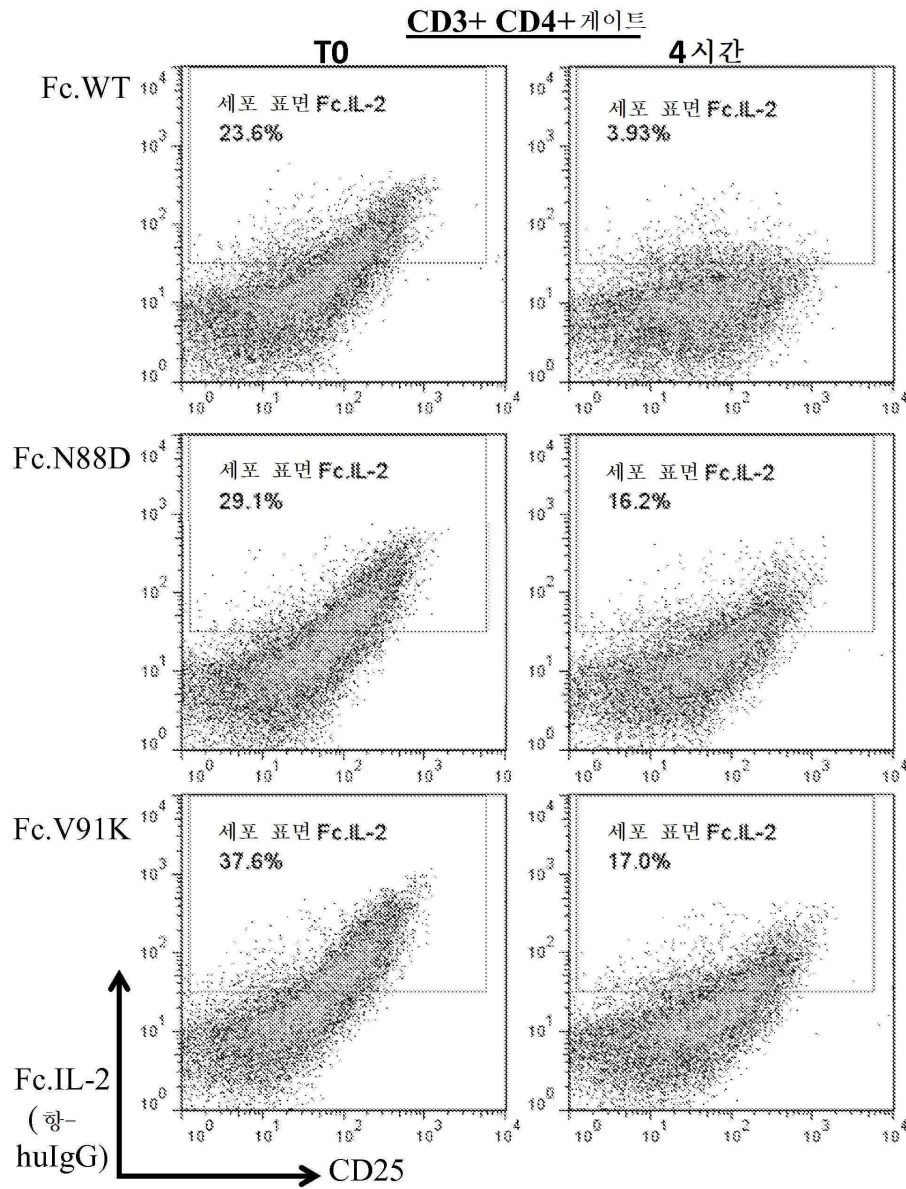
도면7b



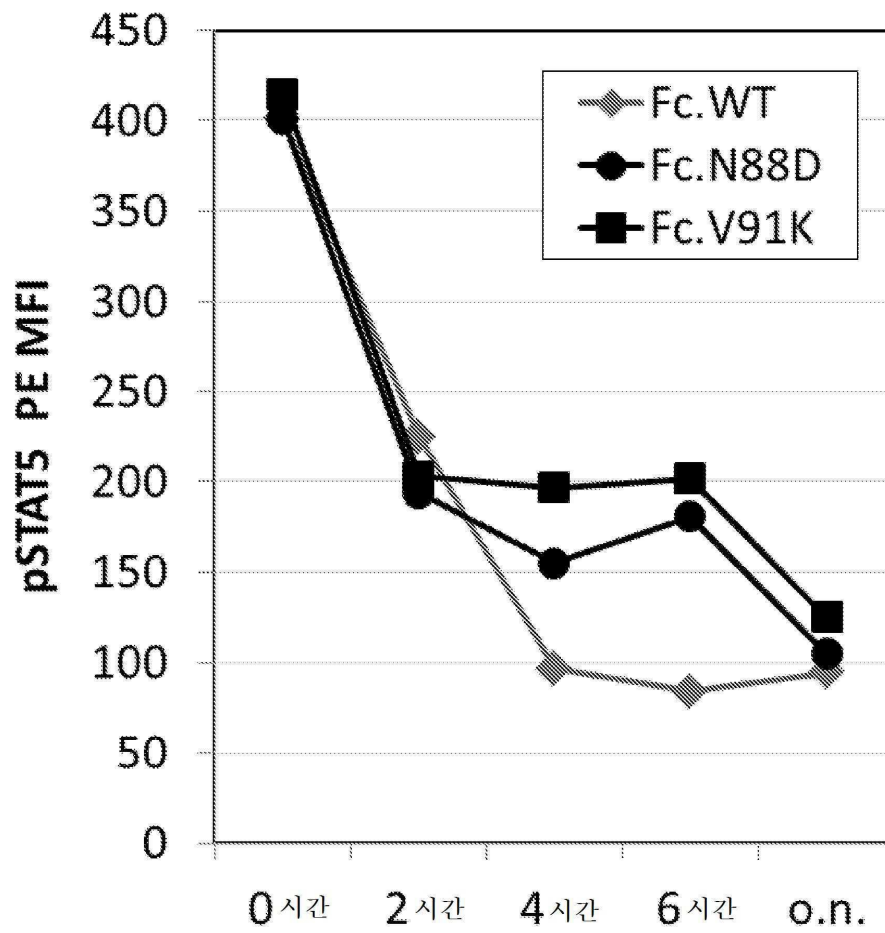
도면8



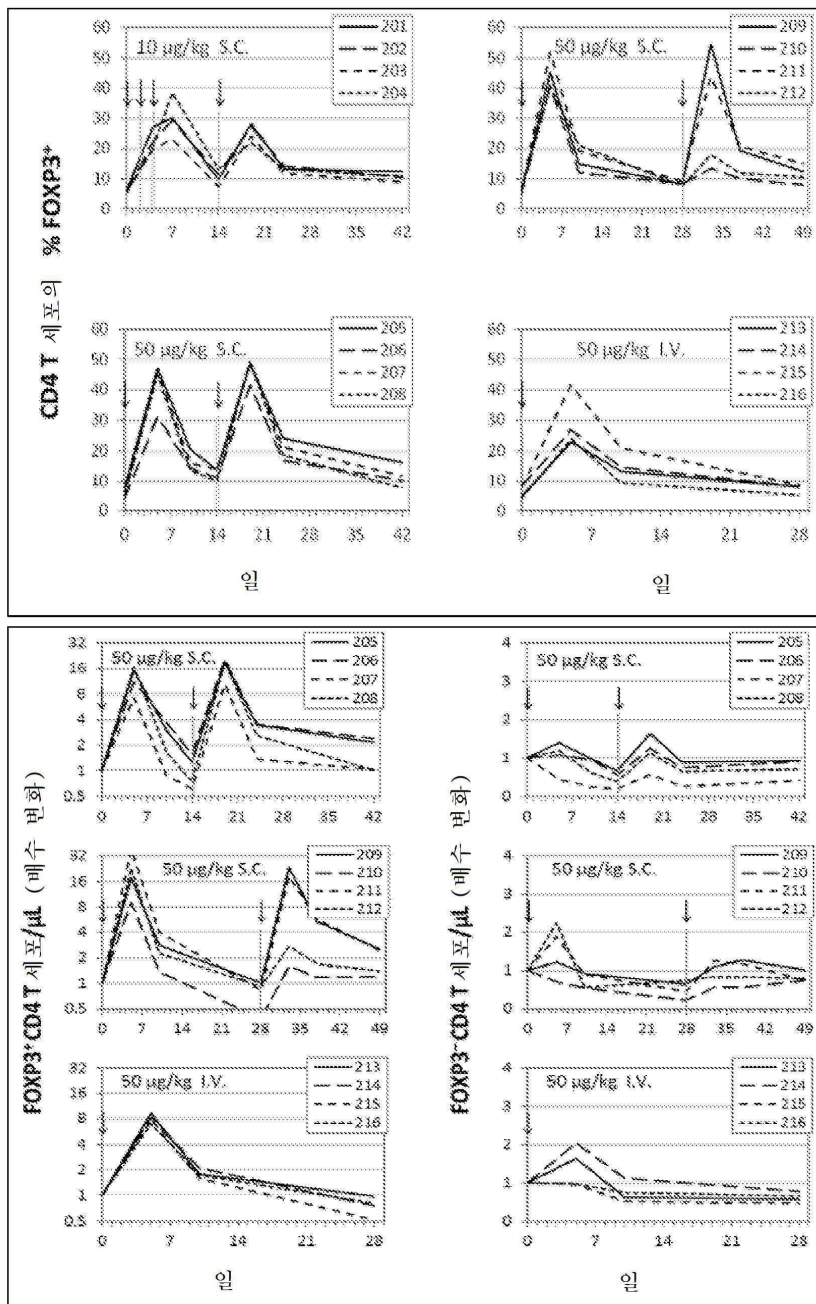
도면9a



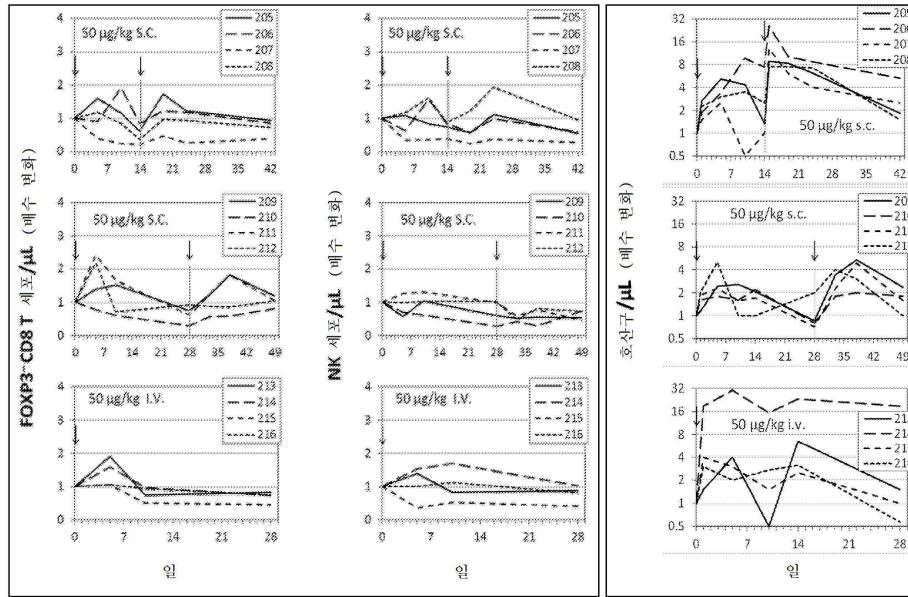
도면9b



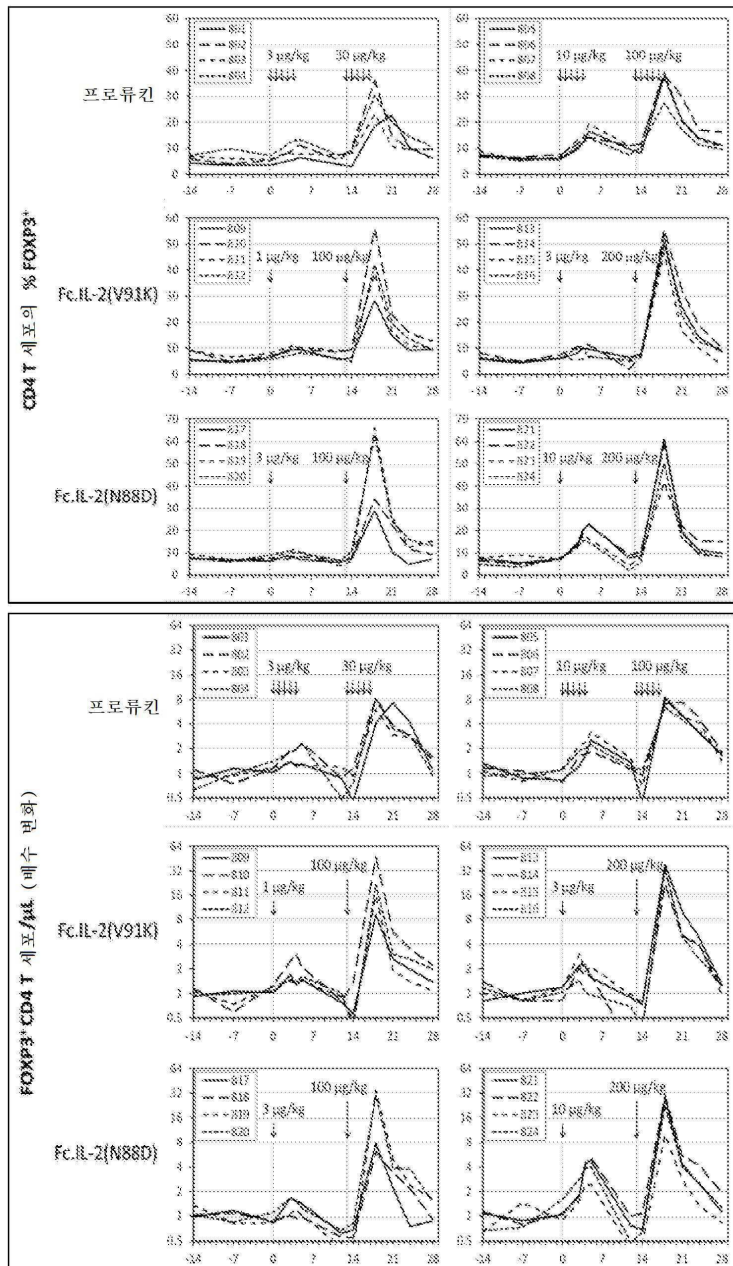
도면10a



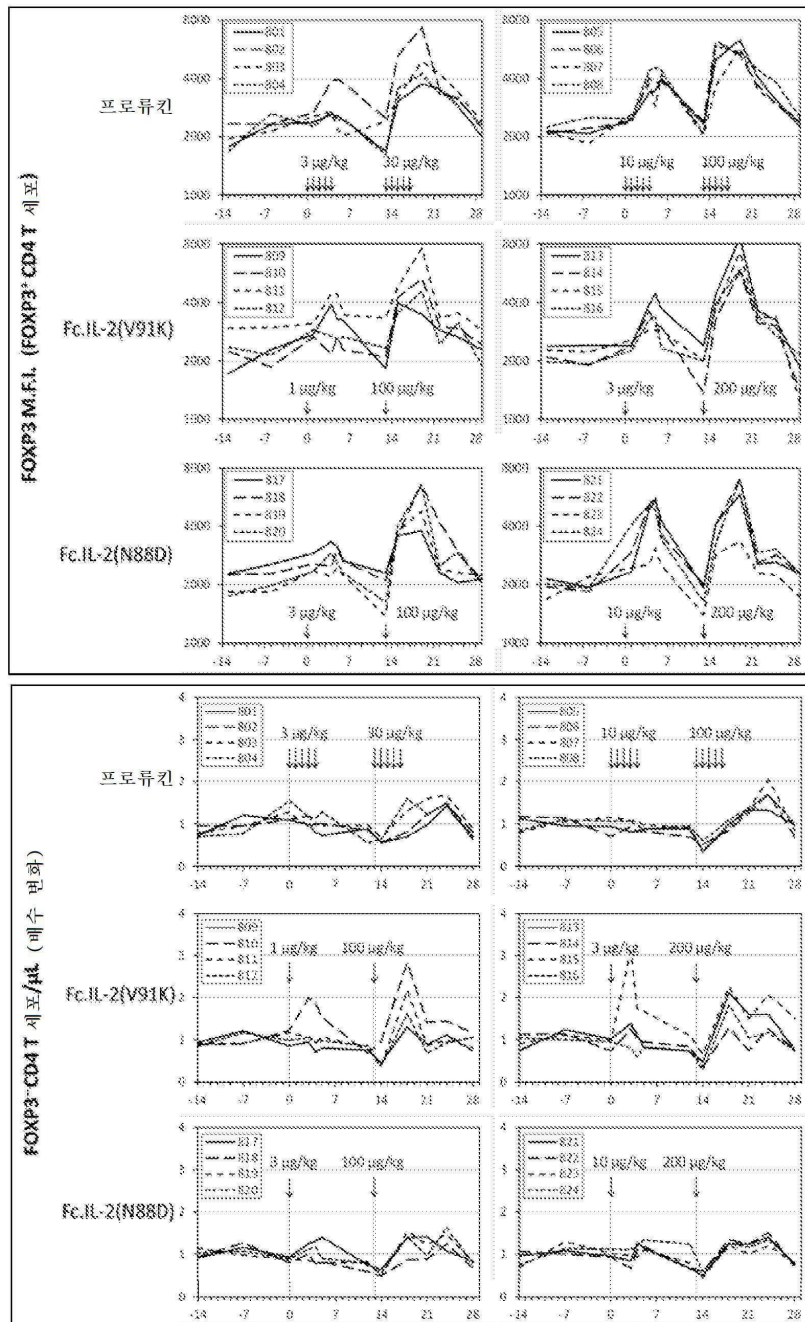
도면10b



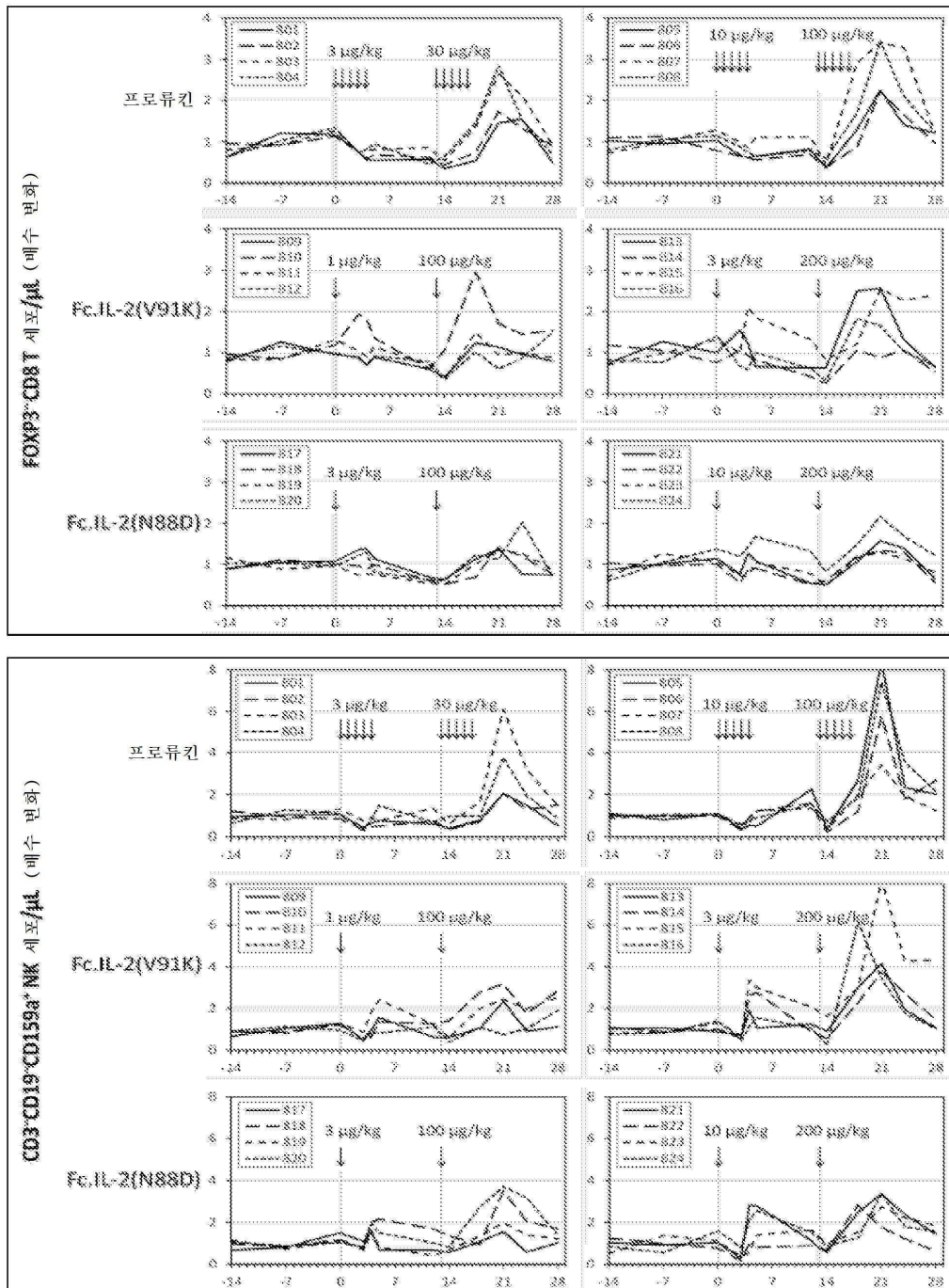
도면11a



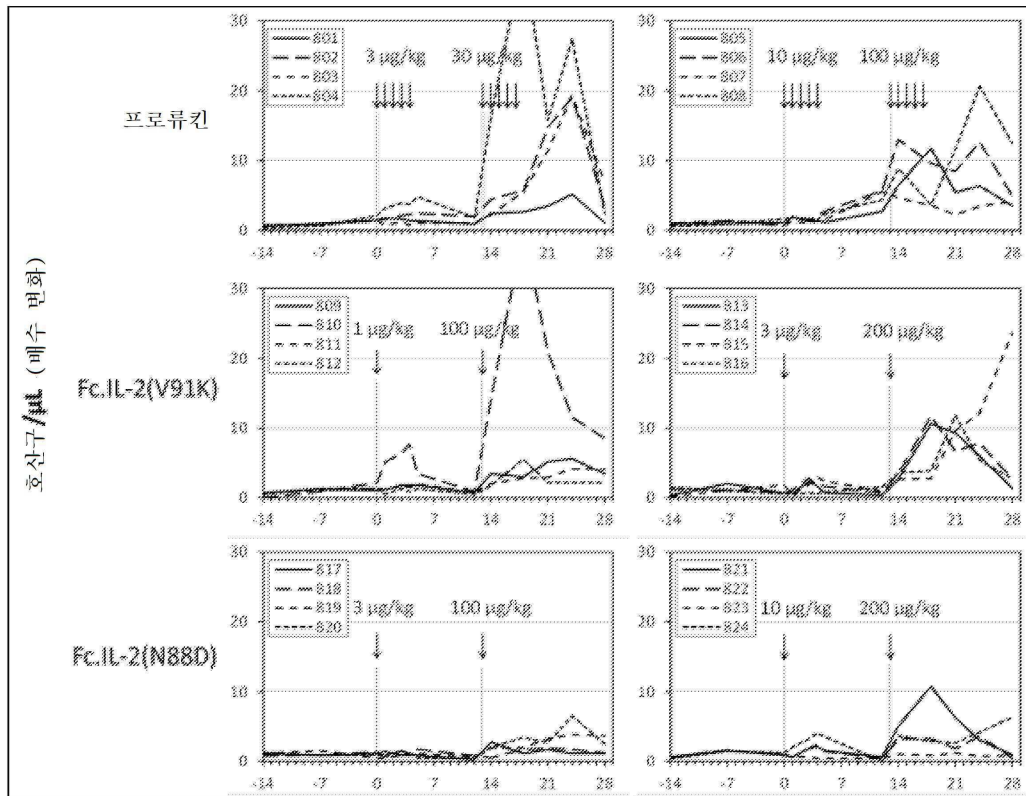
도면11b



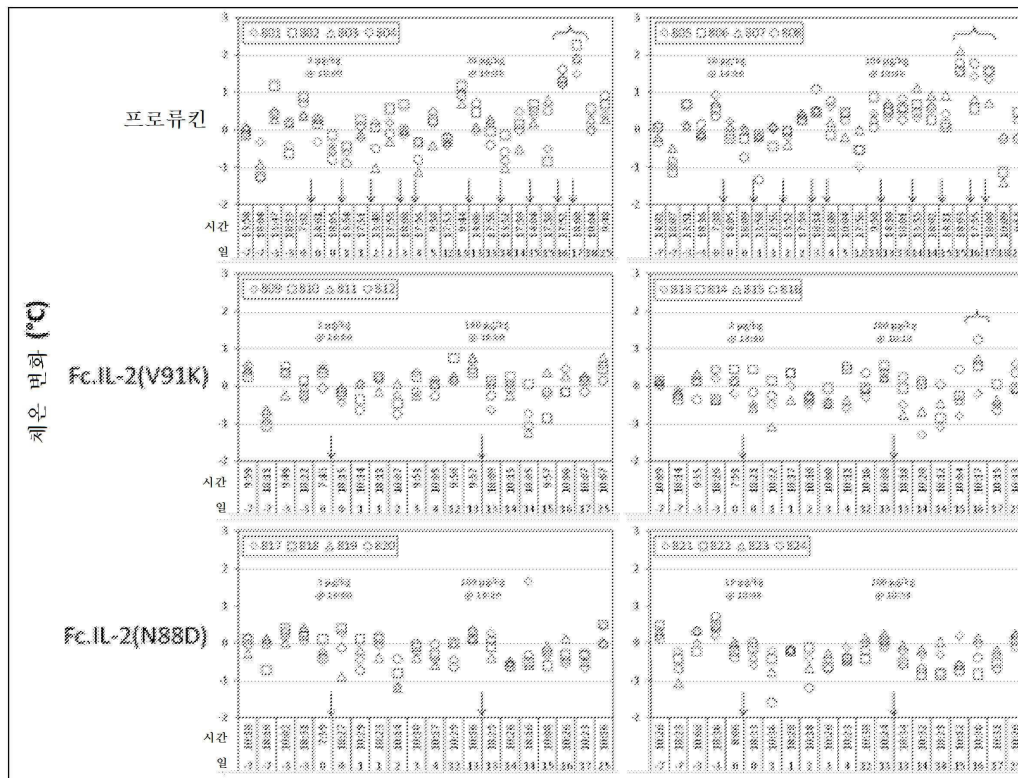
도면11c



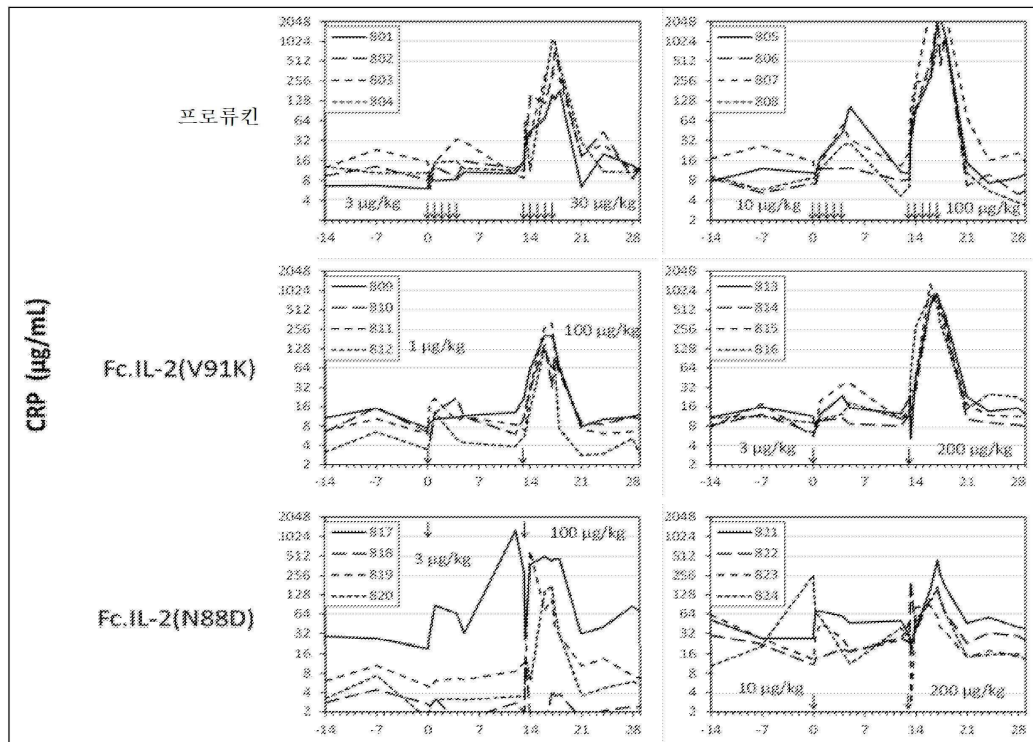
도면11d



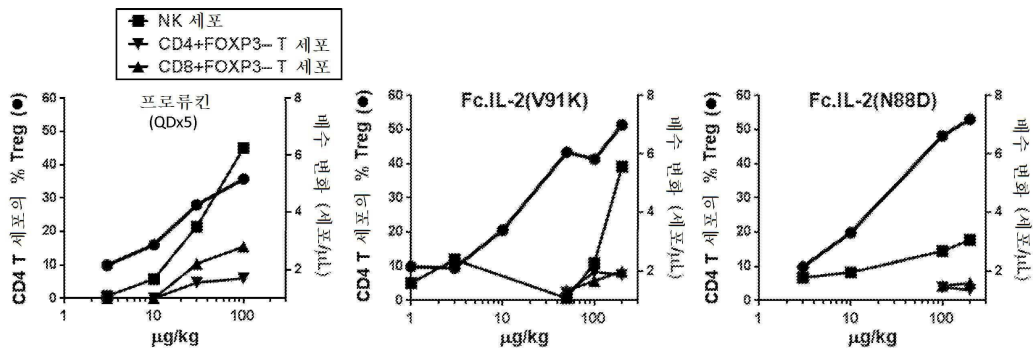
도면11e



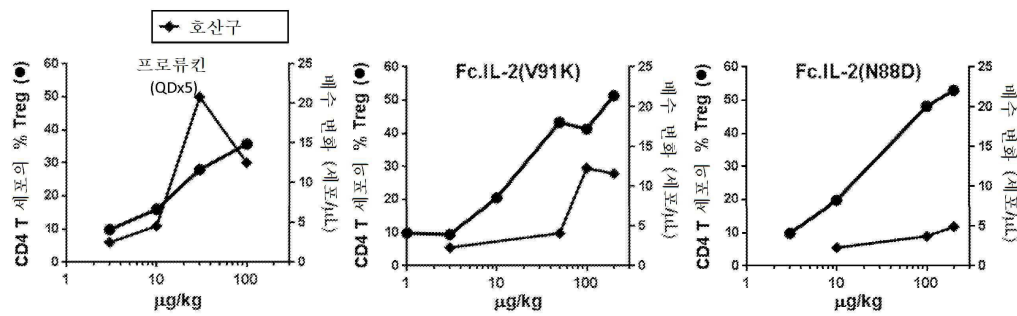
도면11f



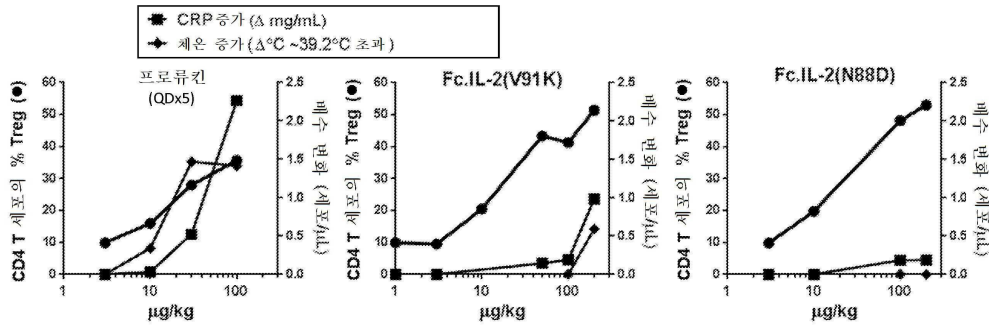
도면12a



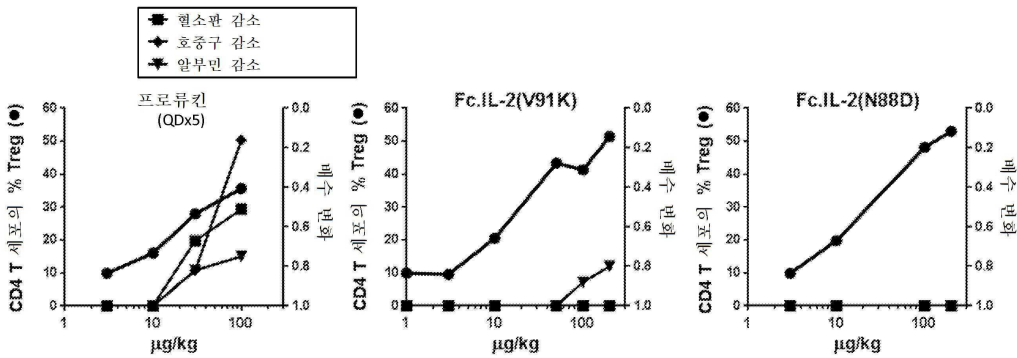
도면12b



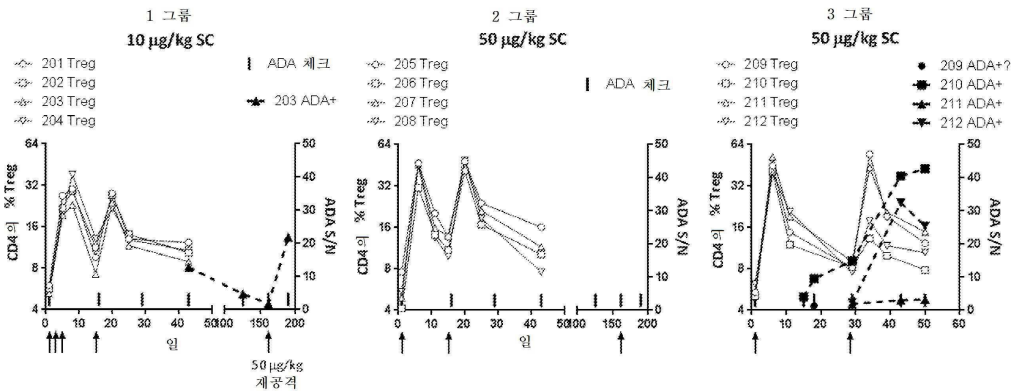
도면12c



도면12d



도면13



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN INC.

<120> INTERLEUKIN-2 MUTEINS FOR THE EXPANSION OF T-REGULATORY CELLS

<130> A-1826-WO-PCT

<140><141><150> 61/784,669

<151> 2013-03-14

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val or Ala

