



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0068553
 (43) 공개일자 2017년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/54 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01) *C07K 16/24* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/5443 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7012741
- (22) 출원일자(국제) 2015년10월12일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년05월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/055156
- (87) 국제공개번호 WO 2016/060996
 국제공개일자 2016년04월21일
- (30) 우선권주장
 62/063,784 2014년10월14일 미국(US)

- (71) 출원인
아르모 바이오사이언시스 인코포레이티드
 미국 캘리포니아 94603 레드우드 시티 체사피크
 드라이브 575
- (72) 발명자
맥컬리 스코트
 미국 캘리포니아 94127 샌프란시스코 테레시타 불
 러바드 660
- (74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 132 항

(54) 발명의 명칭 인터류킨-15 조성물 및 이의 용도

(57) 요 약

인터류킨-15 뮤테인 및 다른 인터류킨-15 관련 분자 뿐만 아니라 인터류킨-15 뮤테인 및 다른 인터류킨-15 관련 분자를 동정하는 방법이 기재된다. 상기의 변형도 또한 본원에 기재되고, 이 변형은 인간 인터류킨-15와 비교하여 뮤테인 또는 다른 분자의 특성(예: 반감기)을 향상시킬 수 있다. 약제학적 조성물 및 사용 방법도 또한 본원에 기재된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/48215 (2013.01)

C07K 16/244 (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 펩티드:

a) 나선 A, b) A/B 나선간 접합부, c) 나선 B, d) B/C 나선간 접합부, e) 나선 C, f) C/D 나선간 접합부 및 g) 나선 D; 여기서 상기 펩티드가 하나 이상의 a) 내지 g)에 적어도 하나의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 포함하는, 펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 하기를 포함하는, 펩티드:

a) 나선 A, b) A/B 나선간 접합부, c) 나선 B, d) B/C 나선간 접합부, e) 나선 C, f) C/D 나선간 접합부 및 g) 나선 D; 여기서, 상기 펩티드는 하기를 포함하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함한다:

아미노산 잔기 2 (W), 4-12 (NVISDLKKI; 서열번호: 37), 또는 16 (I) 이외의 나선 A의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는

아미노산 잔기 30 (D) 또는 31 (V) 이외의 A/B 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는
아미노산 잔기 32 (H), 35 (C), 40 (M), 42-44 (CFL), 47 (L) 또는 50 (I) 이외의 나선 B의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는

B/C 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는

아미노산 잔기 59 (I), 61-66 (DTVENL; 서열번호: 38), 또는 68-70 (ILA) 이외의 나선 C의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는

아미노산 잔기 85 (C) 또는 88 (C) 이외의 C/D 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는

아미노산 잔기 99 (F), 100 (L), 103 (F), 또는 105-112 (HIVQMFIN; 서열번호: 39) 이외의 나선 D의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 보존적 치환인, 펩티드.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 펩티드가 서열번호: 3의 생체활성과 적어도 동일한 생체활성을 갖고, 상기 생체활성이 시험관내 검정 또는 생체내 검정으로 결정되는, 펩티드.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 생체활성이 TNF α 생산 검정, CTL-2 세포 증식 검정, M07e 세포 증식 검정, 또는 T-세포 IFN γ 분비 검정으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 시험관내 검정으로 결정되는, 펩티드.

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 면역원성에 악영향을 미치지 않는, 펩티드.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 펩티드의 면역원성이 T-세포 에피토프 또는 B-세포 에피토프 중 적어도 하나를 스크리닝함으로써 예측되는, 펩티드.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 스크리닝이 인 실리코 스크리닝 시스템 또는 생체외 검정 시스템 중의 적어도 하나인,

펩티드.

청구항 9

청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 하기 영역 중의 적어도 하나에 존재하는, 펩티드: 13-15, 17-29, 36-39, 51-58, 71-84, 또는 89-98.

청구항 10

청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 하기 영역 중의 적어도 하나에 존재하는, 펩티드: 17-28, 36-38, 51-57, 71-84, 또는 89-98.

청구항 11

청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 적어도 하기 위치 중의 하나에 존재하는, 펩티드: 1, 3, 13-15, 17-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 46, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114.

청구항 12

청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 적어도 하기 위치 중의 하나에 존재하는, 펩티드: 1, 17-28, 36-38, 41, 45, 46, 48, 49, 51-57, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 113, 또는 114.

청구항 13

청구항 2에 있어서, 상기 펩티드가 수용체 결합에 관련되는 아미노산 잔기의 치환을 포함하지 않는, 펩티드.

청구항 14

청구항 2에 있어서, 상기 펩티드가 변형된 펩티드를 형성하기 위한 적어도 하나의 변형을 포함하고;

상기 변형이 상기 펩티드의 아미노산 서열을 변경하지 않고,

상기 변형이 상기 펩티드의 적어도 하나의 특성을 향상시키는, 펩티드.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 폐길화되는, 펩티드.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 상기 펩티드의 N-말단에 공유 결합된 적어도 하나의 PEG 분자를 포함하는, 펩티드.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 5kDa 내지 50kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 20kDa 내지 40kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 19

청구항 15에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 20kDa을 초과하는 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 20

청구항 15에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 적어도 30kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 21

청구항 15에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 적어도 40kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 22

청구항 14에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 글리코실화되는, 펩티드.

청구항 23

청구항 14에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 Fc 융합 분자를 포함하는, 펩티드.

청구항 24

청구항 14에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 혈청 일부민을 포함하는, 펩티드.

청구항 25

청구항 14에 있어서, 상기 변형이 부위 특이적인, 펩티드.

청구항 26

청구항 14에 있어서, 상기 변형이 링커를 포함하는, 펩티드.

청구항 27

청구항 14에 있어서, 상기 변형이 상기 펩티드의 적어도 하나의 물리적 특성을 향상시키는, 펩티드.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 물리적 특성이 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및 순환 시간으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 펩티드.

청구항 29

청구항 14에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 성숙한 인간 IL-15의 활성에 적어도필적하는 활성을 갖는, 펩티드.

청구항 30

청구항 2에 있어서, 상기 펩티드가 재조합적으로 생산되는, 펩티드.

청구항 31

서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드로서, 상기 펩티드가 표면 노출된아미노산 잔기의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고;

상기 치환이 하기 효과 중의 적어도 하나를 갖고: (a) 상기 펩티드의 적어도 하나의 물리적 특성을 향상시키고, (b) 상기 펩티드의 면역원성에 악영향을 미치지 않거나, (c) 상기 펩티드의 생체활성에 악영향을 미치지 않는, 펩티드.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 펩티드가 수용체 결합에 관련되는 아미노산의 치환을포함하지 않는, 펩티드.

청구항 33

청구항 31에 있어서, 상기 치환이 상기 펩티드의 분자내 디설파이드 결합을 파괴하지 않는, 펩티드.

청구항 34

청구항 31에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 보존적 치환인, 펩티드.

청구항 35

청구항 31에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 하나 이상의 아미노산 잔기 35, 42, 85 및 88에서의 치환이 아닌, 펩티드.

청구항 36

서열번호: 3의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 포함하는 웨티드로서, 상기 웨티드가 하기 특성 중의 적어도 하나를 포함하는, 웨티드: (a) 상기 서열번호: 3의 웨티드보다 더 면역원성이 아니고, (b) 상기 서열번호: 3의 웨티드의 생체활성과 적어도 동일한 생체활성을 갖고, (c) 상기 서열번호: 3의 웨티드의 적어도 하나의 물리적 특성을 향상시킨다.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는, 웨티드.

청구항 38

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 갖는, 웨티드.

청구항 39

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 98% 아미노산 서열 동일성을 갖는, 웨티드.

청구항 40

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는, 웨티드.

청구항 41

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 90개의 아미노산 잔기를 갖는, 웨티드.

청구항 42

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 100개의 아미노산 잔기를 갖는, 웨티드.

청구항 43

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 105개의 아미노산 잔기를 갖는, 웨티드.

청구항 44

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 적어도 110개의 아미노산 잔기를 갖는, 웨티드.

청구항 45

청구항 36에 있어서, 상기 웨티드가 상기 서열번호: 3의 아미노산 서열에 대한 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 포함하는, 웨티드.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 상기 웨티드가 수용체 결합에 관련되는 아미노산 잔기의 치환을 포함하지 않는, 웨티드.

청구항 47

청구항 45에 있어서, 상기 웨티드가 표면 노출된 아미노산 잔기의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는, 웨티드.

청구항 48

청구항 45에 있어서, 상기 적어도 하나의 첨가, 결실 또는 치환이 상기 웨티드의 분자내 디설파이드 결합을 파괴하지 않는, 웨티드.

청구항 49

청구항 45에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 보존적 치환인, 웨티드.

청구항 50

청구항 45에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 하나 이상의 아미노산 잔기 35, 42, 85 및 88에서의 치환이 아닌, 펩티드.

청구항 51

청구항 31 또는 36에 있어서, 상기 물리적 특성이 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및 순환 시간으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 펩티드.

청구항 52

청구항 31 또는 36에 있어서, 상기 펩티드가 상기 서열번호: 3의 생체활성과 적어도 동일한 생체활성을 갖고, 상기 생체활성이 시험관내 검정 또는 생체내 검정으로 결정되는, 펩티드.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 시험관내 활성이 TNF α 생산 검정, CTL-2 세포 증식 검정, M07e 세포 증식 검정, 또는 T-세포 IFN γ 분비 검정 중의 적어도 하나인, 펩티드.

청구항 54

청구항 31 또는 36에 있어서, 상기 펩티드의 면역원성이 T-세포 에피토프 또는 B-세포 에피토프 중 적어도 하나를 스크리닝함으로써 예측되는, 펩티드.

청구항 55

청구항 54에 있어서, 상기 스크리닝이 인 실리코 스크리닝 시스템 또는 생체외 검정 시스템 중의 적어도 하나인, 펩티드.

청구항 56

청구항 31 또는 36에 있어서, 상기 펩티드가 변형된 펩티드를 형성하기 위한 적어도 하나의 변형을 포함하고;

상기 변형이 상기 변형된 펩티드의 아미노산 서열을 변경하지 않고,

상기 변형된 펩티드가 성숙한 인간 IL-15의 활성에 적어도 필적하는 활성을 갖는, 펩티드.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 폐질화되는, 펩티드.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 상기 펩티드의 N-말단에 공유 결합된 적어도 하나의 PEG 분자를 포함하는, 펩티드.

청구항 59

청구항 57에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 5kDa 내지 50kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 60

청구항 57에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 20kDa 내지 40kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 61

청구항 57에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 20kDa을 초과하는 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 62

청구항 57에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 적어도 30kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 63

청구항 57에 있어서, 상기 변형된 펩티드의 PEG 성분이 적어도 40kDa의 분자 질량을 갖는, 펩티드.

청구항 64

청구항 56에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 글리코실화되는, 펩티드.

청구항 65

청구항 56에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 Fc 융합 분자를 포함하는, 펩티드.

청구항 66

청구항 56에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 혈청 알부민을 포함하는, 펩티드.

청구항 67

청구항 56에 있어서, 상기 변형이 부위 특이적인, 펩티드.

청구항 68

청구항 56에 있어서, 상기 변형이 링커를 포함하는, 펩티드.

청구항 69

청구항 56에 있어서, 상기 변형이 상기 펩티드의 적어도 하나의 물리적 특성을 향상시키는, 펩티드.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 상기 물리적 특성이 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및 순환 시간으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 펩티드.

청구항 71

청구항 56에 있어서, 상기 변형된 펩티드가 성숙한 인간 IL-15의 활성에 적어도 필적하는 활성을 갖는, 펩티드.

청구항 72

청구항 2에 있어서, 상기 펩티드가 재조합적으로 생산되는, 펩티드.

청구항 73

청구항 31 또는 36에 있어서, 상기 펩티드가 재조합적으로 생산되는, 펩티드.

청구항 74

청구항 1, 2, 31 또는 36 중 어느 한 항의 펩티드를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 75

청구항 74에 있어서, 상기 핵산 분자가 시험관내, 세포 또는 생체내에서 상기 펩티드를 코딩하는 상기 핵산 분자의 발현을 부여하는 발현 조절 요소에 작동가능하게 연결되는, 핵산 분자.

청구항 76

청구항 75의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 77

청구항 76에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터를 포함하는, 벡터.

청구항 78

청구항 1, 2, 31 또는 36 중 어느 한 항의 패티드를 발현시키는 형질전환된 또는 숙주 세포.

청구항 79

청구항 1, 2, 31 또는 36 중 어느 한 항의 패티드, 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 80

청구항 79에 있어서, 상기 부형제가 등장성 주사 용액인, 약제학적 조성물.

청구항 81

청구항 79에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 인간 투여용으로 적합한, 약제학적 조성물.

청구항 82

청구항 79에 있어서, 적어도 하나의 추가의 예방적 또는 치료적 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 83

청구항 79의 약제학적 조성물을 포함하는 멸균 용기.

청구항 84

청구항 83에 있어서, 상기 멸균 용기가 주사기인, 멸균 용기.

청구항 85

청구항 84의 멸균 용기를 포함하는 키트.

청구항 86

청구항 86에 있어서, 적어도 하나의 추가의 예방적 또는 치료적 제제를 포함하는 제2의 멸균 용기를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 87

청구항 1, 2, 31 또는 36 중 어느 한 항의 패티드에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 88

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인, 항체.

청구항 89

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 별도의 폴리펩티드에 존재하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 90

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 단일 패티드에 존재하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 91

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 중쇄 불변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역이 이소형 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4인, 항체.

청구항 92

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 검출가능하게 표지되는, 항체.

청구항 93

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, 또는 Fab'인, 항체.

청구항 94

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 인간 항체인, 항체.

청구항 95

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 약 10^7 M^{-1} 내지 약 10^{12} M^{-1} 의 친화도를 갖는 상기 웨პ티드에 결합하는, 항체.

청구항 96

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 지질 잔기, 지방산 잔기, 다당류 잔기 및 탄수화물 잔기로부터 선택된 공유 결합 잔기를 포함하는, 항체.

청구항 97

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 친화도 도메인을 포함하는, 항체.

청구항 98

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 고체 지지체 상에 고정되는, 항체.

청구항 99

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 인간화 항체인, 항체.

청구항 100

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 일본쇄 Fv (scFv) 항체인, 항체.

청구항 101

청구항 100에 있어서, 상기 scFv가 다양체화된, 항체.

청구항 102

청구항 87에 있어서, 상기 항체가 공유 결합된 비웨პ티드 중합체를 포함하는, 항체.

청구항 103

청구항 102에 있어서, 상기 중합체가 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체인, 항체.

청구항 104

청구항 87의 항체, 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 105

청구항 104에 있어서, 상기 부형제가 등장성 주사 용액인, 약제학적 조성물.

청구항 106

청구항 104에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 인간 투여용으로 적합한, 약제학적 조성물.

청구항 107

청구항 104에 있어서, 적어도 하나의 추가의 예방적 또는 치료적 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 108

청구항 104의 약제학적 조성물을 포함하는 멸균 용기.

청구항 109

청구항 108에 있어서, 상기 멸균 용기가 주사기인, 멸균 용기.

청구항 110

청구항 109의 멸균 용기를 포함하는 키트.

청구항 111

청구항 110에 있어서, 제2의 치료제를 포함하는 제2의 멸균 용기를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 112

청구항 2, 31 또는 36의 웹티드의 치료적 유효량을 대상체에게 투여함을 포함하는, 대상체의 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 113

청구항 112에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 상태가 증식성 장애인, 방법.

청구항 114

청구항 113에 있어서, 상기 증식성 장애가 암인, 방법.

청구항 115

청구항 114에 있어서, 상기 암이 고형 종양 또는 혈액학적 장애인, 방법.

청구항 116

청구항 112에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 상태가 면역 또는 염증 장애인, 방법.

청구항 117

청구항 116에 있어서, 면역 또는 염증 장애가 염증성 장 질환, 건선, 류마티스성관절염, 다발성 경화증 및 알츠하이머병으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 118

청구항 112에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 상태가 바이러스 장애인, 방법.

청구항 119

청구항 118에 있어서, 상기 바이러스 장애가 인간 면역결핍 바이러스, B형 간염바이러스, C형 간염 바이러스 및 사이토메갈로바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 120

청구항 112에 있어서, 상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 121

청구항 112에 있어서, 상기 투여가 비경구 주사에 의한 것인, 방법.

청구항 122

청구항 121에 있어서, 상기 비경구 주사가 피하인, 방법.

청구항 123

청구항 112에 있어서, 적어도 하나의 추가의 예방적 또는 치료적 제제를 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 124

서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드로서, 상기 웨티드가 하기 위치 중의 하나에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는, 웨티드: 1, 3, 13-15, 17-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114.

청구항 125

청구항 124에 있어서, 상기 웨티드가 하기 위치에서 적어도 하나의 아미노산 잔기에 대한 티로신의 치환을 포함하는, 웨티드: 1, 3, 13-15, 17-25, 27-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114.

청구항 126

청구항 124에 있어서, 상기 웨티드가 하기 위치에서 적어도 하나의 아미노산 잔기에 대한 시스테인의 치환을 포함하는, 웨티드: 1, 3, 13-15, 17-25, 27-29, 33, 34, 36-39, 45, 48, 49, 51-56, 58, 60, 67, 72-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114.

청구항 127

청구항 124에 있어서, 상기 웨티드가 하기 위치에서 적어도 하나의 아미노산 잔기에 대한 N-X-S 글리코실화 모티프의 치환을 포함하고: 1, 13-15, 17-22, 27-29, 34, 36, 48, 49, 51-58, 60, 72-82, 84, 87, 89-98, 102, 또는 104,

상기 N-X-S 글리코실화 모티프의 아스파라긴이 상기 아미노산 위치를 나타내는, 웨티드.

청구항 128

청구항 124에 있어서, 상기 웨티드가 다음 위치에서 적어도 하나의 아미노산 잔기에 대한 N-X-T 글리코실화 모티프의 치환을 포함하고: 1, 13-15, 17-22, 29, 34, 36, 48, 49, 51-58, 60, 71-78, 80-82, 84, 87, 89-98, 또는 102,

상기 N-X-T 글리코실화 모티프의 아스파라긴이 아미노산 위치를 나타내는, 웨티드.

청구항 129

청구항 124 내지 128 중의 어느 한 항의 웨티드 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 130

청구항 129의 약제학적 조성물을 포함하는 멸균 용기.

청구항 131

청구항 130의 멸균 용기를 포함하는 키트.

청구항 132

청구항 124 내지 128 중의 어느 한 항의 웨티드의 치료적 유효량을 대상체에게 투여함을 포함하는, 대상체의 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본원은 하기의 우선권 이점을 주장한다: U.S. 가출원 제62/063,784호 (2014년 10월 14일에 출원), 이는 그 전체가 본원에 참고로 편입되어 있다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 특히 인터류킨-15 뮤테인 및 다른 인터류킨-15 - 관련 분자, 상기의 변형, 및 이의 관련 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 인터류킨-15 (IL-15)는 NK 세포, CD8+ 기억 T-세포 및 천연 CD8+ 세포의 세포 용해 활성, 사이토카인 분비, 증식 및 생존의 자극에 관여하는 사이토카인이다 (참조: Fehniger, 등, J Immunol 162: 4511-20 (1999)). 다면발현성 사이토카인으로서, 이는 타고난 적응성 면역에서 중요한 역할을 한다 (참조: Lodolce, 등, Cytokine Growth Factor Rev 13(6): 429-39 (December 2002)) 및 Alves, 등, Blood 102: 2541-46 (2003)).

[0006] IL-15는 대식세포, 단구 세포, 수지상 세포 및 섬유아세포를 포함하는 다수의 세포 유형에 의해 구성적으로 발현된다 (참조: Grabstein, 등, Science 264(5161): 965-68 (May 1994)). IL-15의 발현은 하기에 의해 자극될 수 있다: 예를 들면, 사이토카인 (예: GM-CSF), 이본쇄 mRNA, 비메틸화 CpG 올리고뉴클레오티드, 틀형 수용체를 통한 리포다당류, 및 인터페론 (예: IFN- γ), 또는, 예를 들어, 헤스페스 바이러스, 마이코박테리움 투베르콜로시스(Mycobacterium tuberculosis) 및 칸디다 알비칸스(Candida albicans)로 단핵 세포의 감염 후 (참조: Bamford, 등, J Immunol 160(9): 4418-26 (May 1998)).

[0007] IL-15는 T-세포 및 NK 세포 상의 특이적 수용체 복합체에 결합한다. IL-15 및 IL-15R α 는 활성화 수지상 세포에서 공발현되고, IL-15는 IL-15R α 와 복합체로 기능한다 (참조: Bergamaschi, 등, J Biol Chem 283: 4189-99 (2008)). IL-15/IL-15 α 는 T-세포 및 NK 세포 상의 두 개의 쇄 - IL-2R β (IL-15R β 로서 칭명되기도 함; CD122) 및 γ c (IL-2RG로서 칭명되기도 함; CD132; γ -c; 일반적인 γ -쇄) 분자에 헤테로다이머로서 결합한다. β 및 γ c 쇄는 IL-2와 IL-15 사이를 공유하고, 이러한 사이토카인의 신호전달에 필수적이다 (참조: Giri 등, EMBO J. 13: 2822-30 (1994) 및 Giri 등, EMBO J. 14: 3654-3663 (1995)).

[0008] IL-2/IL-15 β γ c 수용체 복합체의 공유와 일치하여, IL-15는 시험관내에서 IL-2와 유사한 많은 기능을 매개하는 것으로 나타났다. 그들은 많은 생물학적 활성을 공유하고, T 림프구의 생존에 유사한 기여를 한다 (참조: Waldmann, 등, Annu Rev Immunol 17: 19-49 (1999)). IL-2와 IL-15 사이의 생물학적 차이는, 예를 들어, 그들의 상이한 생산 부위, 각각 IL-2 α 및 IL-15R α 라 칭명되는 막 수용체 단백질과의 그들의 결합 강도 및 이러한 여분의 수용체 분자의 조절에 기인하는 것으로 간주된다. IL-2 및 IL-15는 CD8+ 기억 세포의 수를 조절하는데 역할을 한다.

[0009] IL-15가, 예를 들어, 특정 바이러스성 장애 및 암성 상태를 포함하는 다수의 질환, 장애 및 상태에 관련되어 있다는 사실에도 불구하고, IL-15 - 관련 제제는 현재 시판되지 않는다. 따라서, 안전하고 효과적인 IL-15 제제는 지금까지 충족되지 않은 의학적 필요를 해결할 것이다.

[0010] **요약**

[0011] 본 발명은 IL-15 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 용어 "IL-15", "IL-15 폴리펩티드(들)", "IL-15-제제(들)", "IL-15 분자(들)" 등은 광범위하게 해석되도록 의도되고, 예를 들어, 상동체, 변이체 (뮤테인 포함) 및 이의 단편을 포함하는 인간 및 비인간 IL-15 - 관련 폴리펩티드 뿐만 아니라, 예를 들어, 리더 서열 (예: 신호 웨პ티드)를 갖는 IL-15 폴리펩티드를 포함한다. 특별한 구현에는 상기의 변형에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 변형(들)은 이의 웨პ티드의 비변형된 형태와 비교하여 적어도 하나의 특성 또는 다른 특성 (예: 반감기 또는 효능)을 개선시킨다. 특정 구현예에서, 다른 특성(들) (예: 반감기와 같은 약동학적 파라미터)이 강화되고, 적어도 및 일반적으로 치료적 관점에서 적어도, 일반적으로 더 유리한 변형된 IL-15 분자를 생성하는 한, 생체 활성의 감소를 초래한다.