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val or Ala

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 4

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 5
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 6
 Gly Gly Asn Gly Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 7
 Tyr Gly Asn Gly Thr
 1 5
 <210> 8
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 8

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210

> 9

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 9

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Ser Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

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

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30
Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile

115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 11

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Ala Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 12

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 13

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Asp Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 14

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 14

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Ala Leu Arg Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu

65						70						75						80
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asp	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu			
					85						90						95	
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala			
					100						105						110	
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile			

115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr		

130

<210> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Asp Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 16

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 16

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220
Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys

225 230 235 240
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu

245 250 255
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr

260 265 270
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln

275 280 285
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala

290 295 300
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile

305 310 315 320
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys

325 330 335
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp

340 345 350
Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

355 360

<210> 17

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240
 Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr

260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln

275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala

290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile

305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys

325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp

340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

355 360

<210> 18

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 18

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240
 Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255
 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270
 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285
 Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300
 Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320
 Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys

325 330 335
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp

340 345 350
Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

355 360

<210> 19

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 19

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
305 310 315 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 20

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220
Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys

225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
290 295 300
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
305 310 315 320
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys

325 330 335
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350
Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 21

His His His His His His

1 5

<210> 22

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 22

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

20 25 30

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

35 40

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 23

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu

1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20 25 30

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

1 5 10 15

Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20 25

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 25

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu

1 5 10 15

Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20 25

<210> 26

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 26

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu

1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20 25

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 27

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20 25

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20 25

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 29

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu

1 5 10 15

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 30

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu

1 5 10 15

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 31

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20 25

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 32

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala

1 5 10 15

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20 25

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 33

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Ser Ser

1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 34

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20

<210> 35

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 35

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala

1 5 10 15

Pro Asn Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20 25

<210> 36

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 36

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala

1 5 10 15

Pro Asn Ser Thr Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20 25

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 37

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala

1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20 25

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 38

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Thr Ala

1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20 25