[0012] 본 발명의 추가의 구현예는 본원에 기재된 방법에 따라서 변형될 수 있는 IL-15의 특정 아미노산 잔기 또는 도메인을 동정하기 위한 방법 및 다른 기술에 관한 것이다. 본원에 기재된 웨პ티드를 (예를 들어, 장애 또는 이의 증상을 치료 또는 예방하는데) 사용하고, 동정하고/하거나 생성하는 방법도 또한 본 발명의 국면이다. 다른 국면은, 예를 들어, 웨პ티드를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

[0013] 성숙한 인간 IL-15는 114개의 아미노산 단량체성 폴리펩티드이다. 두 개의 전사물이 보고되었고, 하나는 48개의 아미노산 신호 웨პ티드 (긴 신호 웨პ티드; LSP) (도1a; 서열번호: 1), 및 나머지는 21개의 아미노산 신호 웨პ티드 (짧은 신호 웨პ티드; SSP) (도1b; 서열번호: 2), 이를 둘 다는 동일한 성숙 단백질을 생성한다 (도1c; 서열번호: 3). 본원에 나타낸 바와 같이, 성숙한 인간 IL-15는 3개의 상이한 아미노산 세그먼트 (A/B 루프; B/C 턴; 및

C/D 루프)에 의해 연결된 4개의 나선 (A-D)을 포함하는 것으로 기재된다. 이러한 아미노산 세그먼트는 또한 나선간 접합부 또는 나선들간 접합부들로서 청명된다.

[0014] 돌연변이되고/되거나 변형될 수 있거나 될 수 없는 IL-15 나선들 및 나선들간 접합부들의 아미노산 잔기 및 영역은 이후 논의된다. 예로서, IL-15의 3차원 코어 내에 매립되거나 수용체 결합과 관련된 아미노산 잔기 및 영역은 일반적으로 변형의 후보가 아니다.

[0015] 본 발명은 적어도 하나의 아미노산 잔기에 PEG 또는 다른 잔기(예: 혈청 알부민)의 부착을 촉진시키는 치환을 포함하는 웨티드를 고려한다. 이러한 웨티드의 예는 이후 상세히 기재된다.

[0016] 본원에 기재된 IL-15 웨티드의 면역원성을 평가하기 위한 방법이 본원에 기재된다. 또 추가의 구현예에서, 변형된 웨티드는 적어도 하나의 특성(예: 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및 순환 시간을 포함하는 물리적 특성)을 개선시킨다. 이러한 특성은 이후 추가로 기재된다. 본 발명의 특별한 구현예에서, 돌연변이 IL-15 또는 변형된 IL-15 웨티드는 상응하는 비변형된 IL-15 웨티드보다 덜 면역원성이다(즉, 면역 반응을 덜 자극한다). 다른 구현예에서, 변형된 IL-15 웨티드는 상응하는 비변형된 IL-15 웨티드보다 면역원성 중성이다(즉, 면역원성은 치료적으로 관련되는 방식에서 변경되지 않는다).

[0017] 본 발명은 하기를 포함하는 웨티드를 고려한다: 하기 도의 아미노산 서열: 도1c (서열번호: 3), 이때, 상기 웨티드는 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 포함하고, 치환(들), 결실(들) 또는 첨가(들)는, 예를 들어, 용해도 또는 면역원성에 악영향을 미치지 않는다. 본 발명은 또한 서열번호: 3의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 웨티드를 고려하고, 이때 상기 웨티드는 a) 서열번호: 3의 웨티드와 비교하여 개선된 적어도 하나의 특성 (예: 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및 순환 시간을 포함하는 물리적 특성)을 갖고/갖거나 b) 서열번호: 3의 웨티드보다 더 면역원성이 아니고/아니거나 c) 서열번호: 3의 웨티드의 생체활성과 적어도 동일한 생체활성을 갖는다.

[0018] 상이한 방법론 (예: IL-15의 정확한 농도를 정량화하는 상이한 방법 및/또는 IL-15를 생성하는 상이한 방법)의 사용이 - 단백질 농도를 계산하는데 있어서의 차이에 기인하여 겉보기 활성 또는 실제 활성에서 다소 활성인 IL-15 제제를 유도할 수 있음이 당업자에게 자명할 것이다. 그들의 기술과 경험을 활용함으로써, 당업자는 IL-15 분자 대 hIL-15의 상대적 생체활성을 결정하는데 있어서 이들의 차이를 고려할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 IL-15 분자는 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 95, 적어도 100, 적어도 101, 적어도 102, 적어도 103, 적어도 104, 적어도 105, 적어도 106, 적어도 107, 적어도 108, 적어도 109, 적어도 110, 적어도 111, 적어도 112 또는 적어도 113개의 아미노산 잔기를 갖는다.

[0019] 일부 구현예에서, 상기한 웨티드의 아미노산 잔기 첨가(들), 결실(들) 또는 치환(들)은 웨티드의 분자 내 디설파이드 결합을 파괴하지 않는다. 그러나, 그러한 첨가(들), 결실(들) 또는 치환(들)이 가능하게는 하나 이상의 분자내 비공유 결합(예: 수소 결합)을 파괴할 수 있지만, 그러한 파괴는 단백질 기능에 대한 치료학적으로 관련된 효과를 갖지 않아야 한다는 것을 유의해야 한다. 본 발명의 교시에 따라서, 일부 특별한 구현예에서, 아미노산 치환은 보존적 치환일 수 있고, 다른 특별한 구현예에서 아미노산 치환은 비보존적 치환일 수 있다.

[0020] 특별한 구현예에서, 본 발명은 서열번호: 3의 생체활성과 적어도 동일한 생체활성을 갖는 웨티드를 고려한다. 생체활성은 케모카인 방출 검정, TNF α 생산 검정, CTL-2 세포 증식 검정, M07e 세포 증식 검정, 또는 T-세포 IFN γ 분비 검정을 포함하는 당해 분야에 공지된 임의의 방법으로 결정될 수 있다. T-세포 스크리닝은 CD4+ 세포, CD8+ 세포 또는 NK 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 숙련가는 이러한 검정에 친숙하고, 그들 다수에 대한 예시적 프로토콜이 본원에 기재된다. 마찬가지로, 웨티드의 면역원성은 T-세포 에피토프 또는 B-세포 에피토프 중 적어도 하나에 대한 스크리닝에 의한 예측을 포함하여 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 예측되거나 결정될 수 있다. 하나의 국면에서 면역원성은 인 실리코 시스템 및/또는 생체외 면역검정 시스템에 의해 예측된다.

[0021] 본 발명은 또한 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 웨티드를 고려하고, 이때 상기 웨티드는 표면 노출된 아미노산의 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 치환은 생체활성, 면역원성 및/또는 또 다른 특성 또는 특징에 악영향을 미치지 않는다. 특정 구현예에서, 이러한 웨티드는 또한 수용체 결합에 관련된 임의의 아미노산 잔기의 치환을 포함하지 않는다. 그러나, 허용될 수 있는 IL-15 수용체 결합 영역 내 또는 이에 근접한 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 결실 및/또는 첨가가 본 발명에 의해 고려된다는 것이 이해되어야 한다.

[0022] 본원의 다른 곳에서 상세히 기재되고 하기 도에 도시된 바와 같이: 도3, 성숙한 hIL-15는 a) 나선 A (아미노산

잔기 1-17); b) A/B 나선간 접합부 (A/B 루프) (아미노산 잔기 18-31); c) 나선 B (아미노산 잔기 32-53); d) B/C 나선간 접합부 (B/C 턴) (아미노산 잔기 54-57); e) 나선 C (아미노산 잔기 58-77); f) C/D 나선간 접합부 (C/D 루프) (아미노산 잔기 78-96); 및 g) 나선 D (아미노산 잔기 97-114)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 a) 나선 A; b) A/B 나선간 접합부; c) 나선 B; d) B/C 나선간 접합부; e) 나선 C; f) C/D 나선간 접합부; 및 g) 나선간 D를 포함하는 웹티드를 고려하고, 여기서 이러한 웹티드는 하기 중의 적어도 하나를 추가로 포함한다: i) 아미노산 잔기 2 (W), 4-12 (NVISDLKKI; 서열번호: 37)), 또는 16 (I) 이외의 나선 A의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 ii) 아미노산 잔기 30 (D) 또는 31 (V) 이외의 A/B 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 iii) 아미노산 잔기 32 (H), 35 (C), 40 (M), 42-44 (CFL), 47 (L) 또는 50 (I) 이외의 나선 B의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 iv) B/C 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 v) 아미노산 잔기 59 (I), 61-66 (DTVENL; 서열번호: 38), 또는 68-70 (ILA) 이외의 나선 C의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 vi) 아미노산 잔기 85 (C) 또는 88 (C) 이외의 C/D 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 vii) 99 (F), 100 (L), 103 (F), 또는 105-112 (HIVQMFIN; 서열번호: 39) 이외의 나선 D의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환.

[0023]

상기 단락에서 기재된 웹티드를 참조하면, 특별한 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 아미노산 치환이 다음 영역 중의 적어도 하나에 존재하는 웹티드를 고려한다: 13-15, 17-29, 36-39, 51-58, 71-84, 또는 89-98. 다른 구현예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 다음 영역 중의 적어도 하나에 존재한다: 17-28, 36-38, 51-57, 71-84, 또는 89-98. 추가의 구현예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 적어도 다음 위치 중의 하나에 존재한다: 1, 3, 13-15, 17-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 46, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 적어도 다음 위치 중의 하나에 존재한다: 1, 17-28, 36-38, 41, 45, 46, 48, 49, 51-57, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 113, 또는 114.

[0024]

체계적인 접근법을 사용하여, 상기 동정된 잔기는 PEG 및/또는 다른 변형을 위한 앵커를 제공할 수 있는 아미노산을 도입하기 위해 치환되었다. 본 발명의 특별한 구현예에서, 시스테인, 티로신 및 N-글리코실화 부위(N-X-S 및 N-X-T 모티프)는 이러한 치환을 위한 후보인 것으로 이미 동정된 잔기 각각으로 치환되었다. 이후 상세히 기재되고 도 6에 요약된 결과는 당업자에게 유리한 IL-15 뮤테인의 생성에 대한 특정 지침을 제공한다.

[0025]

본 발명의 특별한 구현예는 본원에 기재된 웹티드의 변형(들)을 고려하고, 이때 상기 변형(들)은 웹티드의 아미노산을 변경하지 않고(즉, 어떤 아미노산 치환, 첨가 또는 결실도 IL-15 1차 아미노산 서열에 도입되지 않는다), 상기 변형(들)은 웹티드의 비변형된 버전과 비교하여 적어도 하나의 특성 또는 다른 특징(예: 약동학적 파라미터 또는 효능)을 개선시키거나 달리는 향상시킨다.

[0026]

본 발명은 유리할 수 있는 임의의 변형의 도입을 고려한다. 따라서, 특별한 구현예에서, 변형은 웹티드의 적어도 하나의 물리적 특성(예: 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및 순환 시간)을 향상시킨다. 다른 변형은 수용체 절단을 차단하고 IL-15 수용체(들)에 대한 친화도를 증가시키는 (또는 IL-15 분자가 더 긴 지속 기간 동안 수용체(들)와 도킹되도록 오프 속도를 변형시키는) 수단을 도입함을 포함한다. 추가의 구현예에서, IL-15 웹티드의 변형은 치료적으로 관련되는 수준의 면역원성에 유해한 효과를 일으키지 않고, 또 추가의 구현예에서 변형된 IL-15는 비변형된 IL-15보다 덜 면역원성이다.

[0027]

일부 구현예에서, 변형은 폐길화이고, 변형된 웹티드는 PEG-IL-15이다. 폐길화 웹티드는 하기에 공유 결합된 적어도 하나의 PEG 분자를 포함할 수 있다: IL-15의 적어도 하나의 아미노산 잔기(예: N-말단 또는 C-말단 폐길화). PEG 분자는 링커를 통해 IL-15에 접합될 수 있고; 링커는 이후 상세히 기재된다. 일부 구현예에서, IL-15 상의 둘 이상의 상이한 부위는 하나 이상의 돌연변이를 도입한 다음 그들 각각을 변형시킴으로써 변형(예: 폐길화)될 수 있다. 추가의 구현예에서, N-말단은 하나 이상의 돌연변이의 도입, 및 IL-15 단백질 내의 다른 곳에서의 이의 변형(예: 폐길화)과 함께 변형(예: 폐길화)될 수 있다. 또 추가의 구현예에서, C-말단은 하나 이상의 돌연변이의 도입, 및 IL-15 단백질 내의 다른 곳에서의 이의 변형(예: 폐길화)과 함께 변형(예: 폐길화)될 수 있다. IL-15의 티로신 26은 N-말단의 폐길화와 함께 변형(예: 폐길화)될 수 있다. 추가의 구현예에서, IL-15 웹티드는 N-말단 및 C-말단에서 변형(예: 폐길화)을 포함할 수 있다. 예시적인 폐길화 조건은 본원에 기재되어 있다. 추가의 구현예에서, N-말단은 하나 이상의 돌연변이의 도입, 및 IL-15 단백질 내의 다른 곳에서의 이의 변형(예: 폐길화)과 함께 변형(예: 폐길화)될 수 있다. PEG 성분은 웹티드에 의해 내성인 임의의 PEG일 수 있다. IL-15의 비교적 작은 크기 때문에, PEG의 분자 질량은 많은 다른 단백질 치료제에 사용된 것보다 크다. 예로서, 변형된 웹티드의 PEG 성분은 일부 구현예에서 5kDa 내지 20kDa의 분자 질량을, 다른 구현예에서, 20kDa 초과의 분자 질량을, 특정 구현예에서 25kDa 초과의 분자 질량을, 또 다른 구현예에서 30kDa 초과의 분자 질량을, 추가의 구현예에서 35 kDa 초과의 분자 질량을, 또 다른 구현예에서 적어도 40kDa의 분자 질량을

갖는다. 특별한 구현예에서, PEG는 20 내지 40kDa의 분자 질량을 갖는다. 다른 분자 질량 값을 갖는 PEG가 본원에 기재되어 있다.

[0028] 본 발명은 비변형된 웨პ티드의 특성의 개선(예: 마스킹)을 포함하여 목적하는 특성을 부여하는 웨პ티드에 대한 임의의 변형을 고려한다. 일부 구현예에서, 변형된 웨პ티드는 하기를 포함한다: Fc 융합 단백질; 혈청 알부민(예: HSA 또는 BSA)(이는 HAS 융합 단백질 또는 알부민 접합체의 형태로 존재할 수 있다); 또는 알부민 결합 도메인. 변형된 웨პ티드는 글리코실화되거나 해실화된다. 상기의 상세한 설명은 본 발명 내의 다른 곳에 기재된다.

[0029] 특별한 구현예에서, 변형은 부위-특이적이다. 추가의 구현예에서, 변형은 링커를 포함한다. 일부 변형된 IL-15 분자는 한 형태 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형의 형태 및 이러한 변형을 본원에 기재된 IL-15에 도입하는 방법은 제한적이지 않고, 숙련가는 다른 그러한 변형 및 방법을 예상할 수 있다.

[0030] 본원에 기재된 웨პ티드는 재조합적으로 생성될 수 있다. 본 발명은 웨პ티드를 코딩하는 핵산 분자를 고려하고, 이 때 상기 핵산 분자는 웨პ티드를 시험관내, 세포내 또는 생체내에서 코딩하는 핵산의 발현을 부여하는 발현 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 벡터(예: 바이러스 벡터)는 이러한 핵산 분자를 포함할 수 있다. 추가의 구현예는 본원에 기재된 웨პ티드를 발현시키는 형질전환된 또는 숙주 세포를 수반한다.

[0031] 본 발명은 또한 본원의 교시와 함께 유전자 요법의 사용을 고려한다. 유전자 요법 사용 및 방법의 경우, 대상체의 세포는 생체내에서 본원에 개시된 IL-15-관련 폴리웨პ티드를 코딩하는 핵산으로 형질전환될 수 있다. 대안적으로, 세포는 시험관내에서 이식 유전자 또는 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 다음, 치료를 수행하기 위해 대상체의 조직 내로 이식될 수 있다. 또한, 1차 세포 단리를 또는 확립된 세포주는 IL-15 - 관련 폴리웨პ티드를 코딩하는 이식 유전자 또는 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 다음, 임의로 대상체의 조직으로 이식될 수 있다.

[0032] 본 발명의 웨პ티드는 본원에 기재된 바와 같이 적어도 하나의 돌연변이를 도입시킴으로써 생성된 적어도 하나의 독특한 에피토프를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 독특한 에피토프는 항체(예: 작용적 항체)에 (특이적으로 또는 비특이적으로) 결합한다. 추가의 구현예에서, 항체(예: 작용적 항체)의 효과는 IL-15 수용체를 통해 IL-15 활성화를 모방한다.

[0033] 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있고, 예를 들어, 인간 또는 인간화될 수 있다. 구현예는 별도의 폴리웨პ티드에 또는 단일 폴리웨პ티드에 존재하는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체, 또는, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 동위원소인 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 항체는, 예를 들어, Fv, scFv, Fab, F(ab')2, 또는 Fab' 항체일 수 있거나, 이는 (다량체화될 수 있는) 일본쇄 Fv (scFv) 항체일 수 있다.

[0034] 추가의 구현예에서, 본 발명의 항체는 약 10E7 M-1 내지 약 10E12 M-1의 친화도를 갖는 웨პ티드에 결합한다. 항체는 지질 잔기, 지방산 잔기, 다당류 잔기 및 탄수화물 잔기로부터 선택된 공유 결합된 잔기를 포함할 수 있다. 항체가 친화도 도메인을 포함하고, 고체 지지체 상에 고정될 수 있고, 공유 결합된 비웨პ티드 중합체(예: 폴리(에틸렌) 글리콜 중합체)를 포함하거나, 검출 가능하게 표지되는 구현예도 또한 고려된다.

[0035] 본 발명은 본원에 기재된 웨პ티드 또는 항체, 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 부형제는 등장성 주사 용액이다. 약제학적 조성물은 대상체(예: 인간)에게 투여하기에 적합할 수 있고, 하나 이상의 추가의 예방적 또는 치료적 제제를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 멸균 용기(예: 단일- 또는 다용도 바이알 또는 주사기)에 함유된다. 키트는 멸균 용기(들)를 함유할 수 있고, 키트는 또한 적어도 하나의 예방적 또는 치료적 제제 또는 약물학적 요법에 사용될 수 있는 임의의 다른 제제를 포함하는 하나 이상의 추가의 멸균 용기를 함유할 수 있다. 이러한 국면의 예는 본원에 기재된다.

[0036] 본 발명의 추가의 구현예는 본원에 기재된 웨პ티드의 치료적 유효량을 투여함을 포함하여, 대상체(예: 인간)의 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법을 포함한다. 추가의 구현예는 본원에 기재된 항체의 치료적 유효량을 투여함을 포함하여, 대상체의 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법을 포함한다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 질환, 장애 또는 상태는 암 또는 암 관련 장애(예: 고형 종양 또는 혈액학적 장애); 면역 또는 염증성 장애(예: 염증성 장 질환, 건선, 류마티스성 관절염, 유육종증, 다발성 경화증 및 알츠하이머병); 바이러스 장애(예: 인간 면역결핍 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 사이토메갈로 바이러스)를 포함하는 증식성 장애이다.

[0037] 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법에서, 본원에 기재된 웨პ티드 (또는 항체)의 치료적 유효량의 투여는 비경구 주사(예: 피하)를 포함하여 웨პ티드 (또는 항체)에 적합한 임의로 경로에 의해서일 수 있다. 하나

이상의 추가의 예방적 또는 치료적 제제는 웨프티드(또는 항체)와 함께(예: 이전에, 동시에 또는 이후에) 투여될 수 있고/있거나, 이는 웨프티드(또는 항체)와 개별적으로 투여되거나 배합될 수 있다.

[0038] 본 발명의 추가의 구현예는 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하고, 이때 웨프티드는 하기 위치 중의 하나에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다: 1, 3, 13-15, 17-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114. 구현예 중 일부에서, 웨프티드는 하기 위치에서 아미노산 잔기 중 적어도 하나에 대한 티로신의 치환을 포함한다: 1, 3, 13-15, 17-25, 27-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114. 다른 구현예에서, 웨프티드는 하기 위치에서 아미노산 잔기 중의 적어도 하나에 대한 시스테인의 치환을 포함한다: 1, 3, 13-15, 17-25, 27-29, 33, 34, 36-39, 45, 48, 49, 51-56, 58, 60, 67, 72-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113, 또는 114. 추가의 구현예에서, 웨프티드는 하기 위치에서 아미노산 잔기 중의 적어도 하나에 대한 N-X-S 글리코실화 모티프의 치환을 포함한다: 1, 13-15, 17-22, 27-29, 34, 36, 48, 49, 51-58, 60, 72-82, 84, 87, 89-98, 102, 또는 104, 이때 N-X-S 글리코실화 모티프의 아스파라긴은 아미노산 위치를 나타낸다. 또 추가의 구현예에서, 웨프티드는 하기 위치에서 아미노산 잔기 중의 적어도 하나에 대한 N-X-T 글리코실화 모티프의 치환을 포함한다: 1, 13-15, 17-22, 29, 34, 36, 48, 49, 51-58, 60, 71-78, 80-82, 84, 87, 89-98, 또는 102, 이때 N-X-T 글리코실화 모티프의 아스파라긴은 아미노산 위치를 나타낸다.

[0039] 본 발명은 본원에 개시된 구현예 모두의 성분으로서 사용되는 이전 단락에서 기재된 웨프티드를 고려한다. 예로서, 특별한 구현예에서, 본 발명은 이전 단락에서 기재된 웨프티드를 포함하는 약제학적 조성물, 멸균 용기 및 키트를 고려한다. 다른 구현예에서, 이전 단락에서 기재된 웨프티드의 치료적 유효량은 본원에 기재된 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0040] 본 발명의 다른 국면은 본원에 기재된 교시의 검토시 당업자에게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도1a는 IL-15 긴 신호 웨프티드(LSP) 단백질(162개의 아미노산 잔기; 서열번호: 1)을 도시한다. 신호 웨프티드(밑줄침)는 잔기 1-48을 포함한다.

[0043] 도1b는 IL-15 짧은 신호 웨프티드(SSP) 단백질(135개의 아미노산 잔기; 서열번호: 2)를 도시한다. 신호 웨프티드(밑줄침)는 잔기 1-21을 포함한다.

[0044] 도1c는 성숙한 인간 IL-15 단백질(114개의 아미노산 잔기) (서열번호: 3)을 도시한다.

[0045] 도2a는 긴 신호 웨프티드(LSP) cDNA 개방 판독 프레임(ORF)(162개의 아미노산 잔기를 코딩하는 489 염기쌍(서열번호: 4))을 도시한다. 신호 웨프티드(밑줄침)는 제1의 48개의 아미노산을 코딩하는 염기쌍 1-144를 포함한다.

[0046] 도2b는 짧은 신호 웨프티드(SSP) cDNA 개방 판독 프레임(ORF)(135개의 아미노산 잔기를 코딩하는 408 염기쌍(서열번호: 5))을 도시한다. 신호 웨프티드(밑줄침)는 제1의 21개의 아미노산을 코딩하는 염기쌍 1-63을 포함한다.

[0047] 도2c는 다음을 코딩하는 핵산 서열을 묘사한다: 성숙한 인간 IL-15 단백질(114개의 아미노산 잔기를 코딩하는 345 염기쌍(서열 번호: 6)).

[0048] 도3은 나선들 A-D 및 나선들간 접합부에 상응하는 영역을 나타내는 성숙한 인간 IL-15개의 아미노산 서열(서열번호: 3)을 도시한다.

[0049] 도4a는 IL-15 수용체 신호전달 복합체(PDB 4GS7)의 단백질 결정 구조 리본 대표도의 상부도이다: IL2/15R β , IL15R α , 통상의 γ -쇄, 및 IL-15(나선들 및 나선간 특징이 표지된다).

[0050] 도4b는 IL-15 수용체 신호전달 복합체(PDB 4GS7)의 단백질 결정 구조 리본 대표도의 측면도이다: IL2/15R β , IL15R α , 통상의 γ -쇄, 및 IL-15(나선들 및 나선간 특징이 표지된다).

[0051] 도5는 어떤 잔기가 폐길화를 위한 잠재적 부위를 나타내는지를 나타내는 성숙한 인간 IL-15개의 아미노산 서열(서열번호: 3)을 도시한다. "+"는 잔기가 잠재적 부위임을 나타내고, "-"는 잔기가 잠재적 부위가 아니다라는 것을 나타내고, "+/-"는 잔기가 잠재적 부위일 수 있음을 나타낸다.

[0052] 도6a 및 6b는 어떤 아미노산 잔기가 티로신 또는 시스테인에 의한 치환 또는 N-글리코실화 모티프(N-X-S 또는 N-X-T)의 생성에 의한 폐길화를 위한 잠재적 부위인지를 나타내는 성숙한 인간 IL-15개의 아미노산 서열(서열번호: 3)을 도시한다. 밝은 회색 세포가 잠재적인 폐길화 부위로서 도 5에 동정된 잔기를 나타내고, "+"는 그 위

치에 삽입된 돌연변이체가 활성 분석에서 활성이었음 나타내는 반면, 빈 밝은 회색 세포는 그 위치에 삽입된 돌연변이체가 활성을 나타내지 않거나 검출 가능한 수준으로 발현될 수 없음을 나타낸다.

[0053] 상세한 설명

본 발명이 추가로 기재되기 전에, 본 발명이 본원에 기재된 특별한 구현예에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 하고, 또한 본원에 사용된 용어는 특별한 구현예만을 기재하기 위한 것이며, 제한적이지는 않음이 이해되어야 한다.

값의 범위가 제공되는 경우, 맥락이 명백하게 다르게 나타내지 않는 한, 그 범위의 상한치 및 하한치와 그 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 중재 값 사이의 하한치의 단위의 10분의 1까지의 각 중재 값이 본 발명 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 보다 작은 범위의 상한치 및 하한치는 독립적으로 보다 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 그 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제한된 한계에 따라 본 발명에 포함된다. 언급된 범위가 한계치의 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 그 포함된 한계치 중의 하나 또는 둘 다를 제외하는 범위도 또한 본 발명에 포함된다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

본원 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 단수 형태 "a," "an," 및 "the"는 문맥이 명백하게 다르게 지시하지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것을 주시해야 한다. 특허청구범위는 임의의 선택적 요소를 배제하도록 초안될 수 있음을 추가로 유의해야 한다. 이와 같이, 이 진술은 특허청구범위 요소의 인용 또는 "부정적인" 제한의 사용과 관련하여 "단독", "유일한" 등과 같은 이러한 배타적인 용어의 사용을 위한 선행 기준으로서의 역할을 하기 위한 것이다.

본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 그들의 개시를 위해서만 제공된다. 추가로, 제공된 공개일은 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.

[0058] 개요

본 발명은 돌연변이체 IL-15 분자(예: 뮤테인) 및 다른 IL-15-관련 분자 뿐만 아니라 이들의 동정 방법 및 사용 방법을 고려한다. 본원에 기재된 바와 같이, IL-15 분자는, 예를 들어, 반감기 연장을 포함하여 천연인간 IL-15의 특성을 향상시키도록 변형될 수 있다. 변형은 폐길화 및 하기와의 융합을 포함한다: 알부민(예: HSA) 및 Fc. 특별한 IL-15 분자는 인간 IL-15에 필적할 만한 면역원성, 및/또는 적어도 인간 IL-15에 필적할 만한 생체활성 및/또는 적어도 하나의 특성(예: 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및 순환 시간을 포함하는 물리적 특성)의 개선을 갖는다. 숙련가는 이러한 분자가, 예를 들어, 매우 긴 반감기에 기인하여 가변적인 치료제일 수 있음을 인지할 것이다. 본원에 기재된 IL-15 분자 및 이의 조성물(예: 약제학적 조성물)은, 예를 들어, 염증성- 및 면역-관련 장애, 및 암 및 암-관련 장애를 포함하는 다양한 질환, 장애 및 상태 및/또는 이의 증상을 치료하고/하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드 및 핵산 분자와 관련된 "인간"에 대한 임의의 참조는 폴리펩티드 또는 핵산이 수득되는 방식 또는 공급원에 대해 제한하려는 것이 아니라 오히려 서열이 천연 발생 인간 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 서열에 상응할 수 있기 때문에 단지 서열에 관한 것임을 주의해야 한다. 그들을 코딩하는 인간 폴리펩티드 및 핵산 분자 이외에, 본 발명은 IL-15-관련 폴리펩티드 및 다른 종으로부터 상응하는 핵산 분자를 고려한다.

[0061] 정의

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

용어 "환자" 또는 "대상체"는 인간 또는 비인간 동물(예: 포유동물)을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

용어 "투여", "투여하다" 등은, 그들이, 예를 들어, 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에 적용될 때, 예를 들어, IL-15 또는 PEG-IL-15), 핵산(예: 천연 IL-15를 코딩하는 핵산), 상기를 포함하는 약제학적 조성물 또는 진단제의 상기 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에의 접촉을 의미한다. 세포의 맥락에서, 투여는 시약의 상기 세포에의 접촉(예: 시험관내 또는 생체외) 뿐만 아니라 시약의 유체에의 접촉을 포함하고, 여기서 유체는 세포에 접촉한다.

용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 등은 대상체를 괴롭히는 질환, 장애 또는 상태의 근본 원인 중의 적어도 하나 또는 대상체를 괴롭히는 질환, 장애 또는 상태의 증상 중의 적어도 하나를 일시적으로 또는 영구적으로 제

거하고, 감소시키고, 억제하고, 완화시키거나 개선시키기 위해 질환, 장애 또는 상태, 또는 이의 증상이 진단된 후 개시되고, 관찰된 등의 작용(예: IL-15 또는 IL-15를 포함하는 약제학적 조성물을 투여)의 과정을 의미한다. 따라서, 치료는 활성 질환을 억제함(예: 질환, 장애 또는 상태 또는 이와 관련되는 임상 증상의 발병 또는 추가 발병을 억제함)을 포함한다. 용어는 IL-15 또는 PEG-IL-15가, 예를 들어, 유체 상 또는 콜로이드 상 중의 IL-15 수용체와 접촉하는 상황과 같은 다른 맥락에서 사용될 수도 있다.

[0066] 본원에 사용된 용어 "치료가 필요한"은 대상체가 치료를 필요로 하거나 도움이 될 것으로 의사 또는 다른 간병인이 내리는 판단을 의미한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 인자를 기반으로 하여 내려진다.

[0067] 용어 "예방하다", "예방하는", "예방" 등은 일반적으로 특정 질환, 장애 또는 상태를 가질 성향이 있는 대상체의 맥락에서 질환, 장애, 상태 등(예를 들어, 임상 증상의 부재로 측정됨)을 발병시키거나 이의 발병을 지연시키는 대상체의 위험을 일시적으로 또는 영구적으로 예방하고, 억압하고, 억제하거나 감소시키는 방식으로(예: 질환, 장애 또는 상태 또는 이의 증상의 발병 전에) 개시된 작용의 과정(예: IL-15 또는 IL-15를 포함하는 약제학적 조성물의 투여)을 의미한다. 특정 예에서, 상기 용어는 또한 질환, 장애 또는 상태의 진행을 늦춤 또는 유해하거나 달리 바람직하지 않은 상태로의 이의 진행을 억제함을 의미한다.

[0068] 본원에 사용된 용어 "예방이 필요한"은 대상체가 예방적 치료를 필요로 하거나 이로부터 이익을 얻을 것이라는 의사 또는 다른 간병인에 의해 내려진 판단을 의미한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 요소를 기반으로 하여 내려진다.

[0069] "치료적 유효량"란 어구는 대상체에게 투여될 경우, 질환, 장애 또는 상태의 임의의 증상, 국면 또는 특징에 대한 임의의 검출 가능한 긍정적인 효과를 가질 수 있는 양으로 단독으로 또는 약제학적 조성물의 일부로서, 단일 용량 또는 일련의 용량의 일부로서 대상체에게 제제의 투여를 의미한다. 치료적 유효량은 관련 생리학적 효과를 측정함으로써 확인될 수 있으면, 이는 투여 섭생 및 대상체 상태의 진단 분석 등과 관련하여 조정될 수 있다. 예로서, 투여 후 생성된 염증성 사이토카인의 양의 측정은 치료적 유효량이 사용되었는지의 여부를 나타낼 수 있다.

[0070] "변화에 영향을 미치기에 충분한 양"란 어구는 특정 요법의 투여 전(예: 기준선수준) 및 투여 후 측정된 지시제의 수준 사이의 검출 가능한 차이가 존재함을 의미한다. 지시제는 임의의 객관적인 파라미터(예: IL-15의 혈청 농도) 또는 주관적인 파라미터(예: 대상체의 웰빙 느낌)를 포함한다.

[0071] 용어 "소분자"는 약 10kDa 미만, 약 2kDa 또는 약 1kDa 미만의 분자량을 갖는 화학적 화합물을 의미한다. 소분자는 무기 분자, 유기 분자, 무기 성분을 함유하는 유기 분자, 방사성 원자를 포함하는 분자, 및 합성 분자를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 치료적으로, 소분자는 세포에 보다 더 침투성일 수 있고, 분해에 덜 민감할 수 있고, 큰 분자보다 면역 반응을 발휘하기가 더 어려울 수 있다.

[0072] 용어 "리간드"는, 예를 들어, 수용체의 작용제 또는 길항제로서 작용할 수 있는 웹티드, 폴리웹티드, 막-관련 또는 막-결합 분자, 또는 이의 복합체를 의미한다. "리간드"는 천연 및 합성 리간드, 예를 들어, 사이토카인, 사이토카인 변이체, 유사체, 뮤테인, 및 항체로부터 유도된 결합 조성물 뿐만 아니라 사이토카인의 웹티드 모방체 및 항체의 웹티드 모방체를 포함한다. 상기 용어는 또한 작용제도 길항제도 아니지만, 이의 생물학적 특성, 예를 들어, 신호전달 또는 접착에 크게 영향을 미치지 않고 수용체에 결합할 수 있는 제제를 포함한다. 또한, 상기 용어는, 예를 들어, 화학적 또는 재조합 방법에 의해 막-결합 리간드의 가용성 버전으로 변화된 막-결합 리간드를 포함한다. 리간드 또는 수용체는 완전히 세포내 일 수 있고, 즉 이는 세포질, 핵 또는 일부 다른 세포내 구획에 존재할 수 있다. 리간드와 수용체의 복합체는 "리간드-수용체 복합체"로서 명명된다.

[0073] 용어 "억제제" 및 "길항제" 또는 "활성화제" 및 "작용제"는, 예를 들어, 각각, 예를 들어, 리간드, 수용체, 공동 인자, 유전자, 세포, 조직 또는 기관의 활성화를 위한 억제 또는 활성화 분자를 의미한다. 억제제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 감소시키고, 차단하고, 방지하고, 활성화 지연시키고, 불활성화시키고, 탈감각화하거나 하향 조절하는 분자이다. 활성화제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 증가시키고, 활성화시키고, 촉진시키고, 활성화 개선시키고, 민감하게 하거나 상향 조절하는 분자이다. 억제제는 또한 구성적 활성을 감소시키고, 차단하거나 불활성화시키는 분자로서 정의될 수 있다. "작용제"는 표적의 활성화의 증가를 일으키거나 촉진시키기 위해 표적과 상호작용하는 분자이다. "길항제"는 작용제의 작용(들)에 대항하는 분자이다. 길항제는 작용제의 활성을 방지하고, 감소시키고, 억제하거나 중화시키고, 길항제는 또한 동정된 작용제가 존재하지 않는 경우에도 표적, 예를 들어, 표적 수용체의 구성적 활성을 방

지하고, 억제하거나 감소시킬 수 있다.

[0074] 용어 "조절하다", "조절" 등은 IL-15 분자 (또는 그들을 코딩하는 핵산 분자)의 기능 또는 활성을 직접 또는 간접적으로 증가시키거나 감소시키는 분자(예: 활성화제 또는 억제제)의 능력 또는 IL-15 분자에 필적할 만한 효과를 생성하는 분자의 능력을 향상시킴을 의미한다. 용어 "조절제"는 광범위하게 상기한 활성에 영향을 미칠 수 있는 분자를 의미한다. 예로서, 예를 들어, 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 조절제는 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 활성을 변경하는 분자이고, 이때 활성은 이의 조절 특성에서 활성화되고, 억제되거나 변경될 수 있다. 조절제는 단독으로 작용할 수 있거나, 이는 공동인자, 예를 들어, 단백질, 금속 이온 또는 소분자를 사용할 수 있다. 용어 "조절제"는 IL-15와 동일한 작용 메커니즘을 통해 작동하는 제제(즉, 이와 유사한 방식으로 IL-15와 동일한 신호전달 경로를 조절하는 제제) 및 IL-15에 필적하고 (또는 이보다 더 큰) 생물학적 반응을 유발할 수 있는 제제를 포함한다.

[0075] 조절제의 예는 소분자 화합물 및 다른 생체유기 분자를 포함한다. 소분자 화합물의 다수의 라이브러리(예: 조합라이브러리)는 시판되고, 조절제를 동정하기 위한 출발점으로서 작용할 수 있다. 당업자는, 이러한 화합물 라이브러리가 목적하는 특성을 갖는 하나 이상의 화합물을 동정하기 위해 스크리닝될 수 있는 하나 이상의 검정(예: 생화학적 또는 세포 기반 검정)을 개발할 수 있고; 이후, 숙련된 의학 화학자는, 예를 들어, 이의 유사체 및 유도체를 합성하고 평가함으로써 그러한 하나 이상의 화합물을 최적화할 수 있다. 합성 및/또는 분자 모델링 연구는 또한 상기한 분자의 동정에 사용될 수 있다.

[0076] 분자의 "활성"은 리간드 또는 수용체에 대한 분자의 결합; 촉매적 활성; 유전자 발현 또는 세포 신호 전달, 분화 또는 성숙을 자극하는 능력; 항원성 활성; 다른 분자의 활성의 조절 등을 기재하거나 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 세포-대-세포 상호작용(예: 접착)을 조절하거나 유지하는데 있어서의 활성 또는 세포(예: 세포막)의 구조를 유지하는데 있어서의 활성을 의미할 수 있다. "활성"은 또한 하기를 의미할 수 있다: 특정 활성, 예를 들어, [촉매적 활성]/[mg 단백질], 또는 [면역학적 활성]/[mg 단백질], 생물학적 구획 중의 농도 등. 용어 "증식성 활성"은 암, 종양, 형성 장애, 세포 형질전환, 전이 및 혈관 신생 뿐만 아니라, 예를 들어, 정상 세포 분열을 촉진하거나, 즉 이를 위해 필요하거나 또는 특이적으로 이와 관련되는 활성을 포함한다.

[0077] 본원에 사용되는 "필적할 만한", "필적할 만한 활성", "에 필적할 만한 활성", "필적할 만한 효과", "에 필적할 만한 효과" 등은 정량적 및/또는 정성적으로 관찰될 수 있는 상대적인 용어이다. 상기 용어의 의미는 흔히 그들이 사용되는 맥락에 의존한다. 예로서, 모두 수용체를 활성화시키는 두 제제는 정성적인 관점에서 필적할 만한 효과를 갖는 것으로 볼 수 있지만, 두 제제는 하나의 제제가 당해 분야에서 허용되는 검정(예: 용량-반응 검정) 또는 당해 분야에서 허용되는 동물 모델에서 측정된 다른 제제의 활성의 20%만을 달성할 수 있는 경우 정량적인 관점에서 필적할 만한 효과가 결여된 것으로 볼 수 있다. 하나의 결과를 다른 결과(예: 참조 표준에 대한 하나의 결과)와 비교할 때, "필적할 만한"은 흔히 (항상은 아니지만) 하나의 결과가 참조 표준으로부터 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만으로 벗어나는 것을 의미한다. 특별한 구현예에서, 하나의 결과는, 그것이 참조 표준으로부터 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 벗어나는 경우, 참조 표준에 필적할 만하다. 예로서, 제한적이지는 않지만, 활성 또는 효과는 효능, 안정성, 용해도 또는 면역원성을 의미할 수 있다. 이미 기술된 바와 같이, 당업자는 상이한 방법론의 사용이 hIL-15 참조 표준보다 - 단백질 농도를 계산하는데 있어서의 차이에 기인하는 겉보기 활성 또는 실제 활성에서 - 다소 활성인 IL-15를 유도할 수 있음을 인식한다. 당업자는 IL-15 분자 대 hIL-15의 상대적인 생체활성을 결정하는데 있어서 이러한 차이를 고려할 수 있을 것이다.

[0078] 예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 유기체의 "반응"이라는 용어는 생화학적 또는 생리학적 거동, 예를 들어, 생물학적 구획 내의 농도, 밀도, 접착 또는 이동, 유전자 발현율, 또는 분화 상태의 변화를 포함하고, 이때 상기 변화는 활성화, 자극 또는 처리, 또는 유전적 프로그래밍과 같은 내부 메커니즘과 상관관계가 있다. 특정 맥락에서, 용어 "활성화", "자극" 등은 외부 또는 환경적 메커니즘 뿐만 아니라 내부 메커니즘에 의해 조절되는 세포 활성화를 의미하는 반면, 용어 "억제", "하향 조절" 등은 반대의 효과를 의미한다.

[0079] 본원에 상호교환적으로 사용된 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 유적적으로 코딩된 및 비유전적으로 코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 비화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산을 포함할 수 있는 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태 및 변형된 폴리펩티드 골격을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 용어는 이종 아미노산 서열을 융합 단백질, N-말단 메티오닌 잔기를 포함하거나 포함하지 않는, 이종 및 상동 리더 서열을 갖는 융합 단백질을 포함하는 융합 단백질; 면역학적으로 태깅된 단백질 등을 포함한다.

[0080] 본원에 사용된 용어 "변이체" 및 "동족체"는 각각 참조 아미노산 또는 핵산 서열과 유사한 아미노산 또는 DNA

서열을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 천연 발생 변이체 및 비천연 발생 변이체를 포함한다. 천연 발생 변이체는 동족체(하나의 종에서 다른 종으로 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 상이한 폴리펩티드 및 핵산), 및 대립유전자 변이체(한 종 내의 하나의 개체로부터 다른 개체로 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 상이한 폴리펩티드 및 핵산)을 포함한다. 따라서, 변이체 및 동족체는 천연 발생 DNA 서열 및 이에 의해 코딩되는 단백질 및 이들의 아이소폼 뿐만 아니라 단백질 또는 유전자의 스플라이스 변이체를 포함한다. 상기 용어는 또한 천연 발생 DNA 서열로부터 하나 이상의 염기가 변하지만, 유전 코드의 축퇴에 기인하여 천연 발생 단백질에 상응하는 아미노산 서열로 번역되는 핵산 서열을 포함한다. 비천연 발생 변이체 및 동족체는 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에서의 변화를 포함하는 폴리펩티드 및 핵산을 포함하고, 이때 서열의 변화는 인공적으로 도입되고(예: 뮤테인); 예를 들어, 상기 변화는 인간 중재("인간의 손")에 의해 실험실에서 생성된다. 따라서, 비천연 발생 변이체 및 동족체는 또한 하나 이상의 보존적 치환 및/또는 태그 및/또는 접합체에 의해 천연 발생 서열과 상이한 것들을 의미할 수 있다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "뮤테인"은 광범위하게 돌연변이된 재조합 단백질을 의미한다. 이러한 단백질은 일반적으로 단일 또는 다중 아미노산 치환을 수반하고, 부위-지시된 또는 랜덤 돌연변이 생성을 경험한 클로닝 유전자 또는 완전 합성 유전자로부터 유래된다. 다르게 지시되지 않는 한, "IL-15의 돌연변이체"와 같은 용어의 사용은 IL-15 뮤테인을 의미한다.

[0082] 용어 "DNA", "핵산", "핵산 분자", "폴리뉴클레오티드" 등은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 이의 유사체를 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예는 선형 및 환형 핵산, 메신저 RNA (mRNA), 상보성 DNA (cDNA), 재조합 폴리뉴클레오티드, 벡터, 프로브, 프라이머 등을 포함한다.

[0083] 본 명세서 전반에 걸쳐, 단일 문자 또는 3개 문자 코드에 따르는 아미노산이 참조된다는 것이 이해될 것이다. 리더의 편의상, 단일 및 3개 문자 아미노산 코드가 하기에 제공된다:

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

[0084] [0085] 천연 인간 IL-15 또는 IL-15 뮤테인을 참조하여 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변형된", "변형" 등은 인간 IL-15 또는 IL-15 뮤테인의 목적한 특성을 향상시키는 하나 이상의 변화를 의미한다. 이러한 목적하는 특성은, 예를 들어, 순환 반감기를 연장시키고, 안정성을 증가시키고, 클리어런스를 감소시키고, 면역원성 또는 알레르기원성을 변경하고, 검출 검정에 사용하기 위한 (예: 독특한 애피토프의 도입에 의한) 특정 항체의 상승을 가능하게 하는 것을 포함한다. 이후 상세히 논의되는 바와 같이, 수행될 수 있는 인간 IL-15 또는 IL-15 뮤테인에 대한 변형은 하기를 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 폐길화 (폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 하나 이상의 분자 또는 이의 유도체의 공유 결합; 글리코실화(예: N-글리코실화), 폴리시알릴화 및 해실화; 알부민 융합; 예를 들어, 접합된 지방산쇄를 통한 알부민 결합(아실화); Fc-융합; 및 PEG 모방체와의 융합. 일부 구현예에서, 링커가 이러한 변형에 사용되고, 이후 기재된다.

[0086] 폴리펩티드의 구조의 맥락에서 사용된 바와 같이, "N-말단" (또는 "아미노 말단") 및 "C-말단" (또는 "카복실 말단")은 각각 폴리펩티드의 극단적인 아미노 및 카복실 말단을 의미하는 반면, 용어 "N-말단" 및 "C-말단"은 각각 N-말단 및 C-말단을 향한 폴리펩티드의 아미노산 서열 중의 상대적 위치를 의미하고, 각각 N-말단 및 C-말단에 잔기를 포함할 수 있다. "즉시 N-말단" 또는 "즉시 C-말단"은 제1 및 제2개의 아미노산 잔기가 공유 결합하여 인접한 아미노산 서열을 제공하는 제2개의 아미노산 잔기에 대한 제1개의 아미노산 잔기의 위치를 의미한다.

- [0087] 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열(예: IL-15 폴리펩티드"로부터 유래된" 아미노산 서열)의 맥락에서, "로부터 유래된"은 폴리펩티드 또는 핵산이 참조 폴리펩티드 또는 핵산(예: 천연 발생 IL-15 폴리펩티드 또는 IL-15-코딩 핵산)의 것을 기본으로 하는 서열을 갖는다는 것을 의미하고, 단백질 또는 핵산이 제조되는 공급원 또는 방법에 대해 제한적인 것으로 의미하지 않는다. 예로서, 용어 "로부터 유래된"은 참조 아미노산 또는 DNA 서열의 동종체 또는 변이체를 포함한다.
- [0088] 폴리펩티드의 맥락에서, 용어 "단리된"은 천연 발생되는 경우, 그것이 천연 발생하는 것과 상이한 환경에 있는 관심 있는 폴리펩티드를 의미한다. "단리된"은 실질적으로 관심 있는 폴리펩티드가 풍부하고/하거나 관심 있는 폴리펩티드가 부분적으로 또는 실질적으로 정제되는 샘플 내에 존재하는 폴리펩티드를 포함하는 것을 의미한다. 폴리펩티드가 천연 발생하지 않는 경우, "단리된"은 폴리펩티드가 그것이 합성 또는 재조합 수단에 의해 제조된 환경으로부터 분리되었음을 나타낸다.
- [0089] "풍부한"란 샘플이 비천연 조작되어(예: 과학자에 의해) 관심 있는 폴리펩티드가 a) 생물학적 샘플과 같은 출발 샘플(예: 폴리펩티드가 천연 발생하거나 그것이 투여 후에 존재하는 샘플) 중의 폴리펩티드의 농도보다 큰 농도(예: 적어도 3배 초과, 적어도 4배 초과, 적어도 8배 초과, 적어도 64배 초과 또는 그 이상) 또는 b) 폴리펩티드가 제조된 환경(예: 세균성 세포에서와 같이)에서보다 큰 농도로 존재함을 의미한다.
- [0090] "실질적으로 순수한"은 성분(예: 폴리펩티드)이 조성물의 총 함량의 약 50% 초과, 전형적으로 전체 폴리펩티드 함량의 약 60% 초과를 구성함을 나타낸다. 보다 전형적으로, "실질적으로 순수한"은 전체 조성물의 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 그 이상이 관심 있는 성분인 조성물을 의미한다. 일부의 경우에, 폴리펩티드는 조성물의 총 함량의 약 90% 초과, 또는 약 95% 초과를 구성할 것이다.
- [0091] 리간드/수용체, 항체/항원 또는 다른 결합 쌍을 지칭할 때, 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "선택적으로 결합 한다"는 단백질의 이중 집단 및 다른 생물제제 중에 단백질의 존재의 결정인자인 결합 반응을 나타낸다. 따라서, 지정된 조건하에, 특정 리간드는 특별한 수용체에 결합하고, 샘플 중에 존재하는 다른 단백질에 상당량으로 결합하지 않는다. 고려된 방법의 항체, 또는 항체의 항원 결합 부위로부터 유래된 결합 조성물은 임의의 다른 항체 또는 이로부터 유래된 결합 조성물과의 친화도보다 적어도 2배 초과, 적어도 10배 초과, 적어도 20배 초과 또는 적어도 100배 초과하는 친화도로 이의 항원 또는 이의 변이체 또는 뮤테인에 결합한다. 특별한 구현 예에서, 항체는 하기에 의해 결정된 바와 같이, 약 10^9 1/mol을 초과하는 친화도를 가질 것이다: 예를 들어, 스캐차드 분석(Scatchard analysis)(참조: Munsen, 등 1980 Analyt. Biochem. 107: 220-239).
- [0092] IL-15
- [0093] MGC9721로도 청명되는 IL-15는 염색체 4q31 상의 34 kb 영역에 의해 코딩된 12.8kDa 단량체 당단백질인 것으로 예측된다. IL-15는 4개의 α -나선 번들 계통에 속하고, 이의 다른 구성원은 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함한다. 인간 IL-15의 게놈 구조는 9개의 엑손(1-8 및 4A) 및 8개의 인트론을 함유한다. 인간 및 마우스는 유사한 인트론/엑손 구조를 공유한다. 성숙 단백질을 코딩하는 IL-15 유전자의 부분의 전반적인 인트론/엑손 구조는 IL-2 유전자 및 다른 4 α -나선 번들 사이토카인의 구조와 유사하다.
- [0094] 당업자는 IL-15 핵산 및 아미노산 서열이 다음에서 공개적으로 이용 가능하다는 것을 인식할 것이다: 유전자 데이터베이스(예: GenBank). 다음에 도시된 바와 같다: 도1c (서열번호: 3), 성숙한 인간 IL-15 단백질은 114개의 아미노산 잔기(12.8kDa)를 포함한다. 이. 콜리(E. coli)에서 생성된 재조합 인간 IL-15은 단일 비글리코실화 폴리펩티드 쇄(N-말단 메티오닌을 포함하는, 문자 질량 12.9 kD를 갖는 115개의 아미노산 잔기)이다. 두 개의 전사물이 보고되었고, 둘 다 동일한 성숙 단백질을 생산한다고 한다. 다음을 참조한다: 도1a (서열번호: 1), IL-15 긴 신호 웨პ티드(LSP) 단백질(수탁번호BC018149.2)은 48 잔기 신호 웨პ티드(밀줄침)를 포함하는 162개의 아미노산 잔기를 포함한다. 다음을 참조한다: 도1b (서열번호: 2), IL-15 짧은 신호 웨პ티드(SSP) 단백질(수탁번호 BC100962.1)은 21 잔기 신호 웨პ티드(밀줄침)를 포함하는 135개의 아미노산 잔기를 포함한다. LSP는 분비 단백질로서 기재되어 왔고, SSP는 세포 내에 잔류하는 것으로 기재되어 왔다.
- [0095] 도2a는 하기를 묘사한다: 긴 신호 웨პ티드(LSP) cDNA ORF(162개의 아미노산 잔기를 코딩하는 489 염기쌍(서열번호: 4))(수탁 번호 BC018149.2); 신호 웨პ티드(밀줄침)는 제1의 48개의 아미노산을 코딩하는 염기쌍 1-144를 포함한다. 도2b는 하기를 묘사한다: 짧은 신호 웨პ티드(SSP) cDNA ORF(135개의 아미노산 잔기를 코딩하는 408 염기쌍(서열번호: 5))(수탁 번호 BC100962.1); 신호 웨პ티드(밀줄침)는 제1의 21개의 아미노산을 코딩하는 염기쌍 1-63을 포함한다. 도2c는 다음을 코딩하는 핵산 서열을 묘사한다: 성숙한 인간 IL-15 단백질(114개의 아미노산 잔

기를 코딩하는 345 염기쌍(서열 번호: 6)).

[0096] 비인간 예시된 포유동물 IL-15 핵산 또는 아미노산 서열은, 예를 들어, 영장류, 개과, 고양이과, 돼지, 말, 소, 양, 설치류, 뮤린, 랙트, 햄스터 및 기니 피그로부터 유래될 수 있다. 예시적인 비인간 포유동물 IL-15 핵산 서열에 대한 수탁 번호는 U19843 (마카크); DQ021912 (마카크); AB000555 (마카크); NM_214390 (돼지); DQ152967 (양); NM_174090 (소); NM_008357 (뮤린); NM_013129 (랫트); DQ083522 (물소); XM_844053 (개); DQ157452 (토끼); 및 NM_001009207 (고양이)을 포함한다. 예시적인 비인간 포유동물 IL-15개의 아미노산 서열에 대한 수탁 번호는 AAB60398 (마카크); AAY45895 (마카크); NP_999555 (돼지); NP_776515 (소); AAY83832 (물소); ABB02300 (양); XP_849146 (개); NP_001009207 (고양이); NP_037261 (랫트); 및 NP_032383 (뮤린)을 포함한다. 인간 IL-15 ("hIL-15")와 비교한 성숙한 시노몰구스 원숭이 IL-15 ("cIL-15")의 동일성은 96%인 반면, 성숙한 마우스 IL-15 ("mIL-15")와 성숙한 hIL-15의 동일성은 75%이다.

[0097] 인간 IL-15는 위치 C42-C88 및 C35-C85에 두 개의 디설파이드 결합을 함유하고, 전자는 IL-2 내의 C-C와 상동성이다. N79와 N112에 두 개의 N-연결된 글리코실화 부위가 존재한다(사용된 분석 방법에 따라, N71은 세 번째 글리코실화 부위로 간주될 수 있다). 성숙한 IL-15 단백질은 아미노산 잔기 1 내지 15, 18 내지 57, 65 내지 78, 및 97 내지 114에서 강한 나선형 모멘트를 갖는 것으로 예측되어 이의 4 α-나선 번들 구조를 지지한다(참조: Fehniger, 등, Blood 97(1) (Jan 1, 2001)).

[0098] 이전에 나타낸 바와 같이, 연관성이 IL-15와 IL-2 사이에 존재한다. IL-15 및 IL-15R α 발현의 복잡한 조절 및 차별 패턴에 기초하여, 이 수용체/리간드 쌍의 중요한 생체내 기능은 IL-2 및 IL-2R α 의 기능과 상이하다. IL-15는 천연 킬러 (NK) 세포, NK-T 세포 및 장 상피내 림프구 발생 및 기능 동안의 이의 중요성을 포함하여 몇몇 핵심 비중복 역할을 나타낸다. IL-15가 하기에서 역할을 하는 것으로 보고된 바와 같이: 자가면역 과정(예: 류마티스성 관절염) 및 악성 종양(예: T-세포 백혈병), 정상 IL-15 기능의 파괴는 대상체의 부작용에 연루되어 있다.

[0099] 두 신호가 수용체 서브유닛 IL-2R β 및 일반적인 γ-쇄(γ(c))를 통해 발생하지만, IL-15 및 IL-2는 동일한 생물학적 기능 모두를 공유하지 않는다. IL-15-IL-15R α -IL-2R β -γ(c) 4차 복합체의 구조에서, IL-15는 IL-2-IL-2R α -IL-2R β -γ(c) 복합체의 구조와 닮은 헤테로다이머에서 IL-2R β 및 γ(c)에 결합한다. IL-15R α 는 IL-2R β 에 대한 IL-15의 친화도를 실질적으로 증가시키는 것으로 나타났고, 이는 또한 IL-15 트랜스-신호전달에 필요하다. IL-15 및 IL-2는 유사한 신호를 유도하고, IL-2R α 대 IL-15R α 의 특이성은 세포 반응성을 결정하는 것으로 나타났다. (참조: Ring 등, Nat. Immunol. 13(12): 1187-95 (Dec. 13, 2012)).

[0100] IL-15는 주로 막 결합 형태로 존재하지만, 이는 또한 가용성 막으로서 존재하고(참조: Jakobisiak, 등, Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109 (April 2011)), 이는 두 개의 별개의 신호전달 메커니즘과 관련된다. 주요 메커니즘은 막-결합된 복합체 IL-15/IL-15R α 에 의해 매개되는 트랜스-프리젠테이션이다. 이 신호전달 메커니즘에서, IL-15는 IL-15R α 수용체에 결합하고, 이어서 그들 세포 표면 상에 IL-15R β γ c 복합체를 갖는 주변 세포에 제시한다. 제2 메커니즘은 시스-프리젠테이션이고, 여기서 IL-15는 IL-15R α 에 의해 동일 세포 상의 15R β γ c 신호전달 복합체에 제시된다.

[0101] 1차 신호전달 메커니즘을 참조하면, IL-15R α 수용체에 IL-15의 결합 및 IL-15R β γ c 복합체를 포함하는 주위 세포에의 후속적인 프리젠테이션시, IL-15 β 서브유닛은 앤누스 키나제 1(Jak1)을 활성화시키고, γ c 서브유닛은 앤누스 키나제 2(Jak2)를 활성화시키고, 이는 전사 3 (STAT3) 및 STAT5의 신호 변환기 및 활성화제의 인산화 및 활성화를 유도한다. IL-15 및 IL-2는 수용체 서브유닛을 공유하기 때문에, 그들은 세포 증식 및 성숙을 유도하는, B-세포 림프종 (Bcl-2)의 유도; 미토겐 활성화 단백질 키나제(MAP) 경로, 및 림프구 활성화 단백질 티로신 키나제(Lck) 및 비장 티로신 키나제(Syk)의 인산화를 포함하는 유사한 다운스트림 효과를 갖는다(참조: Schluns, 등, Int J Biochem Cell Biol 37(8): 1567-71 (Aug 2005)).

[0102] 대조적으로, 비만 세포에서 IL-15R 신호전달 경로는 Jak1/3 및 STAT3/5 대신 Jak2 및 STAT5를 포함한다. STAT의 인산화는 전사 인자를 형성하고, 적합한 유전자의 전사를 활성화시킨다. IL-15R의 β 쇄는 Lck, Fyn 및 Lyn 키나제를 포함하는 Src 계통의 단백질 티로신 키나제를 모집하고 또한 활성화시킨다. β 쇄는 또한 포스파티딜 이노시톨 3-키나제(PI3K) 및 AKT 신호전달 경로를 활성화시키고, c-Fos, c-Jun, c-Myc 및 NF-κB를 포함하는 다양한 전사 인자의 발현을 유도한다(참조: Jakobisiak, 등, Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109 (April 2011)).

[0103] 이미 나타낸 바와 같이, 본 발명은 또한 본원의 교시와 함께 생체내, 시험관내 및 생체외 유전자 요법의 사용을

고려한다. 유전자 요법은 새로운 유전자를 도입하거나, 기존의 유전자의 추가의 카페를 도입하거나 현존하는 유전자의 기능을 손상시키거나 현존하는 비기능성 유전자를 회복시키기 위해 일반적으로 벡터로 포장된 유전 물질을 대상체 내의 내인성 세포로 전달함으로써 수행된다. 일단 세포 내부이면, 핵산은 세포 기계에 의해 발현되어 관심 있는 단백질의 생산을 유도한다. 본 발명의 맥락에서, 유전자 요법은 본원에 기재된 질환, 장애 또는 상태의 치료또는 예방하는데 사용하기 위한 IL-15 제제를 전달하기 위한 치료제로서 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이, 유전자 요법은 또한 대상체로부터 세포를 제거하고, 세포를 IL-15를 코딩하는 핵산 분자로 형질감염시키고, 세포를 대상체에 복귀시킴을 기재한다.

[0104] 상기에서 언급된 바와 같이, 유전자 요법 사용 및 방법에 있어서, 대상체의 세포는 본원에서 생체내에서 개시된 IL-15-관련 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 형질전환될 수 있다. 대안적으로, 세포는 시험관내에서 이식 유전자 또는 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 다음, 치료를 수행하기 위해 대상체의 조직 내로 이식될 수 있다. 또한, 1차 세포 단리를 또는 확립된 세포주는 IL-15 - 관련 폴리펩티드를 코딩하는 이식 유전자 또는 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 다음, 임의로 대상체의 조직으로 이식될 수 있다.

[0105] 폐길화 IL-15

[0106] 재조합 인간 IL-15의 유용성은 흔히, 예를 들면, 신장 클리어런스 또는 단백질 가수분해 분해에 기인할 수 있는 이의 비교적 짧은 반감기에 의해 제한된다. 결과적으로, 구조를 불리하게 파괴시키지 않고 따라서 활성에 대한 바람직하지 않은 영향을 미치지 않고 IL-15의 약물동력학적 프로파일을 개선시키기 위해 다양한 접근법이 탐구되었다. IL-15의 폐길화는, 예를 들어, CN102145178에 보고된 바와 같이, 특정 약물동력학적 파라미터(예: 혈청 반감기)의 개선을 유도한다. 그러나, CN102145178은 N-말단 폐길화에 중점을 둔다. IL-15 및 Fc를 포함하는 융합 분자는 또한 반감기를 향상시키는 것으로 보고되었다(참조: 예를 들어, CN200410067182).

[0107] 당업자에게 명백한 바와 같이, 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 하나 이상의 아미노산 잔기에 부착될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "폐길화 IL-15" 및 "PEG-IL-15"는 부착이 안정하도록 일반적으로 링커를 통해 IL-15 단백질의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유 결합된 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 갖는 IL-15 분자를 의미한다. 용어 "모노폐길화 IL-15" 및 "모노-PEG-IL-15"는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 일반적으로 링커를 통해 IL-15의 단일 아미노산 잔기에 공유 결합된다는 것을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 용어 "디폐길화 IL-15" 및 "디-PEG-IL-15"는 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 하나의 아미노산 잔기에 공유 결합되고, 또 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 상이한 아미노산 잔기에 공유 결합되는 IL-15 단백질을 기재하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자는 성숙한 IL-15의 N-말단 아미노산 잔기에 공유 결합될 수 있고, 또 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자는 C-말단 잔기에 공유 결합될 수 있다. 폴리에틸렌 분자가 둘 이상의 아미노산 잔기에 공유 결합된 단백질을 생성하는 것도 또한 가능하고, 당업자는 이러한 분자를 생산하기 위한 방법에 친숙하다.

[0108] 특별한 구현예에서, 본 발명에 사용된 PEG-IL-15는 1 내지 9개의 PEG 분자가 링커를 통해 N-말단에서 아미노산 잔기의 알파 아미노 그룹 또는 라신 잔기의 측쇄 상의 앱실론 아미노 그룹에 공유되는 모노-PEG-IL-15이다. 링커는 이후 추가로 기재된다. 일반적으로 폐길화가 일어나지 않는 성숙한 IL-15 내의 부위에서 폐길화를 수행하기 위해, IL-15 상의 하나 이상의 상이한 부위는 하나 이상의 돌연변이를 도입한 다음, 그들 각각을 변형(즉, 폐길화)시킴으로써 변형될 수 있다. 예시적인 폐길화 조건은 본원의 다른 곳에 기재된다.

[0109] 특별한 구현예에서, PEG 잔기의 평균 분자량은 약 5kDa 내지 약 50kDa이다. 예를 들어, PEG 잔기는 약 5kDa 초과, 10kDa 초과, 15kDa 초과, 20kDa 초과, 25kDa 초과, 30kDa 초과, 35kDa 초과, 40kDa 초과, 45kDa 또는 약 50kDa 초과의 분자 질량을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 분자 질량은 약 5kDa 내지 약 10kDa, 약 5kDa 내지 약 15kDa, 약 5kDa 내지 약 20kDa, 약 10kDa 내지 약 15kDa, 약 10kDa 내지 약 20kDa, 약 10kDa 내지 약 25kDa 또는 약 10kDa 내지 약 30kDa이다. 다른 구현예에서, 분자 질량은 약 15kDa 내지 약 20kDa, 약 15kDa 내지 약 25kDa, 약 15kDa 내지 약 30kDa, 약 15kDa 내지 약 35kDa, 약 15kDa 내지 약 40kDa 또는 약 15kDa 내지 약 45kDa이다.

[0110] IL-15의 크기 때문에, 20kDa 초과의 PEG(예: 20 내지 40kDa 범위)가 특별한 구현예에서 고려된다. 일부 구현예에서, 분자 질량은 약 20kDa 내지 약 25kDa, 약 20kDa 내지 약 30kDa, 약 20kDa 내지 약 35kDa, 약 20kDa 내지 약 40kDa, 약 20kDa 내지 약 45kDa 또는 약 20kDa 내지 약 50kDa이다. 일부 추가의 구현예에서, 분자 질량은 약 25kDa 내지 약 30kDa, 약 25kDa 내지 약 35kDa, 약 25kDa 내지 약 40kDa, 약 25kDa 내지 약 45kDa 또는 약 25kDa 내지 약 50kDa이다. 또 다른 구현예에서, 분자 질량은 약 30kDa 내지 약 35kDa, 약 30kDa 내지 약 40kDa, 약 30kDa 내지 약 45kDa 또는 약 30kDa 내지 약 50kDa이다. 또 다른 구현예에서, 분자 질량은 약 35kDa이다.

내지 약 40kDa, 약 35kDa 내지 약 45kDa, 약 35kDa 내지 약 50kDa, 약 40kDa 내지 약 45kDa, 약 40kDa 내지 약 50kDa 또는 약 45kDa 내지 약 50kDa이다. 본 발명은 5kDa 중분으로 50kDa 초과의 분자 질량을 갖는 PEG를 고려한다(예: 55kDa, 60kDa, 65kDa 등).

[0111] 본 발명은 IL-15에 대한 PEG 부착의 특정 방법 또는 부위의 사용을 필요로 하지않지만, 폐길화가 IL-15 분자의 활성을 개선시키거나 변경하지 않거나 단지 명목상 감소시키는 것이 종종 유리하다. 특정 구현예에서, 반감기의 임의의 증가의 영향은 생물학적 활성의 임의의 감소의 영향보다 크다. PEG-IL-15의 생물학적 활성은 종종 하기의 수준을 평가함으로써 종종 측정된다: 염증성 사이토카인(예: IFN- γ), 세균성 항원(리포다당류(LPS))으로 도전되고, PEG-IL-15로 처리된 대상체의 혈청에서 생체활성을 측정하기 위한 다른 수단은 본원의 다른 곳에 기재된다.

IL-15 변이체

[0113] IL-15 변이체는 혈청 반감기를 증가시키고, IL-15에 대한 면역 반응을 감소시키고, 정제 또는 제조를 촉진시키고, 분해를 감소시키고, 치료적 효능을 개선시키고, 치료적 사용 동안 부작용의 심각성 또는 발생을 감소시킴을 포함하는 다양한 목적을 염두에 두고 제조할 수 있다. 아미노산 서열 변이체는 일반적으로 자연에서 발견되지 않는 소정의 변이체이지만, 일부는 번역 후 변이체, 예를 들어, 글리코실화 변이체일 수 있다. IL-15의 임의의 변이체는 적절한 수준의 IL-15 활성을 유지한다면 사용될 수 있다. IL-15 활성은 본원의 다른 곳에서 기재된다(예: T 세포 및 천연 킬러(NK) 세포 활성화 및 증식의 조절).

[0114] "보존적 아미노산 치환"란 어구는 단백질 중의 아미노산(들)을 유사한 산도, 염기도, 전하, 극성 또는 크기의 측쇄를 갖는 아미노산으로 치환함으로써 단백질의 활성을 보존하는 치환을 의미한다. 보존적 아미노산 치환은 일반적으로 다음 그룹 내의 아미노산 잔기의 치환을 수반한다: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; 및 6) D, E. 치환, 삽입 또는 결실에 대한 지침은 상이한 변이체 단백질 또는 상이한 종의 단백질의 아미노산 서열의 정렬에 기초할 수 있다. 따라서, 임의의 천연 발생 IL-15 폴리펩티드 이외에, 본 발명은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 통상적으로 20, 10 또는 5개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것을 고려하고, 이때 치환은 일반적으로 보존적 아미노산 치환이다. 하나 이상의 비천연 아미노산이 부위 특이적 접합을 촉진시키는 수단으로서 IL-15에 도입될 수 있다는 것을 유의해야 한다.

[0115] 본 발명은 또한 성숙한 IL-15로부터 유래된 인접한 아미노산 잔기를 함유하는 성숙한 IL-15의 활성 단편(예: 하위서열)을 고려한다. 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드 서열의 인접한 아미노산 잔기의 길이는 서열이 유래되는 특정 천연 발생 아미노산 서열에 의존한다. 일반적으로, 웨პ티드 및 폴리웨პ티드는 전장 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드까지 약 20개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산, 약 41개의 아미노산 내지 약 50개의 아미노산, 약 51개의 아미노산 내지 약 60개의 아미노산, 약 61개의 아미노산 내지 약 70개의 아미노산, 약 71개의 아미노산 내지 약 80개의 아미노산, 약 81개의 아미노산 내지 약 90개의 아미노산, 약 91개의 아미노산 내지 약 100개의 아미노산, 약 101개의 아미노산 내지 약 105개의 아미노산, 약 106개의 아미노산 내지 약 110개의 아미노산, 또는 약 111, 112 또는 113개의 아미노산일 수 있다.

[0116] 추가로, IL-15 폴리웨პ티드는 정의된 길이의 인접 아미노산(예: "비교 원도우")에 걸쳐 참조 서열과 비교하여 정의된 서열 동일성을 가질 수 있다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당해 기술 분야에 익히 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은, 예를 들어, 하기에 의해 수행될 수 있다: 하기 문헌의 국소 상동성 알고리즘: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), 하기 문헌의 상동성 정렬 알고리즘: Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), 하기 문헌의 유사성 방법의 검색: Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), 이러한 알고리즘(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.)의 컴퓨터화된 구현 또는 수동 정렬 및 육안 검사(참조: 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 등, eds. 1995 supplement)).

[0117] 예로서, 적합한 IL-15 폴리웨პ티드는 전장 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드까지 약 20개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산, 약 41개의 아미노산 내지 약 50개의 아미노산, 약 51개의 아미노산 내지 약 60개의 아미노산, 약 61개의 아미노산 내지 약 70개의 아미노산, 약 71개의 아미노산 내지 약 80개의 아미노산, 약 81개의 아미노산 내지 약 90개의 아미노산, 약 91개의 아미노산 내지 약 100개의 아미노산, 약 101개의 아미노산 내지 약 105개의 아미노산, 약 106개의 아미노산 내지 약 110개의 아미노산, 또는 약 111, 112, 또는 113개의 아미노산의 인접한 스트레치에 대해 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0118] 이하 추가로 논의된 바와 같이, IL-15 폴리펩티드는 천연 공급원(예: 이의 천연 발생 환경 이외의 환경)으로부터 단리될 수 있고, (예를 들어, 세균, 효모, 피키아, 곤충 세포 등과 같은 유전적으로 변형된 숙주 세포에서) 재조합 제조될 수도 있고, 여기서 유전적으로 변형된 숙주 세포는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 변형된다. IL-15 폴리펩티드는 또한 (예를 들어, 무세포 화학적 합성에 의해) 합성적으로 생성될 수 있다.
- [0119] 천연 발생 및 비천연 발생 아이소폼, 대립유전자 변이체 및 접합 변이체를 포함하여, IL-15 분자를 코딩하는 핵산 분자가 본 발명에 의해 고려된다. 본 발명은 또한 천연 발생 DNA 서열로부터 하나 이상의 염기가 변하지만, 유전자 코드의 축퇴에 기인하여 IL-15 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열로 변역되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0120] IL-15 뮤테인(예: 뮤테인) 및 변형된 IL-15 분자
- [0121] 본 발명은 IL-15의 돌연변이 생성 및 다른 변형을 통한 단백질 기능의 조작에 부분적으로 관련된다. 일부 구현 예에서, 본 발명은 (특정(들)이 비변형된 IL-15에 존재하지 않는 경우) 하나 이상의 유리한 특성이 IL-15에 첨가되고/되거나 (특정(들)이 최적량 미만임에도 불구하고, 비변형된 IL-15에 존재하는 경우) 개선되는 변형된 IL-15 분자를 고려한다. 이후 추가로 논의되는 바와 같이, 이러한 분자는, 예를 들어, 인간 IL-15에서 일련의 점 돌연변이의 생성을 포함하는 합리적인 약물 설계 접근법을 통해 동정되고 합성될 수 있다. 이러한 일련의 점 돌연변이는 일련의 구성원의 특성(예: 효능)의 성질 및 범위를 결정하기 위해 평가될 수 있다.
- [0122] 일부 구현예에서, 점 돌연변이는, 예를 들어, 변형된 IL-15 웨პ티드의 합성을 촉진시키기 위해 사용되고, 여기서 웨პ티드는 공유 또는 비공유 변형(예: 페길화, Fc-융합 및 HAS 융합)을 포함한다. 이어서, 변형된 웨პ티드의 체계적인 평가를 수행하여 변형이 a) 단백질 생체활성을 유지시키고; b) 특정 단백질 기능을 향상시키고; c) 나머지를 유지하면서 특정 IL-15 기능을 제거하거나; d) a) - c)의 일부 조합 동안 수행될 수 있는 IL-15 1차 아미노산 서열의 위치를 정의할 수 있다.
- [0123] 본원에서 고려되는 합리적인 약물 설계 접근법의 하나의 목표는 다른 속성들이 첨가되거나 증진되는 것을 허용하면서 생체활성에 대한 유해한 효과를 갖지 않고 변형될 수 있는 IL-15의 아미노산 잔기 및 영역의 동정이다. 이러한 합리적인 약물 설계 접근법의 또 다른 목표는 변형이 나머지를 유지시키거나 증진시키면서 특정 IL-15 기능을 선택성 제거하는데 사용될 수 있는 IL-15의 아미노산 잔기 및 영역을 정의하는 것이다. 따라서, 특정 구현예에서, IL-15 분자(예: 뮤테인) 또는 변형된 IL-15 분자는 하나이상의 상이한 역할을 강조하지 않으면서 IL-15의 하나 이상의 역할을 강조하고; 다른 것들에 영향을 미치지 않으면서(예: IL-15 활성의 정상 수준을 유지하면서) IL-15의 하나 이상의 역할을 강조하거나; 다른 것들에 영향을 미치지 않으면서 IL-15의 하나 이상의 역할을 강조하지 않는다. 특정 구현예에서, 변형(들)은 또 다른 특징(들)(예: 반감기와 같은 약물동태학적 파라미터)가 강화되어 치료적 관점에서 적어도, 일반적으로 더 유익한 변형된 IL-15 분자를 초래하는 한, 생체활성의 감소를 유도할 수 있다.
- [0124] 특별한 구현예에서, 본원에 기재된 변형(들)은 이의 웨პ티드의 비변형된 버전과 비교하여 웨პ티드의 적어도 하나의 특성 또는 다른 특징(예: 용해도)을 개선시킨다. 본 발명의 추가의 구현예는 본원에 기재된 방법에 따라서 변형될 수 있는 IL-15의 특정 아미노산 잔기 또는 도메인을 동정하기 위한 방법 및 다른 기술에 관한 것이다. 본원에 기재된 웨პ티드를 (예를 들어, 장애 또는 이의 증상을 치료하거나 예방하는데) 사용하고 동정하고/하거나 생성하는 방법도 또한 본 발명의 국면이다. 이러한 국면은 본원의 다른 곳에서 논의된다. 다른 국면은, 예를 들어, 웨პ티드를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0125] 특정 IL-15 기능적 도메인의 동정 및 IL-15 접합체의 특별한 형태의 생성이 기재되었지만, 문현은 본원에 기재된 IL-15 분자의 형태의 임의의 개시내용이 이들을 동정하고/하거나 생성하는 방법 및 이를 사용하는 방법과 함께 결여된다.
- [0126] 특별한 구현예에서, 본 발명은 인간 IL-15에서 일련의 점 돌연변이의 생성 및, 예를 들어, 포유동물 또는 세균성 시스템에서 돌연변이된 IL-15 단백질(예: 뮤테인)의 발현을 고려한다. 본 발명은 본원에 기재된 돌연변이 IL-15 분자와 양립가능한 임의의 발현 시스템의 사용을 고려한다. 포유동물 단백질 반현 시스템은 특별한 구현 예에서 고려되는 반면, 다른 구현예에서, 후보 단백질 발현 시스템은 하기로부터 유래된 것들을 포함한다: 세균(예: 이. 콜리(E. coli), 코리네박테리움(Corynebacterium), 피. 플루오레센스(P. fluorescens) 및 비. 서브틸리스(B. subtilis)), 효모(예: 에스. 세레비지에(S. cerevisiae)) 및 바콜로바이러스 감염된 곤충 세포. 세포 기반 또는 무세포 발현 시스템이 사용될 수 있다. 대부분 재조합 사이토카인은 세균 봉입체로 생성된 다음, 정제되고 리폴딩된다.

- [0127] 세균성 세포는 종종 전형적으로 단백질 리폴딩을 포함하는 방법인 사이토카인을 발현시키기 위해 사용된다. 그러나, 돌연변이된 단백질이 발현되는지의 여부를 결정하기 위해 포유동물 발현시스템을 초기에 사용하는 것이 유리할 수 있다. 포유동물 세포가 돌연변이된 단백질을 발현시킬 수 있는 경우, 단백질 폴딩이 돌연변이에 의해 방해받지 않을 것이다. 돌연변이 분자를 접고 분비하는 포유동물 세포주의 능력과 추가 평가를 위한 후보로서 그 분자의 생존력 사이에는 종종 밀접한 상관 관계가 있다. 반대로, 초기 발현이 세균에서 수행되고, 돌연변이된 단백질이 적절하게 리폴딩되지 않으면, 돌연변이가 파괴적이었는지 또는 단백질 리폴딩 프로토콜이 차선적이었는지의 여부가 명확하지 않을 것이다.
- [0128] 발현 시스템(예; 포유동물 세포주 기반 발현 시스템)에서 단백질 폴딩 및 분비를 상당히 파괴하지 않는 돌연변이 IL-15 분자는 추가의 평가를 위한 후보일 수 있다. 예를 들어, 이러한 돌연변이 IL-15 분자는 본원에 기재된 CTLR-2 세포 증식 검정을 포함하여 하나 이상의 생체내 또는 시험관내/생체외 검정에서 생체활성 분석을 가능하게 하기 위해 충분히 정제될 수 있다. 추가의 예로서, 이러한 돌연변이 IL-15 분자는 IL-15/IL-15 결합 파트너 친화도 측정을 제공하는 시험관내 검정으로 평가할 수 있다. 또한, 생체내 모델이 기재되었고, 본원에 기재된 IL-15 분자의 평가에 사용될 수 있다.
- [0129] 특별한 구현예에서, 돌연변이 IL-15 폴리펩티드 분자(예: 뮤테인)는, 예를 들어, 폐길화에 의해 변형된다. 이어서, 이러한 변형된 IL-15 분자는 단백질 기능에 대한 그들의 영향을 결정하기 위해 평가될 수 있다. 바람직한 특징(예: 단백질 기능에 대한 공칭 또는 비영향)을 나타내는 변형된 IL-15 분자는 추가의 변형(예: 더 크거나 분지된 PEG) 및 평가(예: 용해도)를 위한 후보일 수 있다. 폐길화 및 다른 형태의 변형이 본원의 다른 곳에서 상세하게 기재된다.
- [0130] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 시험관내, 생체외 또는 인 실리코 면역원성 검정에서와 같이, 면역원성을 결정하기 위한 하나 이상의 검정을 사용하는 돌연변이 IL-15 웨პ티드 및 변형된 IL-15 웨პ티드의 평가를 고려한다. 특히 유리한 특징(예: 인 실리코에서 측정된 바와 같은 면역원성의 증가 없이 향상된 효능)을 나타내는 변형된 IL-15 분자는 생체내 면역원성 분석 및/또는 생체내 셋팅 중의 추가의 분석을 포함하는 추가의 평가를 위한 후보일 수 있다. 특별한 구현예에서, 이러한 변형된 IL-15 분자는 상응하는 비변형된 IL-15 분자보다 더 면역원성이 아니다.
- [0131] IL-15 단편을 포함하는 다른 IL-15 분자; 이종 단백질과 복합체화된 IL-15 폴리펩티드를 포함하는 분자; 및 핵산 수준에서 하나 이상의 치료제(예: 항염증성 생물학적 제제)에 융합된 IL-15를 포함하는 IL-15 융합 단백질도 또한 본원에 포함된다. 이러한 분자는 본원에 기재된 접근법 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 접근법을 사용하여 변형될 수 있다.
- [0132] 본 발명의 합리적인 약물 설계 접근법은 다수의 공급원으로부터 결정학적 및 유사한 데이터를 이용할 수 있다. 예로서, IL-15R알파의 스시 도메인과의 복합체 중의 IL-15의 결정 구조가 기재되어 있다. Olsen, 등, J. Biol. Chem. 282(51): 37191-204 (Dec. 21 2007). 또한, 문헌(참조: Pettit, 등, J. Biol. Chem. 272: 2312-18 (1997))은 부위 특이적 돌연변이 생성, 폴리에틸렌 글리콜 접합 및 상동성 모델링을 사용하는 IL-15의 구조-기능 연구를 기재한다. 자체는 불충분하고 불완전하지만, 이러한 공급원에 기재된 정보 및 데이터는 변형될 수 있는 IL-15개의 아미노산 잔기 및 도메인의 동정에 사용된 성분을 나타낼 수 있다. 이러한 정보와 데이터를 활용한 결과, 돌연변이 IL-15 분자(예: 뮤테인) 및 변형된 돌연변이 IL-15 분자 (및, 일부 구현예에서, 변형된 천연 hIL-15)는 본원에 기재된 유리하고/하거나 바람직한 특징을 갖는 것으로 동정되었다.
- [0133] 본원에 기재되고 하기에 묘사된 바와 같이: 도3, 성숙한 hIL-15는 a) 나선 A (아미노산 잔기 1-17); b) A/B 나선간 접합부 (A/B 루프) (아미노산 잔기 18-31); c) 나선 B (아미노산 잔기 32-53); d) B/C 나선간 접합부 (B/C 털) (아미노산 잔기 54-57); e) 나선 C (아미노산 잔기 58-77); f) C/D 나선간 접합부 (C/D 루프) (아미노산 잔기 78-96); 및 g) 나선 D (아미노산 잔기 97-114)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 a) 나선 A; b) A/B 나선간 접합부; c) 나선 B; d) B/C 나선간 접합부; e) 나선 C; f) C/D 나선간 접합부; 및 g) 나선간 D를 포함하는 웨პ티드를 고려하고, 여기서 이러한 웨პ티드는 하기 중의 적어도 하나를 추가로 포함한다: i) 아미노산 잔기 2 (W), 4-12 (NVIISDLKKI; 서열번호: 37)), 또는 16 (I) 이외의 나선 A의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 ii) 아미노산 잔기 30 (D) 또는 31 (V) 이외의 A/B 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 iii) 아미노산 잔기 32 (H), 35 (C), 40 (M), 42-44 (CFL), 47 (L) 또는 50 (I) 이외의 나선 B의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 iv) B/C 나선간 접합부의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 v) 아미노산 잔기 59 (I), 61-66 (DTVENL; 서열번호: 38), 또는 68-70 (ILA) 이외의 나선 C의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 vi) 아미노산 잔기 85 (C) 또는 88 (C) 이외의 C/D 나선간 접합부의 적어도

하나의 아미노산 잔기의 치환; 또는 vii) 99 (F), 100 (L), 103 (F), 또는 105-112 (HIVQMFN; 서열번호: 39) 이외의 나선 D의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환. 이러한 영역의 경계는 하기에 제시된다: 도3.

[0134] 비록 하기에 나타낸 나선 및 나선간 접합부의 경계: 도3가 특정 영역을 정의하는 것으로 당해 분야에서 일반적으로 수용되지만, 당업자는 이러한 영역을 정의하는 특정 아미노산 잔기에 특정 편차가 존재할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 당업자는 본 발명을 실행할 때 이러한 편차를 고려할 수 있다.

[0135] IL-15 수용체 결합 및 신호전달의 메커니즘이 완전히 밝혀지지 않았지만, IL-15이 IL-15R α 와의 복합체로 기능한다는 것이 밝혀졌다. 이 복합체는 IL-15 신호전달을 수행하기 위해 IL-2/IL-15R β 및 γ c와 함께 작용한다. 도4a는 인간 IL-15의 단백질 결정 구조 리본 대표도(상부도)이고, 특정 나선들 및 나선들간 접합부들이 표시된다. 특정 IL-15 결합 파트너(예: IL-15R α)가 또한 도시된다. 도4b는 인간 IL-15의 단백질 결정 구조 리본 대표도(측면도)이고, 특정 나선들 및 나선들간 접합부들이 표시된다. 특정 IL-15 결합 파트너(예: IL-15R α)가 또한 도시된다.

[0136] 변형(예: 폐길화)에 대한 불량한 후보가 될 수 있는 아미노산 잔기는 하기를 포함한다: 변형에 접근하기 어려운 소수성 코어 영역 중의 잔기; 결합 계면(예: IL-15 베타/감마 수용체 결합에 관련된 잔기)과 접촉하거나 근접한 잔기; 및 (디설파이드 결합의 시스테인 폐길화가 정의된 폐길화 조건을 사용하여 달성되었지만) 시스테인 기반 폐길화 화학물질과 일반적으로 비반응성인 디설파이드 결합에 관련된 시스테인 잔기. 대조적으로, 잠재적(예: 폐길화)에 대한 우수한 후보일 수 있는 아미노산 잔기는 단백질-단백질 상호작용에 관련되지 않는 표면 노출된 잔기 또는 나선들간 접합부들을 형성하는 잔기를 포함한다. 주목할 것은 IL-15가 IL-15R α 에 의해 결합되지 않을 때 형태적으로 '플라스틱'인 것으로 관찰되었다(참조: Ring 등, Nat. Immunol. 13(12): 1187-95 (Dec. 13, 2012)).

[0137] 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단, 리신 잔기, 시스테인 잔기, 히스티딘 잔기, 아르기닌 잔기, 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기, 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 티로신 잔기 및 C-말단의 폐길화를 위한 화학물질이 현재 존재한다. 상기 나타낸 바와 같이, 본 발명은 또한 폐길화될 수 있는 비천연 아미노산 잔기의 도입을 고려한다. 그러나, 단지 이러한 아미노산 잔기의 일부가 부위 특이적 방식으로 통상적으로 폐길화될 수 있다. 다른 아미노산의 폐길화는 단지 복잡한 조건하에 부위 특이적 방식으로 수행될 수 있는 반면, 다른 아미노산(예: 글루탐산 및 세린 잔기)의 폐길화는 종종 너무 많은 위치 이성체를 유용하게 한다.

[0138] 아마도 폐길화에 순응하기 쉬운 성숙한 IL-15 내의 가능한 잔기(예: 히스티딘 및 트레오닌)의 평가는 다음과 같다: 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀진 N-말단; 폐길화에 가능한 유용한 부위인 것으로 밝혀진 C-말단; 리신 (K) - 7개의 잔기가 성숙한 IL-15에 존재하지만 어떤 것도 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀지지 않았고; 시스테인 (C) - 4개의 잔기가 성숙한 IL-15에 존재하지만, 어떤 것도 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀지지 않았고; 히스티딘 (H) - 4개의 잔기가 성숙한 IL-15에 존재하지만 어떤 것도 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀지지 않았고; 아스파르트산 (D) - 6개의 잔기가 성숙한 IL-15에 존재하지만 어떤 것도 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀지지 않았고; 글루탐산 (E) - 12개의 잔기가 성숙한 IL-15에 존재하지만 어떤 것도 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀지지 않았고; 세린 (S) - 13개의 잔기가 성숙한 IL-15에 존재하지만 어떤 것도 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀지지 않았고; 트레오닌 (T) - 6개의 잔기가 성숙한 IL-15에 존재하지만 어떤 것도 폐길화에 유용한 부위인 것으로 밝혀지지 않았다. 하나의 구현예에서, 성숙한 IL-15 중의 유일한 티로신 (Y) 잔기가 폐길화에 가능한 부위를 나타낸다.

[0139] 상기한 잔기 각각은 적합한 조건하에 폐길화에 순응할 수 있는 반면, 통상적인 관점으로부터 폐길화의 실제 후보인 다수의 잔기는 상기 나타낸 것들의 서브세트이다. 예로서, 현재 리신 기반 폐길화 전략은 위치 이성체의 생성 없이 (야생형 IL-15 분자 내의 7개의 리신 잔기로부터) 특정 리신(들)의 폐길화를 가능하게 하지 않는다. 이러한 위치 이성체는 종종 치료제에 불내성이다. 또한, 그들은 종종 제조 공정에 추가의 복합체들을 도입한다. 최종적으로, 특정 폐길화 전략은, 비표적 잔기들이 '표적' 잔기(들)와 유사한 결합또는 환 구조를 갖는 한, '비-표적' 잔기(들)의 폐길화를 유도할 것이다.

[0140] 본원에 제시된 교시에 따라서, 성숙한 IL-15의 114개 아미노산 잔기 중 돌연변이 생성 및 부위 특이적 화학물질의 조합을 통한 아미노산 잔기의 변형은 44개 잔기에 유용할 것으로 예측되지 않는다(참조: 도5). 이들 44개 잔기 중 4개는 디설파이드 결합에 관여할 것으로 보인다. 나머지 40개 잔기는 수용체 신호전달 복합체와 접촉하거나, 3차 IL-15 구조의 소수성 코어 영역 내에 매립되거나 이를 둘 다일 수 있다. IL-15/IL-2 수용체 신호전달복합체의 다양한 성분이 어떻게 상호작용하고 신호전달이 어떻게 수행되는지의 이해는 본 발명을 실행하기 위해 필요하지 않다. 그러나, 3개의 IL-15R 서브유닛(α , β 및 γ c) 중, 신호전달은 β 및 γ c 서브유닛에 대한 IL-

15의 결합을 포함한다. 상기와 같이, 일부 구현예에서, 본 발명은 IL-15R a에 결합하는 IL-15의 하나 이상의 아미노산 잔기의 폐길화를 고려하는데, 이는 이러한 폐길화가, 존재하는 경우, IL-15 신호전달에 대해 단지 명목상의 영향을 미쳐야 하기 때문이다. 반대로, 본원에 제시된 교시에 기초하여, 돌연변이 생성 및 부위 특이적 화학물질의 조합을 통한 아미노산 잔기의 변형은 표면 노출될 가능성이 있고 IL-15 수용체 복합체 또는 디설파이드 결합에 통합적으로 관련되지 않는 59개 잔기에 대해 실행 가능할 것으로 예측된다. 11개 잔기는 하기의 "+/-"로 나타낸 바와 같이 잠재적인 폐길화 부위(예: 수용체 결합에 관련된 하나의 잔기 및 수용체 결합에 관련되지 않은 또 다른 표면 노출된 잔기에 의해 인접된 잔기)일 가능성을 갖는 것으로 간주된다: 도 5. 사용된 방법론 및 다른 파라미터에 따라, 당업자는 잠재적인 폐길화 부위가 아닌 것으로 간주되는 하나 이상의 잔기, 잠재적인 폐길화 부위인 것으로 간주되는 하나 이상의 잔기 및/또는 가능하게는 잠재적인 폐길화 부위인 것으로 간주되는 하나 이상의 잔기가 상이한 부류에 속할 수 있다고 결론지을 수 있다(예: 가능하게 잠재적인 폐길화 부위인 잔기는 잠재적인 폐길화 부위인 것으로 결론지을 수 있다)는 것이 이해되어야 한다.

[0141] 상기 제시된 바와 같이, 59개 아미노산 잔기는 PEG에 대한 앵커로서 작용할 아미노산의 치환에 의해 잠재적으로 돌연변이를 허용하는 부위를 나타낸다. 이러한 59개의 가능한 부위 중, 일부 돌연변이체가 다양한 이유로 특정 위치에서 제거된다: 잔기 26 (Y)는 인간 IL-15가 이미 그 위치에 티로신을 함유하기 때문에 티로신으로 돌연변이 될 수 없고; 잔기 71 (N)은 이미 N-X-S N-글리코실화 모티프를 함유하므로, N-X-T 모티프만 도입될 수 있고; 잔기 79 (N)는 이미 N-X-T N-글리코실화 모티프를 함유하므로, N-X-S 모티프만 도입될 수 있고; 잔기 112 (N)는 이미 N-X-S N-글리코실화 모티프를 함유하므로, N-X-T 모티프만 도입될 수 있다. 잔기 113 (T) 및 114 (S)는 각각 두 번째 내지 마지막 및 마지막 잔기이고, 따라서, 3개의 아미노산 N-글리코실화 모티프는 첨가될 수 없다. 3개의 아미노산을 스패닝하는 N-글리코실화 부위를 위한 모티프(N-X-S 또는 N-X-T, 여기서 X ≠ P)로 인해, 때때로 N-글리코실화 돌연변이에 인접한 잔기(들)를 돌연변이시킬 필요가 있지만, 이러한 돌연변이는 N-글리코실화가 관심 있는 특정 잔기에서 발생하도록 설계되었다. 돌연변이체는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성되었고, 생물학적 활성을 결정하기 위해 CTLL-2 증식 검정으로 평가되었다.

[0142] 도 6은 특정 치환에 대한 CTLL-2 증식 데이터를 나타낸다. 데이터를 검토하면 몇몇의 일반적인 관찰을 생성한다. 첫째, 나선들 사이의 루프는 전형적으로 돌연변이시키기에 좋은 장소이다. 그러나, A/B 루프 내의 일부 잔기는 변형에 대한 불량한 후보이다. 둘째로, 시스테인 돌연변이체가 종종 매우 파괴적이지만, 잔기 6 (I) 및 70 (A)의 돌연변이만이 비활성이었다. 폐길화를 위한 부위로서 작용할 아미노산을 도입하기 위해 수행될 수 있는 정확한 치환에 관한 상세한 논의는 이하 제시된다. 그러나, 일부 생물학적 활성을 유지하면서 치환이 가장 용이한 몇몇 잔기는 다음과 같이 요약된다: a) 아미노산 잔기 1 (N)의 모두 4개의 치환 (즉, 티로신 (Y), 시스테인 (C), N-X-S, 및 N-X-T)은 활성 단백질을 수득하고, 표준 N-말단 폐길화 전략이 용이하게 사용될 수 있고; b) 아미노산 잔기 13 (E) 내지 15 (L)의 치환은 양호한 결과를 수득하고; c) 아미노산 잔기 17 (Q) 내지 23 (A)의 치환은 양호한 결과를 수득하고; d) 아미노산 잔기 48 (Q), 49 (V), 51 (S) 내지 58 (S), 및 60 (H)의 치환은 활성 단백질을 수득하고; e) 아미노산 잔기 71 (N) 내지 84 (G)는 이 13 잔기 스펜을 교차하는 두 돌연변이를 제외하고, 양호한 결과를 수득하고; f) 아미노산 잔기 89 (E) 내지 98 (E)의 치환은 양호한 결과를 수득하고; g) C-말단에서 아미노산 잔기 113 (T) 및 114 (S)는 양호한 결과를 수득하고, 표준 C-말단 폐길화 전략이 용이하게 사용될 수 있다.

[0143] 본 발명의 일부 구현예는 다음 영역 중의 적어도 하나에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 웹티드를 고려한다: 17-28, 36-38, 51-57, 71-84, 또는 89-98. 다른 구현예에서, 웹티드는 적어도 다음 위치 중의 하나에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다: 1, 17-28, 36-38, 41, 45, 46, 48, 49, 51-57, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 113 또는 114. 추가의 구현예에서, 웹티드는 적어도 다음 위치 중의 하나에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다: 1, 3, 13-15, 17-29, 33, 34, 36-39, 41, 45, 46, 48, 49, 51-58, 60, 67, 71-84, 86, 87, 89-98, 101, 102, 104, 113 또는 114.

생물학적 활성을 증명하는 돌연변이체의 동정

[0145] 본원에 기재된 방법론을 사용하여, 성숙한 인간 IL-15 단백질의 114개 아미노산 잔기 중 어떤 것이 PEG 잔기를 위한 앵커 부위를 형성하는데 도움이 되는 잔기로의 치환을 허용하는지를 결정하기 위해 평가를 수행하였다. 이 평가를 사용하여 동정된 잔기는 치환이 생체활성을 나타내는 돌연변이체(뮤테인)를 유도하는지를 결정하기 위해 추가로 분석하였다. 당업자는 시험관내 검정에서 활성인 모든 돌연변이체가 생체내 셋팅에서 활성을 갖는 것은 아니고, 그 역도 가능하다는 것을 인식할 것이다.

[0146] 상기 및 다음에 나타낸 바와 같이: 도5, 성숙한 인간 IL-15 폴리펩티드의 114개 잔기 중 44개 아미노산 잔기("-

"로서 나타냄)는 폐질화의 후보가 아니다. 이러한 44개 잔기 중의 4개는 디설파이드 결합을 형성하고(잔기 35 → 85 및 잔기 42 → 88), 따라서 돌연변이에 이용가능하지 않은 시스테인이다. 나머지 40개 잔기는 수용체 신호전달 복합체와 접촉하거나, 3차 IL-15 구조의 소수성 코어 영역 내에 매립되거나 이를 둘 다일 수 있다. 따라서, 70개 잔기(하기에서, 이중 59개는 "+"와 연관되고, 이중 11개는 "+/-"와 연관된다: 도5)는 PEG의 앵커로서 작용할 아미노산의 치환에 의한 돌연변이를 허용할 수 있는 부위를 나타낸다. 이어서, 이러한 잠재적인 부위에서 돌연변이는 본원에 기재된 CTLT-2 세포 증식 검정을 사용하여 평가하였다.

[0147] 평가 결과는 하기에 요약된다: 도6a-6b. 하기의 제1 열: 도6a-6b는 IL-15의 영역 각각에 대한 경계를 정의한다: a) 나선 A; b) A/B 루프(즉, A/B 나선간 접합부); c) 나선 B; d) B/C 턴(즉, B/C 나선간 접합부); e) 나선 C; f) CD 루프(즉, C/D 나선간 접합부); 및 g) 나선 D. 제2 열은 114 잔기 성숙한 IL-15 폴리펩티드의 각 아미노산 잔기를 나타낸다. 하기의 다음 4개 열: 도6은 각 잔기에 도입된 돌연변이의 형태에 관한 것이다: 시스테인, 티로신, 및 N-X-S 및 N-X-T N-글리코실화 모티프.

[0148] 하기의 음영을 참조하면: 도6a-6b, 이하 기재된 "x"를 갖는 짙은 회색 박스를 제외하고, 진한 회색 박스 내의 잔기는 PEG의 앵커로서 작용할 수 있는 아미노산의 도입을 위한 양호한 후보인 것으로 간주되지 않기 때문에 돌연변이되지 않고 분석의 일부도 아니었고; 상기 나타낸 바와 같이, 이러한 잔기는 수용체 신호전달 복합체와 접촉되거나, 3차 IL-15 구조의 소수성 코어 영역 내에 매립되거나 이를 둘 다일 수 있다. 그러나, 이러한 잔기의 일부는 N-글리코실화 부위를 도입하는 맥락에서 돌연변이되었음을 유의해야 한다. 밝은 회색 박스 중의 나머지 70개 잔기는 호모다이머 상에서 표면 노출될 가능성이 더 높고 수용체 결합을 방해할 가능성이 더 낮은 잔기를 나타낸다. 당업자가 하나 이상의 잔기가 상이하게 분류될 수 있다(즉, 짙은 회색 박스에 존재하는 잔기는 밝은 회색 박스에 배치될 수 있다)고 결론지을 수 있음이 이해되어야 한다.

[0149] 돌연변이체(예: 시스테인 또는 티로신)는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성되었고, 그들의 생물학적 활성을 실험 단락에 기재되고 소만 등(Soman 등)에 의해 기재된 것과 실질적으로 유사한 CTLT-2 세포 증식 검정으로 평가되었다(J Immunol Methods 348(1-2): 83-94 (2009 August 31)). 돌연변이체가 발현되고, 생물학적 활성을 나타낸 경우, "+"는 적용 가능한 박스에 배치되었다(예: 아미노산 잔기 41을 참조하면, 티로신 돌연변이체는 활성을 나타내는 반면, 시스테인 돌연변이체는 그렇지 않았다). 평가 목적으로, 임의 생물학적 활성의 측정은 "+" 신호의 할당을 초래했다. "+" 없는 밝은 회색 박스(즉, 블랭크 회색 박스) 중의 돌연변이체는 돌연변이체가 발현되지 않았거나 CTLT-2 검정에서 활성이 아니었음을 나타낸다.

[0150] 하기의 특별한 아미노산 잔기와 관련된 밝은 회색 컬럼 중의 일부에서: 도6a-6b, 일부 박스(밝은 회색)는 블랭크일 수 있거나 "+"를 함유할 수 있는 반면, 다른 박스는 짙은 회색이고 "x"를 함유한다. 이러한 경우, 짙은 회색 "x" 박스는 여러 가지 이유로 돌연변이될 수 없었다. 잔기 26 (Y)은 인간 IL-15가 그 위치에 티로신을 이미 함유하기 때문에 티로신으로 돌연변이될 수 없었다. 잔기 71 (N)의 경우, 단백질이 이미 N-X-S N-글리코실화 모티프를 함유하기 때문에 N-X-S N-글리코실화 모티프는 도입될 수 없었다. 잔기 79 (N)의 경우, 단백질이 이미 N-X-T N-글리코실화 모티프를 함유하기 때문에 N-X-T N-글리코실화 모티프는 도입될 수 없었다. 잔기 113 (T)의 경우, N-글리코실화 모티프가 3개의 아미노산 길이(N-X-S 또는 N-X-T)이기 때문에, N-글리코실화 부위는 단백질의 제2 내지 마지막 잔기에 도입될 수 없었다. 잔기 114 (S)의 경우, N-글리코실화 모티프가 3개의 아미노산 길이이기 때문에, N-글리코실화 부위는 단백질의 마지막 잔기에 도입될 수 없었다.

[0151] 하기에 도시된 교시를 감안하여: 도6a-6b 및 본원의 다른 곳에 기재된, 당업자는 하기를 인식할 것이다: 1) 돌연변이가 PEG 잔기를 고정시킬 목적으로 도입될 수 있는 70개의 잠재적 잔기가 존재한다(즉, 70개의 밝은 회색 컬럼이 있다). 2) 70개의 잠재적 잔기 중, 추가의 평가는, 잔기 46 (E)가 임의의 시험된 돌연변이를 갖는 활성 단백질을 생성하지 않았기 때문에, 69개의 잔기가 그들을 PEG 잔기를 고정시킬 실행 가능한 후보이도록 하는 특성을 포함했다는 것을 나타냈다. 3) 티로신은 69개 잔기 각각을 치환할 수 있고, 이미 티로신인 잔기 26을 제외하고 생체활성 단백질을 생성한다. 4) 시스테인은 69개 잔기 각각을 치환할 수 있고, 잔기 26 (Y), 41 (K), 57 (A) 및 71 (N)을 제외하고 생체활성 단백질을 생성한다. 5) N-X-S 글리코실화 모티프가 69개 잔기 각각에서 생성될 수 있고, 잔기 3 (V), 23 (A) to 26 (Y), 33 (P), 37 (V) to 39 (A), 41 (K), 45 (L), 67 (I), 83 (S), 86 (K) 및 101 (Q)를 제외하고 생체활성 단백질을 생성한다. 잔기 113 (T) 및 114 (S)는, 상기 나타낸 바와 같이, 그들이 천연 인간 IL-15의 마지막 두 잔기를 나타내기 때문에, 글리코실화 부위를 제공할 수 없다. 잔기 71 (N)은 이미 N-X-S 글리코실화 모티프의 아스파라гин을 나타낸다. 6) N-X-T 글리코실화 모티프는 잔기 3 (V), 23 (A) to 28 (E), 33 (P), 37 (V) to 39 (A), 41 (K), 45 (L), 67 (I), 83 (S), 86 (K), 101 (Q), 및 104 (V)를 제외하고 69개 잔기 각각에서 생성될 수 있다. 잔기 113 (T) 및 114 (S)는, 상기 나타낸 바와 같이, 그들이 천연 인간 IL-15의 마지막 두 잔기를 나타내기 때문에, 글리코실화 부위를 제공할 수 없다. 잔기 79 (N)은 이미

N-X-T 글리코실화 모티프의 아스파라긴을 나타낸다.

[0152] IL-15의 변형된 형태의 면역원성 고려

[0153] 대상체에서 체액성 (B-세포) 및/또는 세포 매개된 (T-세포) 면역 반응을 유도하는 항원의 능력인 면역원성은 '바람직한' 또는 '바람직하지 않은'로 분류될 수 있다. 바람직한 면역원성은 전형적으로 백신 주사에 의해 유발되는 병원체(예: 바이러스 또는 세균)에 대해 증가된 대상체의 면역 반응을 의미한다. 이러한 맥락에서, 면역 반응은 유리하다. 반대로, 바람직하지 않은 면역원성은 하기와 같은 항원에 대해 증가된 대상체의 면역 반응을 의미하고: 치료적 단백질(예: IL-15); 면역 반응은, 예를 들어, 치료적 단백질의 효과 또는 이의 약물동력학적 파라미터에 악영향을 미치고/미치거나 다른 부작용에 기여하는 항-약물-항체(ADA)를 초래할 수 있다. 이러한 맥락에서, 면역 반응은 불리하다.

[0154] 단백질 치료제에 대한 대상체의 면역 반응에 영향을 미치는 다수의 대상체 특이적 및 제품 특이적 인자가 존재한다. 대상체 특이적 인자는 대상체의 면역학적 상태 및 능력; 사전 감작/알레르기의 병력; 투여 경로; 용량 및 투여 빈도; 대상체의 유전 상태; 및 내인성 단백질에 대한 면역 내성의 대상체 상태를 포함한다. 면역원성에 영향을 미치는 제품-특이적 인자는 제품 기원(외래 또는 내인성); 제품의 1차 문자 구조/면역 후 변형, 3차 및 4차 구조 등; 제품 집합체의 존재; 접합/변형(예: 글리코실화 및 폐길화); 보조제 활성을 갖는 불순물; 제품의 면역 조절성; 및 제형화를 포함한다.

[0155] 자가 조직 또는 인간형 폴리펩티드 치료제는 일부 용도에서 놀랍게도 면역원성이고, 다른 분야에서는 놀랍게도 비면역원성인 것으로 입증되었다. 특별한 IL-15 뮤테인 및 IL-15의 다른 변형된 버전(예: 폐길화 IL-15 및 IL 및 IL-15 도메인)은 다양한 체액성 및 세포 매개된 면역 반응을 유발할 수 있다.

[0156] 본원에서 추가로 논의된 바와 같이, T-세포 에피토프 및/또는 B-세포 에피토프의 제거 또는 변형은 면역원성을 감소시킬 수 있다. 실제로, 특정 맥락에서, '마스킹제'(예: PEG)에 의한 하나 이상의 아미노산 잔기의 접합 및/또는 아미노산 잔기 자체에 대한 변화(예: 치환에 의해)는 그렇지 않으면 매우 면역원성 단백질의 면역원성을 극적으로 감소시킬 수 있다.

[0157] T-세포 에피토프. 이하 추가로 논의되는 바와 같이, 종종 2차 및 3차 단백질 구조에 의존하는 복잡한 3차원 B-세포 에피토프와 대조적으로, CD4+ T-세포 에피토프는 전형적으로 길이 약 11 내지 약 20개의 아미노산 잔기 범위의 선형 펩티드 서열이다. 임상적 면역원성 데이터가 존재하는 다양한 단백질의 비교 분석은 T 세포 에피토프의 존재 및 효능과 상응하는 단백질의 면역원성 사이의 강한 관계를 보여준다.

[0158] 인 실리코 스크리닝 도구는 포괄적인 T-세포 에피토프 평가의 초기 단계로서 자주 사용된다. 펩티드에 대한 헬퍼 CD4+ T-세포 반응의 유도는 MHC 부류 II에 대한 펩티드 결합을 필요로 한다. 이러한 펩티드 결합 데이터의 분석은 치료적 단백질의 개발 과정에서 이용될 수 있다. 예로서, Antitope Ltd (Cambridge, UK)는 34 MHC 부류 II 대립유전자에 대한 펩티드의 결합을 모델링하는 독점 인 실리코 문자 모델링 기술(iTope™)을 갖는다. 펩티드 결합에 대한 개별 아미노산 잔기의 기여도는 각 대립 유전자에 대해 측정될 수 있고, 이어서 이를 데이터는 T-세포 에피토프가 돌연변이되어 결합을 파괴하는 '탈면역화된' 서열 변이체의 설계에 사용될 수 있다.

[0159] 또한, T-세포 에피토프를 동정하기 위한 '면역정보학(immunoinformatics)' 알고리즘 및 다른 기술은 단백질 치료제를 고위험 및 저위험 카테고리로 분류하는데 사용될 수 있다. 예시하기 위해, 단백질 서열은 이후 대부분의 인간의 유전적 배경을 "커버하는" 8개의 공통 부류 II HLA 대립 유전자 각각에 대한 결합 가능성에 대해 평가되는 중복되는 9-mer 펩티드 프레임으로 파악될 있다. 단백질 내에서 높은 스코어 프레임의 밀도를 계산함으로써, 단백질의 전반적인 "면역원성 스코어"를 추정할 수 있다. 또한, 조밀하게 포장된 높은 스코어 프레임의 서브영역 또는 잠재적 면역원성의 "클러스터"가 동정될 수 있고, 클러스터 스코어가 계산되고 편집될 수 있다. 이어서, 면역원성의 다른 결정인자와 함께 단백질의 "면역원성 스코어"는 단백질이 면역 반응을 불법화할 가능성을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0160] 치료적 단백질의 면역원성을 감소시키는 추가의 수단이 사용될 수 있다. 기술(예: Antitope's proprietary EpiScreen™ 인간 생체외 T 세포 검정 시스템)이 단백질, 펩티드, 제형 등에 대한 헬퍼 CD4+ T-세포 반응을 결정하는데 사용될 수 있다. 이러한 기술의 사용으로부터 생성된 데이터는 출발 단백질의 서열 내에서 헬퍼 CD4+ T-세포 에피토프를 매핑하는데 사용될 수 있고, T-세포 에피토프는 이어서 다음 중의 하나 이상에 의해 단백질로부터 제거될 수 있다: 인간 MHC 부류 II에 대한 결합을 감소시키고/제거하기 위해 돌연변이의 설계; 펩티드/MHC 부류 II 복합체의 인식을 파괴하기 위한 T-세포 수용체 접촉 잔기의 표적화; 목적하는 단백질 활성을 유지하기 위해 중요한 아미노산 잔기의 표적화 및 치환을 가이드하기 위한 구조적 및 상동성 분석의 수행; 및 효능

에 기초하는 제거를 위한 T-세포 에피토프의 우선 순위 결정.

- [0161] B-세포 에피토프. B-세포 에피토프는 두 카테고리 중 하나에 배치될 수 있다. 제1 카테고리에서, 에피토프는 단백질의 특별한 영역의 1차 아미노산 서열에 의해 정의되고, 에피토프의 성분은 단백질 상에 순차적으로 위치한다. 이러한 선형 B-세포 에피토프는 일반적으로 길이 약 5 내지 약 20개의 아미노산 잔기 범위이다. 두 번째 카테고리에서, 에피토프는 단백질의 형태 구조에 의해 정의되고, 에피토프의 성분은 천연 단백질의 접힌 2차 또는 3차 구조에서 서로 근접하게 되는 단백질의 개별 부분에 위치한다. 대부분의 B-세포 에피토프는 단백질의 형태 구조를 기반으로 하기 때문에, B-세포에피토프는 (그들의 1차 아미노산 서열에 의해 결정되는) T-세포 에피토프 보다 동정하기가 더 어렵다.
- [0162] 이전에 사용된 서열 기반 B-세포 에피토프 예측인자의 예는 하기 문현에 기재된기술들을 포함한다: Saha S, 및 Raghava GP ("ABCPred technology") (Proteins (2006) 65: 40-48); Chen 등 (Amino Acids (2007) 33: 423-28); El-Manzalawy Y, 등 ("BCPred" technology) (J Mol Recognit (2008) 21: 243-55); Sweredoski MJ, and Baldi P ("COBEpro" technology) (Protein Eng Des Sel (2009) 22: 113-20); Wee LJ, 등 ("BayesB" technology) (BMC Genomics (2010) 11: S21); 및 Ansari HR, and Raghava GP ("CBTOPE" technology) (Immunome Res (2010) 6: 6).
- [0163] 서포트 벡터 머신 툴(Support vector machine Tool)을 사용하는 B-세포 에피토프 예측("BEST")은 유망한 새로운 B-세포 에피토프 기술이다(참조: Gao J, 등 (2012) PLoS ONE 7(6): e40104. doi: 10.1371/journal.pone.0040104). BEST 방법은 서포트 벡터 머신(SVM)에 의해 슬라이딩 20-mers로부터 생성된 평균 선택 스코어를 기반으로 하는 새로운 아키텍처를 사용하여 짧은 서열 단편으로부터만 예측하는 많은 이전 방법과 대조적으로 항원 서열로부터 에피토프를 예측한다. SVM 예측 인자는 쇄로부터 유래된 정보, 서열 보전, 공지된 (훈련) 에피토프와의 유사성, 및 예측된 2차 구조 및 상대적 용매 접근성을 결합함으로써 생성된 포괄적이고 맞춤 설계된 입력 세트를 이용한다. 또한, 몇몇 상업적 실체는 B-세포 에피토프를 평가하기 위한 독점 기술을 이용한다(예: ProImmune's B-cell ELISpot technology; ProImmune Ltd.; Oxford, UK).
- [0164] 면역원성을 평가할 목적으로, 일반적으로, 항원은 아니지만, 항원 특이적 B-세포반응을 유도하는 잠재적인 T-세포 에피토프에 초점을 맞추는 것이 유용하다.
- [0165] **IL-15의 생산 방법**
- [0166] 본 발명의 폴리펩티드는 비재조합(예; 화학적 합성) 및 재조합 방법을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0167] 화학적 합성
- [0168] 폴리펩티드가 화학적으로 합성되는 경우, 합성은 액체 상 또는 고체 상을 통해 진행될 수 있다. 고체 상 웨프티드 합성 (SPPS)은 비천연 아미노산의 도입 및/또는 웨프티드/단백질 골격 변형을 가능하게 한다. 다양한 형태의 SPPS, 예를 들어, 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc) 및 3급-부틸옥시카보닐(Boc)이 본 발명의 폴리펩티드를 합성하기 위해 이용 가능하다. 화학적 합성의 세부사항은 당해 분야에 공지되어 있다(예: Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6: 3-10; 및 Camarero J. A. 등, (2005) Protein Pept Lett. 12: 723-8).
- [0169] 고체 상 웨프티드 합성은 이후 기재되는 바와 같이 수행될 수 있다. 알파 작용기 ($\text{N}\alpha$) 및 임의의 반응성 측쇄는 산 불안정성 또는 염기 불안정성 그룹으로 보호된다. 보호 그룹은 아미드 결합을 연결시키기 위한 조건하에 안정하지만, 형성된 웨프티드 쇄를 손상시키지 않고 쉽게 절단될 수 있다. α -아미노 작용기에 적합한 보호 그룹은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: Boc, 벤질옥시카보닐 (Z), O-클로로벤질옥시카보닐, 바이-페닐이소프로필옥시카보닐, 3급-아밀옥시카보닐 (Amoc), α , α -디메틸-3,5-디메톡시-벤질옥시카보닐, o-니트로설페닐, 2-시아노-3급-부톡시-카보닐, Fmoc, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde) 등.
- [0170] 적합한 측쇄 보호 그룹은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 아세틸, 알릴 (Al1), 알릴옥시카보닐 (Alloc), 벤질 (Bz1), 벤질옥시카보닐 (Z), 3급-부틸옥시카보닐 (Boc), 벤질옥시메틸 (Bom), o-브로모벤질옥시카보닐, 3급-부틸 (tBu), 3급-부틸디메틸실릴, 2-클로로벤질, 2-클로로벤질옥시카보닐, 2,6-디클로로벤질, 사이클로헥실, 사이클로펜틸, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde), 이소프로필, 4-메톡시-2,3-6-트리메틸벤질설포닐 (Mtr), 2,3,5,7,8-펜타메틸크로만-6-설포닐 (Pmc), 피발릴, 테트라하이드로페란-2-일, 토실 (Tos), 2,4,6-트리메톡시벤질, 트리메틸실릴 및 트리틸 (Trt).
- [0171] 고체 상 합성에서, C-말단 아미노산은 적합한 지지체 재료에 결합된다. 적합한 지지체 재료는 합성 공정의 단계

별 축합 및 절단 반응을 위한 시약 및 반응 조건에 대해 불활성이고 사용되는 반응 매질에 용해되지 않는 것들이다. 시판되는 지지체 재료의 예는 반응성 그룹 및/또는 폴리에틸렌 글리콜로 변형된스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 클로로메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 하이드록시메틸화 또는 아미노메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체 등을 포함한다.

[0172] 웹티드산의 제조가 목적시 되는 경우, 4-벤질옥시벤질-알코올(Wang-앵커) 또는 2-클로로트리틸 클로라이드로 유도체화된 폴리스티렌 (1%)-디비닐벤젠 또는 TentaGel®이 사용될 수 있다. 웹티드 아미드의 경우, 5-(4'-아미노메틸)-3',5'-디메톡시페녹시)발레르산 (PAL-앵커) 또는 p-(2,4-디메톡시페닐-아미노 메틸)-페녹시 그룹 (Rink 아미드 앵커)으로 유도체화된 폴리스티렌 (1%) 디비닐벤젠 또는 TentaGel®이 사용될 수 있다.

[0173] 중합성 지지체에 대한 연결은 실온 또는 승온(예: 40 °C 내지 60 °C)에서, 다음의 반응 시간으로 에탄올, 아세토니트릴, N,N-디메틸포름아미드 (DMF), 디클로로메탄, 테트라하이드로푸란, N-메틸피롤리돈 또는 유사한 용매에 활성화 시약을 첨가하여 C-말단 Fmoc-보호된 아미노산을 지지체 재료와 반응시킴으로써 달성될 수 있다: 예를 들어, 2 내지 72시간.

[0174] PAL, Wang 또는 Rink 앵커에의 N_a-보호된 아미노산(예: Fmoc 아미노산)의 커플링은, 예를 들어, 1-하이드록시벤조트리아졸 또는 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸의 존재 또는 부재하에 커플링제, 예를 들어, N,N'-디사이클로헥실카보디이미드 (DCC), N,N'-디이소프로필카보디이미드 (DIC) 또는 다른 카보디이미드, 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TBTU) 또는 다른 우로늄 염, 0-아실-우레아, 벤조트리아졸-1-일-트리스-파롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP) 또는 다른 포스포늄 염, N-하이드록시석신이미드, 다른 N-하이드록시이미드 또는 옥심의 도움으로, 예를 들어, HOBt의 첨가하고, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민 (DIEA), 트리에틸아민 또는 N-메틸모르폴린, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민과 같은 염기를 첨가하거나 첨가하지 않고 TBTU의 도움으로 다음과 같은 반응 시간으로 수행될 수 있다: 2 내지 72시간(예: 3시간, 아미노산 및 커플링 시약의 1.5배 내지 3배 과량으로, 예를 들어, 2배 과량으로, 디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈 또는 디클로로메탄, 예를 들어, 디메틸포름아미드와 같은 용매 중에서 약 10 °C 내지 50 °C의 온도, 예를 들어, 25 °C에서).

[0175] 커플링 시약 대신에, 활성 에스테르(예: 펜타플루오로페닐, p-니트로페닐 등), N_a-Fmoc-아미노산의 대칭성 무수물, 이의 산 클로라이드 또는 산 플루오라이드를 상기한 조건하에 사용하는 것도 또한 가능하다.

[0176] N_a-보호된 아미노산(예: Fmoc 아미노산)은 DIEA를 첨가하고 다음의 반응 시간으로 디클로로메탄 중의 2-클로로트리틸 수지에 커플링될 수 있다: 10 내지 120분, 예를 들어, 20분, 그러나 이 용매 및 이 염기의 사용에 한정되지는 않는다.

[0177] 보호된 아미노산의 연속 커플링은 통상적인 방법에 따라서 웹티드 합성으로, 전형적으로 자동화 웹티드 합성화기에서 수행될 수 있다. 하기로 처리하여 고체 상에서 커플링된 아미노산의 N_a-Fmoc 보호 그룹을 절단후: 예를 들어, 디메틸포름아미드 중의 피페리딘(10% 내지 50%)으로 5 내지 20분 동안, 예를 들어, DMF 중의 50% 피페리딘으로 2 x 2분 및 DMF 중의 20% 피페리딘으로 1 x 15 분, 다음 보호된 아미노산을 3 내지 10배 과량으로, 예를 들어, 10배 과량으로 약 10 °C 내지 50 °C의 온도, 예를 들어, 25 °C에서 디클로로메탄, DMF 또는 둘의 혼합물과 같은 불활성, 비수성 극성 용매 중에서 이전 아미노산에 커플링된다. 제1의 N_a-Fmoc 아미노산의 PAL, Wang 또는 Rink 앵커에의 커플링을 위한 이전에 언급된 시약은 커플링 시약으로서 적합하다. 보호된 아미노산의 활성 에스테르, 또는 이의 클로라이드 또는 플루오라이드 또는 대칭성 무수물이 대안으로서 사용될 수도 있다.

[0178] 고체 상 합성의 종결시, 웹티드는 측쇄 보호 그룹을 동시에 절단하면서 지지체 재료로부터 절단된다. 절단은 하기를 첨가하면서 트리플루오로아세트산 또는 다른 강산성 매질로 수행될 수 있다: 5%-20% V/V의 스캐빈저, 예를 들어, 디메틸설플파이드, 에틸메틸설플파이드, 티오아니솔, 티오크레졸, m-크레졸, 아니솔 에탄디티올, 폐놀 또는 물, 예를 들어, 15% v/v 디메틸설플파이드/에탄디티올/m-크레졸 1: 1: 1, 0.5 내지 3시간 이내, 예를 들어, 2시간. 완전 보호된 측쇄를 갖는 웹티드는 2-클로로트리틸 앵커를 빙초산/트리플루오로에탄올/디클로로메탄 2: 2: 6으로 절단시킴으로써 수득된다. 보호된 웹티드는 실리카 겔 상에서 크로마토그래피로 정제될 수 있다. 웹티드가 Wang 앵커를 통해 고체 상에 연결되는 경우 및 C-말단 알킬아미드화로 웹티드를 수득하고자 하는 경우, 절단은 알킬아민 또는 플루오로알킬아민을 사용하는 아미노분해에 의해 수행될 수 있다. 아미노분해는 약 -10 °C 내지 50 °C의 온도(예: 약 25 °C) 및 약 12 내지 24의 반응 시간(예: 약 18시간)으로 수행된다. 또한, 웹티드는, 예를 들어, 메탄올을 사용하는 재에스테르화에 의해 지지체로부터 절단될 수 있다.

[0179] 수득된 산성 용액은 웹티드를 침전시키고 따라서 에테르에 잔류하는 스캐빈저와 절단된 보호 그룹을 분리하기 위

해 3 내지 20배량의 차거운 에테르 또는 n-헥산, 예를 들어, 10배 과량의 디에틸 에테르와 혼합할 수 있다. 추가의 정제는 웨პ티드를 빙초산으로부터 수회 재침전시킴으로써 수행될 수 있다. 수득된 침전을 물 또는 3급-부탄올 또는 두 용매의 혼합물, 예를 들어, 3급-부탄올/물의 1: 1 혼합물에 용해시키고, 동결 견조시킬 수 있다.

[0180] 수득된 웨პ티드는 다음을 포함하는 다양한 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다: 아세테이트 형태의 약염기성 수지를 통한 이온 교환; 하기 상의 소수성 흡착 크로마토그래피: 비유도체화 폴리스티렌/디비닐벤젠 공중합체(예: Amberlite® XAD); 실리카 젤 상의 흡착 크로마토그래피; 예를 들어, 카복시메틸셀룰로스 상의 이온 교환 크로마토그래피; 예를 들어, Sephadex® G-25 상의 분배 크로마토그래피; 역류 분배 크로마토그래피; 또는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 예를 들어, 옥틸 또는 옥타데실실릴실리카(ODS) 상의 역상 HPLC.

재조합 생산

[0182] IL-15 (예: 뮤린 및 인간 IL-15)는 본원에 기재된 것들과 같은 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하는 다수의 방식으로 합성될 수 있다. IL-15는 바이러스 기원일 수 있고, 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus)(BCRF1 단백질)로부터 바이러스 IL-15의 클로닝 및 발현은 다음 문헌에 개시되어 있다: Moore 등, (1990) Science 248: 1230. 또한, 재조합 IL-15는 하기로부터 시판된다: 다수의 공급원(예: Life Technologies, Grand Island, NY and BioLegend, San Diego, CA).

[0183] 부위 특이적 돌연변이 생성(또한, 부위 지시된 돌연변이 생성 및 올리고뉴클레오티드 지시된 돌연변이 생성으로도 칭명됨)은 개선되거나 바람직한 특성을 갖는 본 발명의 합리적으로 설계된 단백질(예: 특별한 IL-15 뮤테인 및 이의 도메인을 포함하는 IL-15의 다른 변형된 버전)을 생성하기 위해 DNA에서 특정 돌연변이를 생성하는데 사용될 수 있다. 부위 특이적 돌연변이 생성 기술은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 조기 부위 특이적 돌연변이 생성 방법(예: 쿤켈의 방법(Kunkel's method); 카세트 돌연변이 생성; PCR 부위 지시된 돌연변이 생성; 및 SPRINP를 포함하는 전체 플라스미드 돌연변이 생성)은 하기를 포함하는 다양한 생체내 방법과 같은 보다 정확하고 효율적인 방법으로 대체되었다: Delitto perfetto (참조: Storici F. and Resnick MA, (2006) Methods in Enzymology 409: 329-45); transplacement "pop-in pop-out"; PCR 및 하나의 재활용 가능한 마커를 사용하는 직접 유전자 결실 및 부위 특이적 돌연변이 생성; PCR 및 긴 상동성 영역을 사용하는 하나의 재활용 가능한 마커를 사용하는 직접 유전자 결실 및 부위 특이적 돌연변이 생성; 및 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하는 생체내 부위 지시된 돌연변이 생성(참조: 예를 들어, In Vitro Mutagenesis Protocols (Methods in Molecular Biology), 2nd Ed. ISBN 978-0896039100). 또한, 부위 특이적 돌연변이 생성을 수행하기 위한 도구는 시판된다(예: Stratagene Corp., La Jolla, CA).

[0184] 폴리웨პ티드가 재조합 기술을 사용하여 생산되는 경우, 폴리웨პ티드는 임의의 적합한 작제물 및 하기일 수 있는 임의의 적합한 숙주 세포를 사용하여 세포내 단백질 또는 분비된 단백질로서 생산될 수 있다: 원핵 또는 진핵 세포, 예를 들어, 세균(예: 이. 클리) 또는 효모 숙주 세포, 각각. 숙주 세포로서 사용될 수 있는 진핵 세포의 다른 예는 곤충 세포, 포유동물 세포, 및/또는 식물 세포를 포함한다. 포유동물 숙주 세포가 사용되는 경우, 그들은 하기를 포함할 수 있다: 인간 세포(예: HeLa, 293, H9 및 Jurkat 세포); 마우스 세포(예: NIH3T3, L 세포, 및 C127 세포); 영장류 세포(예: Cos 1, Cos 7 및 CV1); 및 햄스터 세포(예: 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포).

[0185] 폴리웨პ티드의 발현에 적합한 다양한 숙주-벡터 시스템은 당해 분야에 공지된 표준 절차에 따라 사용될 수 있다. 다음을 참조한다: 예를 들어, Sambrook 등, 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; 및 Ausubel 등 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons. 숙주 세포에 유전 재료를 도입하는 방법, 예를 들어, 형질전환, 전기천공, 접합, 인산칼슘 방법 등을 포함한다. 전달 방법은 도입된 폴리웨პ티드 코딩 핵산의 안정한 발현을 제공하도록 선택될 수 있다. 폴리웨პ티드 코딩 핵산은 유전되는 에피솜 요소(예: 플라스미드)로서 제공될 수 있거나 계놈적으로 통합될 수 있다. 관심 있는 폴리웨პ티드의 생산에 사용하기 위한 다양한 적합한 벡터는 시판된다.

[0186] 벡터는 숙주 세포에서 염색체외 유지를 제공할 수 있거나 숙주 세포 계놈으로의 통합을 제공할 수 있다. 발현 벡터는 전사 및 번역 조절 서열을 제공하고, 코딩 영역이 전사 개시 영역 및 전사 및 번역 종결 영역의 전사 조절 하에 작동적으로 연결되는 유도성 또는 구성적 발현을 제공할 수 있다. 일반적으로, 전사 및 번역 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 정지 서열, 번역 개시 및 정지 서열, 및 인핸서 또는 활성화제 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있고, 하기일 수 있다: 강한 구성적 프로모터(예: T7).

- [0187] 발현 작제물은 일반적으로 관심 있는 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 삽입을 제공하기 위해 프로모터 서열 근처에 위치하는 편리한 제한 부위를 갖는다. 발현 숙주에서 작동성인 선택 가능한 마커는 벡터를 함유하는 세포의 선택을 촉진시키기 위해 제공될 수 있다. 또한, 발현 작제물은 추가의 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 하나 또는 두 개의 복제 시스템을 가질 수 있고, 따라서 그것이 유기체, 예를 들어, 발현을 위한 포유동물 또는 곤충 세포 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 숙주에서 유지되도록 한다. 또한, 발현 작제물은 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하기 위해 선택 가능한 마커 유전자를 함유할 수 있다. 선택 가능한 유전자는 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 사용되는 숙주 세포에 따라 변할 것이다.
- [0188] 단백질의 단리 및 정제는 당해 분야에 공지된 방법에 따라서 달성될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 구성적으로 및/또는 유도시 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 용해물로부터 또는 일반적으로 샘플을 항-단백질 항체와 접촉시키는 단계, 비특이적으로 결합된 재료를 제거하기 위해 세척하는 단계 및 특이적으로 결합된 단백질을 용출시키는 단계를 포함하는 면역친화도 정제에 의해 합성 반응 혼합물로부터 단리될 수 있다. 단리된 단백질은 투석 및 단백질 정제에 통상적으로 사용되는 다른 방법에 의해 추가로 정제될 수 있다. 하나의 구현예에서, 단백질은 금속 킬레이트 크로마토그래피 방법을 사용하여 단리될 수 있다. 단백질은 단리를 촉진시키기 위한 변형을 함유할 수 있다.
- [0189] 폴리펩티드는 실질적으로 순수하거나 단리된 형태(예: 다른 폴리펩티드를 함유하지 않음)로 제조될 수 있다. 폴리펩티드는 존재할 수 있는 다른 성분(예: 다른 폴리펩티드 또는 다른 숙주 세포 성분)에 비해 폴리펩티드가 풍부한 조성물에 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제된 폴리펩티드는 폴리펩티드가 다른 발현 단백질이 실질적으로 함유되지 않는, 예를 들어, 약 90% 미만, 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만 또는 약 1% 미만인 조성물에 존재하도록 제공될 수 있다.
- [0190] IL-15 폴리펩티드는 IL-15 폴리펩티드를 코딩할 수 있는 작제물을 제공하기 위해 당해 기술 분야에 공지된 상이한 IL-15-관련 핵산을 조작하기 위한 재조합 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 특별한 아미노산 서열이 제공될 때, 당업자는, 예를 들어, 문자 생물학에서 그의 배경 및 경험의 견지에서 이러한 아미노산 서열을 코딩하는 다양한 상이한 핵산 문자를 인식할 것이라는 것이 이해될 것이다.
- [0191] **아미드 결합 치환**
- [0192] 일부의 경우에, IL-15는 펩티드 결합 이외의 하나 이상의 결합을 포함하고, 예를 들어, 적어도 두 개의 인접 아미노산은 아미드 결합 이외의 결합을 통해 결합된다. 예를 들어, 목적하지 않은 단백질 분해 또는 다른 분해 수단을 감소시키거나 제거하고/하거나 혈청 안정성을 증가시키고/시키거나 형태 가요성을 제한하거나 증가시키기 위해, IL-15의 골격 내의 하나 이상의 아미드 결합이 치환될 수 있다.
- [0193] 또 다른 예에서, IL-15 중의 하나 이상의 아미드 결합(-CO-NH-)은 아미드 결합의 등배전자체인 결합, 예를 들어, -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-(시스 및 트랜스), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- 또는 -CH₂SO-로 대체될 수 있다. IL-15 내의 하나 이상의 아미드 결합은 또한, 예를 들어, 환원된 등배전자체 슈도펩티드 결합에 의해 대체될 수 있다. 다음을 참조한다: Couder 등 (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41: 181-184. 이러한 대체 및 그들을 수행하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0194] **아미노산 치환**
- [0195] 하나 이상의 아미노산 치환이 IL-15 폴리펩티드에서 수행될 수 있다. 다음은 비제한적인 예이다:
- [0196] a) 알라닌, 류신이소류신, 발린, 노르류신, (S)-2-아미노부티르산, (S)-사이클로헥실알라닌 또는 측쇄, 사이클릭 및 직쇄 알킬, 알케닐 또는 알키닐 치환을 포함하는 C₁-C₁₀ 탄소로부터의 지방족 측쇄로 치환된 다른 간단한 알파-아미노산을 포함하는 알킬 치환된 소수성 아미노산의 치환;
- [0197] b) 상기 나열된 방향족 아미노산의 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 아자, 할로겐화(플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도) 또는 알콕시(C₁-C₄로부터)-치환된 형태를 포함하여 페닐알라닌, 트립토판, 티로신, 설포티로신, 비페닐알라닌, 1-나프틸알라닌, 2-나프틸알라닌, 2-벤조티에닐알라닌, 3-벤조티에닐알라닌, 히스티дин을 포함하는 방향족 치환된 소수성 아미노산의 치환, 이의 예시적 예는 하기와 같다: 2-, 3- 또는 4-아미노페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-클로로페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메틸페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메톡시페닐알라닌, 5-아미노-, 5-클로로-, 5-메틸- 또는 5-메톡시트립토판, 2'-, 3'- 또는 4'-아미노-, 2'-, 3'- 또는 4'-클로로-, 2-, 3 또는 4-비페닐알라닌, 2'-, 3'- 또는 4'-메틸-, 2-, 3- 또는 4-비페닐알라닌 및 2- 또는 3-페리딜알라닌;

- [0198] c) 치환체가 헤테로원자(예: 알파 질소, 또는 원위 질소 또는 질소들, 또는, 예를 들어, 프로-R 위치에서 알파 탄소 상에 존재하는지의 여부에 관계 없이 이전 아미노산의 알킬, 알케닐 또는 아릴 치환된(C₁-C₁₀ 측쇄, 칙쇄 또는 사이클릭으로부터) 유도체를 포함하여, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 오르니틴, 2,3-디아미노프로피온산, 호모아르기닌을 포함하는 염기성 측쇄를 함유하는 아미노산의 치환. 예시적인 예로서 작용하는 화합물은 하기를 포함한다: N-엡실론-이소프로필-리신, 3-(4-테트라하이드로페리딜)-글리신, 3-(4-테트라하이드로페리딜)-알라닌, N,N-감마,감마'-디에틸-호모아르기닌. 알킬 그룹이 알파-탄소의 프로-R 위치를 차지하는 알파-메틸-아르기닌, 알파-메틸-2,3-디아미노프로피온산, 알파-메틸-히스티딘, 알파-메틸-오르니틴과 같은 화합물도 또한 포함된다. 알킬, 방향족, 헤테로방향족(여기서, 헤테로방향족 그룹은 단독으로 또는 조합하여 하나 이상의 질소, 산소 또는 황 원자를 갖는다), 카복실산 또는 임의의 다수의 익히 공지된 활성화 유도체, 예를 들어, 산 클로라이드, 활성 에스테르, 활성 아졸리드 및 관련 유도체, 및 리신, 오르니틴 또는 2,3-디아미노프로피온산으로부터 형성된 아미드도 또한 포함된다;
- [0199] d) 아스파르트산, 글루탐산, 호모글루탐산, 티로신, 2,4-디아미노프로피온산의 알킬, 아릴, 아릴알킬, 및 헤테로아릴 셀酹아미드, 오르니틴 또는 리신 및 테트라졸 치환된 알킬 아미노산을 포함하는 산성 아미노산의 치환;
- [0200] e) 아스파라긴, 글루타민, 및 아스파라긴 또는 글루타민의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 측쇄 아미드 잔기의 치환; 및
- [0201] f) 세린, 트레오닌, 호모세린, 2,3-디아미노프로피온산, 및 세린 또는 트레오닌의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 하이드록실 함유 아미노산의 치환.
- [0202] 일부 경우에, IL-15는 아미노산의 하나 이상의 천연 발생되는 비유전적으로 코딩된 L-아미노산, 합성 L-아미노산, 또는 D-에난티오머를 포함한다. 일부 구현에에서, IL-15는 D-아미노산만을 포함한다. 예를 들어, IL-15 폴리펩티드는 하기 잔기 중의 하나 이상을 포함할 수 있다: 하이드록시프롤린, β-알라닌, o-아미노벤조산, m-아미노벤조산, p-아미노벤조산, m-아미노메틸벤조산, 2,3-디아미노프로피온산, α-아미노이소부티르산, N-메틸글리신 (사르코신), 오르니틴, 시트룰린, 3-급-부틸알라닌, 3-급-부틸글리신, N-메틸이소류신, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, 노르류신, 나프틸알라닌, 퍼리딜알라닌, 3-벤조티에닐 알라닌, 4-클로로페닐페닐알라닌, 2-플루오로페닐알라닌, 3-플루오로페닐알라닌, 4-플루오로페닐알라닌, 페니실라민, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, β-2-티에닐알라닌, 메티오닌 셀酹사이드, 호모아르기닌, N-아세틸 리신, 2,4-디아미노 부티르산, rho-아미노페닐알라닌, N-메틸발린, 호모시스테인, 호모세린, ε-아미노 헥산산, ω-아미노헥산산, ω-아미노헵탄산, ω-아미노옥탄산, ω-아미노데칸산, ω-아미노테트라데칸산, 사이클로헥실알라닌, α, γ-디아미노부티르산, α, β-디아미노프로피온산, δ-아미노 발레르산, 및 2,3-디아미노부티르산.
- [0203] 추가의 변형
- [0204] 시스테인 잔기 또는 시스테인 유사체는 디설파이드 결합을 통해 또 다른 웨პ티드에 대한 결합을 제공하거나 IL-15 폴리펩티드의 사이클릭화를 제공하기 위해 IL-15 폴리펩티드에 도입될 수 있다. 시스테인 또는 시스테인 유사체를 도입하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다 (참조: 예를 들어, U.S. 특허 제8,067,532호). 사이클릭화의 다른 수단은 옥심 링커 또는 란티오닌 링커의 도입을 포함하고; 다음을 참조한다: 예를 들어, U.S. 특허 제8,044,175호. 사이클릭화 결합을 형성할 수 있는 아미노산 (또는 비아미노산 잔기)의 임의의 조합이 사용될 수 있고/있거나 도입될 수 있다. 사이클릭화 결합은 브릿지의 도입을 가능하게 하는 작용성 그룹과 아미노산의 임의의 조합으로 (또는 아미노산 및 -(CH₂)_n-CO- 또는 -(CH₂)_n-C₆H₄-CO-으로) 생성될 수 있다. 일부 예는 디설파이드, 디설파이드 모방체, 엘르 들어, -(CH₂)_n- 카바 브릿지, 티오아세탈, 티오에티르 브릿지(시스타티오닌 또는 란티오닌) 및 에스테르 및 에테르를 함유하는 브릿지이다. 이러한 예에서, n은 임의의 정수일 수 있지만, 흔히 10 미만이다.
- [0205] 다른 변형은, 예를 들면, N-알킬 (또는 아릴) 치환 (ψ [CONR]), 또는 락탐 및 다른사이클릭 구조물을 작제하기 위한 골격 가교결합을 포함한다. 다른 유도체는 하기를 포함한다: C-말단 하이드록시메틸 유도체, o-변형된 유도체(예: C-말단 하이드록시메틸 벤질 에테르), 알킬아미드 및 하이드라지드와 같은 치환된 아미드를 포함하는 N-말단 변형된 유도체.
- [0206] 일부 경우에, IL-15 폴리펩티드 중의 하나 이상의 L-아미노산은 하나 이상의 D-아미노산으로 대체된다.
- [0207] 일부 경우에, IL-15 폴리펩티드는 레트로인버소(retroinverso) 유사체이다(참조: 예를 들어, Sela and Zisman (1997) FASEB J. 11: 449). 레트로-인버소 웨პ티드 유사체는 아미노산 서열의 방향이 역전되고(레트로), 내부의

하나 이상의 아미노산의 키랄성 D- 또는 L-이, 예를 들어, L-아미노산보다 오히려 D-아미노산을 사용하여 반전되는(인버소) 선형 폴리펩티드의 이성체이다. [참조: 예를 들어, Jameson 등 (1994) Nature 368: 744; 및 Brady 등 (1994) Nature 368: 692].

[0208] IL-15 폴리펩티드는 지질 이중층, 미셀, 세포 막, 유기 막 또는 소포 막을 가로지르는 것을 용이하게 하는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 탄수화물 또는 유기 또는 무기 분자를 의미하는 "단백질 형질도입 도메인"(PTD)을 포함할 수 있다. 또 다른 분자에 부착된 PTD는 분자가 막을 가로지르는 것, 예를 들어, 세포외 공간으로부터 세포내 공간으로, 또는 세포질에서 세포 기관 내로 이동하는 것을 촉진시킨다. 일부 구현예에서, PTD는 IL-15 폴리펩티드의 아미노 말단에 공유 결합되는 반면, 다른 구현예에서, PTD는 IL-15 폴리펩티드의 카복실 말단에 공유 결합된다. 예시적인 단백질 형질도입 도메인은 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 최소의 운데카펩티드 단백질 형질도입 도메인(YGRKKRRQRRR을 포함하는 HIV-1 TAT의 잔기 47-58에 상응; 서열번호: 11); 하기를 포함하는 폴리아르기닌 서열: 세포에 직접 도입하기에 충분한 아르기닌 잔기의 수(예: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 대지 50개 아르기닌); VP22 도메인 (Zender 등 (2002) Cancer Gene Ther.9(6): 489-96); 드로소필라 안테나페디아 단백질 형질도입 도메인 (Noguchi 등 (2003) Diabetes 52(7): 1732-1737); 절단된 인간 칼시토닌 웨პ티드 (Trehin 등 (2004) Pharm.Research 21: 1248-1256); 폴리리신 (Wender 등 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13003-13008); RRQRRTSKLMKR (서열번호: 7); 트랜스포탄 GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호: 8); KALAWEAKLAKALAKLAKHLAKALAKALKCEA (서열번호: 9); 및 RQIKIWFQNRRMKWKK (서열번호: 10). 예시적인 PTD는 YGRKKRRQRRR (서열번호: 11), RKKRRQRRR (서열번호: 12); 3개의 아르기닌 잔기 대지 50개의 아르기닌 잔기의 아르기닌 단독중합체를 포함하지만, 이에 한정되지 않고; 예시적인 PTD 도메인 아미노산 서열은 하기 중의 어느 하나를 포함하나, 이에 한정되지 않는다: YGRKKRRQRRR (서열번호: 13); RKKRRQRR (서열번호: 14); YARAARQARA (서열번호: 15); THRLPQQRRRR (서열번호: 16); 및 GGRRARRRRRR (서열번호: 17).

[0209] IL-15 폴리펩티드의 C-말단 말단에서 아미노산의 카복실 그룹 COR₃은 유리 형태(R₃ = OH)로 또는 예를 들어, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염과 같은 생리학적으로 허용되는 알칼리성 또는 알칼리 토금속 염의 형태로 존재할 수 있다. 카복실 그룹은 또한 1차, 2차 또는 3차 알코올, 예를 들어, 메탄올, 분지되거나 비분지된 C₁-C₆-알킬 알코올, 예를 들어, 에틸 알코올 또는 3급-부탄올로 에스테르화될 수 있다. 카복실 그룹은 또한 1급 또는 2급 아민, 예를 들어, 암모니아, 분지되거나 비분지된 C₁-C₆-알킬아민 또는 C₁-C₆ 디-알킬아민, 예를 들어, 메틸아민 또는 디메틸아민으로 아미드화될 수 있다.

[0210] IL-15 폴리펩티드의 N-말단에서 아미노산의 아미노 그룹 NR₁R₂은 유리 형태(R₁ = H 및 R₂ = H)로 또는, 예를 들어, 클로라이드 또는 아세테이트와 같은 생리학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다. 아미노 그룹은 또한 R₁ = H이고, R₂ = 아세틸, 트리플루오로아세틸 또는 아다만틸이도록 산으로 아세틸화될 수 있다. 아미노 그룹은 웨პ티드 화학에 통상적으로 사용되는 아미노 보호 그룹, 예를 들어, 하기로 보호된 형태로 존재할 수 있다: 상기 제공된 것들(예: Fmoc, 벤질옥시-카보닐 (Z), Boc, 및 Alloc). 아미노 그룹은 N-알킬화될 수 있고, 여기서 R₁ 및/또는 R₂ = C₁-C₆ 알킬 또는 C₂-C₈ 알케닐 또는 C₇-C₉ 아르알킬이다. 알킬 잔기는 직쇄, 측쇄 또는 사이클릭(예를 들어, 각각, 에틸, 이소프로필 및 사이클로헥실)일 수 있다.

IL-15 기능을 향상시키고/시키거나 모방하기 위한 특별한 변형

[0211] 본원에 개시된 치료 양식(예: IL-15 뮤테인) 및 그들이 투여되는 방식의 하나 이상의 물리적 특성을 개선시키는 것이 종종 유익하고 때로 필수적이다. 물리적 특성의 개선은, 예를 들어, 면역원성을 조절하는 것; 수 용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및/또는 치료적 반감기를 증가시키는 방법; 및/또는 생물학적 활성을 조절하는 것을 포함한다. 특정 변형은 또한, 예를 들어, 검출 검정에 사용하기 위한 항체(예: 에피토프 태그)를 증가시키고 단백질 정체의 용이성을 제공하는데 유용할 수 있다. 이러한 개선은 일반적으로 치료 양식의 생체활성에 악영향을 미치지 않거나 (또는 명목상 영향을 미치지 않고) 및/또는 이의 면역원성을 증가시키지 않고 부여되어야 한다.

[0213] IL-15의 폐길화는 본 발명에 의해 고려되는 하나의 특별한 변형인 반면, 다른 변형은 글리코실화(N- 및 O-결합됨); 폴리시알릴화; 혈청 알부민(예: 인간 혈청 알부민(HAS), 시노 혈청 알부민 또는 소 혈청 알부민(BSA))을 포함하는 알부민 융합 분자; 예를 들어, 접합된 지방산 쇄를 통한 알부민 결합(아실화); 및 Fc-융합 단백질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, PEG 모방체는 본원에서 고려된 다른 약물을 나타낸다.

[0214] 폐길화: 단백질 치료제의 임상 효과는 종종 짧은 혈장 반감기 및 프로테아제 분해에 대한 민감성에 의해 제한된다. 다양한 치료 단백질의 연구는, 이러한 어려움이 폴리펩티드 서열을 임의의 다양한 비단백질성 중합체, 예를

들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌에 접합시키거나 연결시킴을 포함하는 다양한 변형에 의해 극복될 수 있음을 보여 주었다. 이는 빈번하게 단백질 및 비단백질성 중합체, 예를 들어, PEG 둘 다에 공유 결합된 연결 잔기에 의해 영향을 받는다. 이러한 PEG-접합 생체 분자는 보다 우수한 물리적 및 열적 안정성, 효소 분해에 대한 민감성으로부터 보호, 증가된 용해도, 보다 긴 생체내 순환 반감기 및 감소된 클리어런스, 감소된 면역원성 및 항원성, 및 감소된 독성을 포함하는 임상적으로 유용한 특성을 포함하는 것으로 나타났다.

[0215] 폴리펩티드 서열에의 접합에 적합한 PEG는 일반적으로 실온에서 물에 가용성이고, 화학식 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ 를 갖고, 여기서 R은 수소 또는 보호 그룹, 예를 들어, 알킬 또는 알칸을 그룹이고, n은 1 내지 1000의 정수이다. R이 보호 그룹이면, 이는 일반적으로 1 내지 8개의 탄소를 갖는다. 폴리펩티드 서열에 접합된 PEG는 선형이거나 분지될 수 있다. 분지된 PEG 유도체, "스타-PEG" 및 다중-암 PEG가 본 발명에 의해 고려된다. 본 발명에 사용된 PEG의 분자량(분자 질량)은 임의의 특정 범위로 제한되지 않는다. 특정 구현예는 5kDa 내지 20kDa의 분자량을 갖는 반면, 다른 구현예는 4kDa 내지 10kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 분자량을 갖는 PEG를 기재하는 추가의 구현예는 본원의 다른 곳에 기재된다.

[0216] 본 발명은 또한 PEG가 상이한 n 값을 갖고, 따라서 다양한 상이한 PEG가 특정비율로 존재하는 접합체의 조성물을 고려한다. 예를 들어, 일부 조성물은 n=1, 2, 3 및 4인 접합체의 혼합물을 포함한다. 일부 조성물에서, n=1인 접합체의 비율은 18 내지 25%이고, n=2인 접합체의 비율은 50 내지 66%이고, n=3인 접합체의 비율은 12 내지 16%이고, n=4인 접합체의 비율은 5% 이하이다. 이러한 조성물은 당해 분야에 공지된 반응 조건 및 정제 방법에 의해 생성될 수 있다. 예시적인 반응 조건은 명세서 전반에 걸쳐 기재된다. 양이온 교환 크로마토그래피는 접합체를 분리하는데 사용될 수 있고, 이어서, 예를 들어, 비변형된 단백질 서열 및 다른 수의 PEG가 부착된 접합체를 함유하지 않고 정제된, 목적하는 수의 PEG가 부착된 접합체를 함유하는 분획이 동정된다.

[0217] 폐길화는 폴리펩티드의 N-말단의 알파 아미노 그룹, 리신 잔기의 측쇄 상의 앱실론 아미노 그룹 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이미다졸 그룹에서 가장 빈번하게 발생한다. 대부분의 재조합 폴리펩티드가 단일 알파 및 다수의 앱실론 아미노 및 이미다졸그룹을 포함하기 때문에, 다수의 위치 이성체가 링커 화학에 따라 생성될 수 있다. 당해 분야에 공지된 일반적인 폐길화 전략이 본원에서 적용될 수 있다. PEG는 하나 이상의 폴리펩티드 서열의 유리 아미노 또는 카복실 그룹과 폴리에틸렌 글리콜 사이의 결합을 매개하는 말단 반응성 그룹("스페이서")을 통해 본 발명의 폴리펩티드에 결합될 수 있다. 유리 아미노 그룹에 결합될 수 있는 스페이서를 갖는 PEG는 폴리에틸렌 글리콜의 석신산 에스테르를 N-하이드록시석시닐이미드로 활성화시킴으로써 제조될 수 있는 N-하이드록시석시닐이미드 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 유리 아미노 그룹에 결합될 수 있는 또 다른 활성화 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 시아누르산 클로라이드와 반응시킴으로써 제조될 수 있는 2,4-비스(0-메톡시폴리에틸렌글리콜)-6-클로로-s-트리아진이다. 유리 카복실 그룹에 결합된 활성화 폴리에틸렌 글리콜은 폴리옥시에틸렌디아민을 포함한다.

[0218] 스페이서를 갖는 PEG에 대한 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 서열의 접합은 다양한 통상적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 접합 반응은 5 내지 10의 pH에서, 4 °C 내지 실온의 온도에서 30분 내지 20시간 동안 시약 대 단백질의 몰 비 4:1 내지 30:1을 사용하여 용액 중에서 수행될 수 있다. 반응 조건은 주로 목적하는 치환도를 생성하도록 반응을 지시하도록 선택될 수 있다. 일반적으로 저온, 낮은 pH(예: pH=5), 및 짧은 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 감소시키는 경향이 있는 반면, 고온, 중성 내지 높은 pH(예: pH≥7), 및 긴 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 증가시키는 경향이 있다. 당해 분야에 공지된 다양한 수단이 반응을 종결시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 반응은 반응 혼합물을 산성화시키고, 하기에서 동결시킴으로써 종결된다: 예를 들어, -20 °C. 다양한 분자의 폐길화는, 예를 들어, 하기에서 논의된다: U.S. 특히 제5,252,714호; 제5,643,575호; 제5,919,455호; 제5,932,462호; 및 제5,985,263호.

[0219] 상기 나타낸 바와 같이, 폐길화는 N-말단, 리신 잔기의 측쇄, 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이미다졸 그룹에서 가장 빈번하게 발생한다. 이러한 폐길화의 유용성은, 예를 들어, 반응 조건의 최적화 및 정제 공정의 개선에 의한 개선에 의해 향상되었다. 보다 최근의 잔기 특이적 화학은 아르기닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 세린, 트레오닌 및 티로신 뿐만 아니라, 카복시 말단의 폐길화를 가능하게 하였다. 이러한 아미노산 잔기 중 일부는 특이적으로 폐길화될 수 있는 반면, 나머지는 더욱 난잡하거나 특정 조건하에 부위 특이적 폐길화만을 초래 한다.

[0220] 추가의 아미노산 잔기의 폐길화를 가능하게 하는 현재의 접근법은 브릿징 폐길화(디설파이드 브릿지), 효소적 폐길화(글루타민 및 C-말단) 및 글리코폐길화(0- 및 N-글리코실화 부위 또는 당단백질의 글리칸) 및 해테로이작

용성 폐길화를 포함한다. 비천연 아미노산을 함유하는 단백질의 폐길화, C-말단 폐길화를 위한 인테인융합단백질, 트랜스글루타미나제 매개된 폐길화, 소르타제 A 매개된 폐길화, 및 방출가능한 비공유 폐길화에 대한 추가의 접근법이 기재되어 있다. 또한, 특정 폐길화 접근법과 유전 공학 기술의 조합은 폴리에틸렌 글리칸 중합체가, 예를 들어, 직교 반응성 그룹을 포함하는 천연 또는 비천연 아미노산에 의한 폴리펩티드 내의 특정 아미노산 잔기의 치환으로 인해 단백질 표면 상의 임의의 위치에서 본질적으로 결합할 수 있게 한다. 일반적으로 하기를 참조한다: 예를 들어, Pasut, G. and Veronese, F.M., (2012) J. Controlled Release 161: 461-72; Roberts, M.J. 등, (2012) Advanced Drug Delivery Rev. 64: 116-27; Jevsevar, S. 등, (2010) Biotechnol. J. 5: 113-28; 및 Yoshioka, Y. (2011) Chem. Central J. 5: 25.

[0221] 폐길화 분자의 치료적 가치는 충분히 입증되어 있다. 이전 및/또는 현재 의약품은 다음을 포함한다: OMONTYS (Affymax/Takeda); PEGLOTICASE (Savient); CIMZIA (Nektar/UCB Pharma); MACUGEN (Pfizer); NEULASTA (Amgen); SOMAVERT (Pfizer); PEGASYS (Roche); DOXIL (Ortho Biotech) 및 PEGINTRON (Scherling-Plough).

[0222] 본 발명은 또한 PEG 모방체의 사용을 고려한다. PEG의 특성(예: 향상된 혈청 반감기)을 유지하면서 몇 가지 추가적인 유리한 특성을 부여하는 재조합 PEG 모방체가 개발되었다. 예로서, PEG와 유사한 확장된 형태를 형성할 수 있는 (예를 들어, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser 및 Thr을 포함하는) 단순한 폴리펩티드 쇄는 하기에 이미 재조합적으로 융합되어 생성될 수 있다: 관심 있는 웨პ티드 또는 단백질 약물(예: Amunix' XTEN technology; Mountain View, CA). 이는 제조 공정 동안 추가의 접합 단계의 필요성을 제거한다. 또한, 확립된 분자 생물학 기술은 폴리펩티드 쇄의 측쇄 조성의 제어를 가능하게하여 면역원성 및 제조 특성의 최적화를 허용한다.

[0223] 글리코실화: 본 발명의 목적을 위해, "글리콜실화"는 광범위하게 글리칸을 단백질, 지질 또는 다른 유기 분자에 부착시키는 효소 공정을 의미한다.

[0224] 본 발명과 관련하여 용어 "글리코실화"의 사용은 일반적으로 (기본 글리코실화 부위를 제거하거나 화학적 및/또는 효소적 수단에 의해 글리코실화를 결실시킴으로써) 하나 이상의 탄수화물 잔기를 추가하거나 결실시키고/시키거나 천연 서열에 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가함을 의미하고자 한다. 또한, 상기 어구는 존재하는 다양한 탄수화물 잔기의 성질 및 비율의 변화를 포함하는 천연 단백질의 글리코실화의 질적 변화를 포함한다.

[0225] 글리코실화는 IL-15와 같은 폴리펩티드의 물리적 특성(예: 용해도)에 극적으로 영향을 미칠 수 있고, 또한 단백질 안정성, 분비 및 세포 이하 국소화에 중요할 수 있다. 글리코실화된 폴리펩티드는 또한 향상된 안정성을 나타낼 수 있거나, 반감기와 같은 하나 이상의 약물동태학적 특성을 개선시킬 수 있다. 또한, 용해도 개선은, 예를 들어, 비글리코실화된 폴리펩티드를 포함하는 제형보다 약제학적 투여에 더욱 적합한 제형의 생성을 가능하게 할 수 있다.

[0226] 적절한 글리코실화는 생물학적 활성에 필수적일 수 있다. 실제로, 진핵생물 유기체의 일부 유전자는, 하기에서 발현된 경우: 세균(예: 이. 콜리)(이는 단백질을 글리코실화하는 세포 공정이 결여되어 있다), 글리코실화의 결여로 인해 활성이 거의 또는 전혀 없이 회수되는 단백질을 생산한다.

[0227] 글리코실화 부위의 추가는 아미노산 서열을 변경함으로써 달성될 수 있다. 폴리펩티드의 변경은, 예를 들어, 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기(O-결합된글리코실화 부위의 경우) 또는 아스파라긴 잔기(N-결합된 글리코실화 부위의 경우)의 첨가 또는 이에 의한 치환에 의해 수행될 수 있다. N-결합된 및 O-결합된 올리고당의 구조 및 각 형태에서 밝혀진 당 잔기는 상이할 수 있다. 둘 다에서 통상적으로 발견된 당의 한 형태는 N-아세틸뉴라민산(이후, 시알산으로서 칭명된다)이다. 시알산은 일반적으로 N-결합 및 O-결합 올리고당의 말단 잔기이고, 이의 음전하에 의해, 당단백질에 산성을 부여할 수 있다. 본 발명의 특별한 구현에는 N-글리코실화 변이체의 생성 및 사용을 포함한다.

[0228] 본 발명의 폴리펩티드 서열은 핵산 수준의 변화를 통해, 특히 목적하는 아미노산으로 번역되는 코돈이 생성되도록 미리 선택된 염기에서 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 돌연변이시킴으로써 임의로 변경될 수 있다. 폴리펩티드 상의 탄수화물 잔기의 수를 증가시키는 추가의 수단은 글리코사이드의 폴리펩티드로의 화학적 또는 효소적 결합에 의해서이다. 탄수화물의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로, 또는 글리코실화되는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈의 치환에 의해 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화 기술은 공지되어 있고, 폴리펩티드 상의 탄수화물 잔기의 효소적 절단은 다양한 엔도- 및 액소-글리코시다제의 사용으로 달성될 수 있다.

[0229] 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) - 결핍 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포는 재조합 당단백질을 생산하기 위해 통상적으로 사용된 숙주 세포이다. 이를 세포는 효소 베타-갈락토시드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제를 발현

시키지 않고, 따라서, 이들 세포에서 생산된 당단백질의 N-결합 올리고당에 알파-2,6 결합 중의 시알산을 첨가하지 않는다.

[0230] **폴리시알릴화:** 본 발명은 또한 폴리펩티드의 안정성 및 생체내 약물동태학을 향상시키기 위해, 폴리시알릴화의 사용, T폴리펩티드의 천연 발생 생분해가능한 α-(2→8) - 결합된 폴리시알산("PSA")에의 접합을 고려한다. PSA는 매우 친수성인 생체분해성 무독성 천연 종합체이고 이의 혈청 반감기를 증가시키는 혈액 중 높은 절보기 분자량을 제공한다. 또한, 다양한 웨პ티드 및 단백질 치료제의 폴리시알릴화는 현저하게 감소된 단백질 분해, 생체 활성의 보유, 및 면역원성 및 항원성의 감소를 유도하였다(참조: 예를 들어, G.Gregoriadis 등, Int. J. Pharmaceutics (2005) 300(1-2): 125-30). 하기에 의한 변형과 마찬가지로(예: PEG), 부위 특이적 폴리시알릴화를 위한 다양한 기술이 이용 가능하다(참조: 예를 들어, T.Lindhout 등, (2011) PNAS 108(18)7397-7402).

[0231] **알부민 융합:** 접합을 위한 추가의 적합한 성분 및 분자는 알부민, 예를 들어, 인간 혈청 알부민(HAS), 시노 혈청 알부민, 및 소 혈청 알부민(BSA)을 포함한다.

[0232] 약 20일의 혈청 반감기를 갖는 585개의 아미노산 폴리펩티드(약 67kDa)인 성숙한 HAS는 주로 콜로이드성 혈액 삼투압, 혈액 pH, 및 수많은 내인성 및 외인성 리간드의 수송 및 분배의 유지에 관여한다. 단백질은 3개의 구조적 상동성 도메인(도메인 I, II 및 III)을 갖고, 거의 전체로 알파-나선형 형태이고, 17개의 디설파이드 브릿지에 의해 매우 안정화된다. 알부민의 3개의 주요 약물 결합 영역은 서브-도메인 IB, IIA 및 IIIA 내의 3개의 도메인 각각에 위치한다.

[0233] 알부민 합성은 간에서 발생하고, 이는 짧은 수명의 1차 제품 프리프로알부민을 생성한다. 따라서, 전장 HAS는 18개의 아미노산의 신호 웨პ티드(MKWVTFISLLFLFSSAYS; 서열번호: 40)에 이어 6개의 아미노산의 프로-도메인(RGVFRR; 서열번호: 41)을 갖고; 이 24개 아미노산 잔기 웨პ티드는 프리-프로 도메인으로서 칭명될 수 있다. HAS는 프리-프로-도메인으로서 이의 내인성 신호 웨პ티드를 사용하여 발현되고 분비될 수 있다. 또는, HAS는 성숙한 작제물에 융합된 IgK 신호 웨პ티드를 사용하여 발현되고 분비될 수 있다. 프리프로알부민은 아미노 말단에서 세포질 망상 루멘에서 신속하게 동시-변역적으로 절단되어 안정한 609-아미노산 전구체 폴리펩티드, 프로알부민을 생성한다. 이어서, 프로알부민은 골지체로 통과하고, 여기서 이는 푸린 의존성 아미노 말단절단에 의해 585개의 아미노산 성숙 알부민으로 전환된다.

[0234] 알부민의 1차 아미노산 서열, 구조 및 기능은, 알부민 합성 및 분비의 공정과 마찬가지로, 종간에 고도로 보존된다. HAS에 필적하는 알부민 혈청 단백질은, 예를 들어, 시노몰구스 원숭이, 소, 개, 래빗 및 랙트에서 발견된다. 비인간 종 중에서, 소 혈청 알부민(BSA)이 HAS와 가장 구조적으로 유사하다(참조: 예를 들어, Kosa 등, Nov 2007 J Pharm Sci. 96(11): 3117-24). 본 발명은, 예를 들어, 약물 개발 공정에서 상기 나타낸 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 비인간 종으로부터 알부민의 사용을 고려한다.

[0235] 본 발명에 따라서, 알부민은 카복실 말단, 아미노 말단, 카복실 및 아미노 말단 둘 다에서, 및 내적으로 약물 분자(예: 본원에 기재된 폴리펩티드)에 접합될 수 있다(참조: 예를 들어, USP 5,876,969 및 USP 7,056,701).

[0236] 본 발명에 의해 고려된 HSA - 약물 분자 접합체에서, 알부민 분비 예비-서열 및 이의 변이체, 이의 단편 및 변이체, 및 HAS 변이체와 같은 다양한 형태의 알부민이 사용될 수 있다. 이러한 형태는 일반적으로 하나 이상의 목적하는 알부민 활성을 포함한다. 추가의 구현예에서, 본 발명은 알부민, 알부민 단편 및 알부민 변이체 등에 직접 또는 간접적으로 융합된 폴리펩티드 약물 분자를 포함하는 융합 단백질을 포함하고, 여기서 융합 단백질은 비융합된 약물 분자보다 더 높은 혈장 안정성을 갖고/갖거나 융합 단백질은 비융합된 약물 분자의 치료 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, 간접 융합은 웨პ티드 링커 또는 이의 변형된 버전과 같은 링커에 의해 영향을 받는다.

[0237] 세포내 절단은, 예를 들어, 푸린 또는 카스파제에 의해 효소적으로 수행될 수 있다. 세포는 세포 내에서 융합 분자의 일부를 절단할 수 있는 이러한 내인성 효소의 낮은 수준을 발현시킨다. 따라서, 폴리펩티드의 일부는 HSA에 접합되지 않고 세포로부터 분비되는 반면, 나머지는 HSA를 포함하는 융합 분자의 형태로 분비된다. 본 발명의 구현예는 다양한 푸린 융합 작제물의 사용을 고려한다. 예를 들어, 서열 RGRR (서열번호: 18), RKRKKR (서열번호: 19), RKKR (서열번호: 20), or RRRKKR (서열번호: 21)을 포함하는 작제물이 설계될 수 있다.

[0238] 본 발명은 또한 세포외 절단(생체외 절단)을 고려하고, 이에 의해 융합 분자는 세포로부터 분비되고, 정제된 다음, 절단된다. 절제는 성숙한 IL-15로부터 전체 HSA-링커 복합체를 또는 그 전체 HSA-링커 복합체 미만으로 분해할 수 있음이 이해된다.

[0239] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드에 대한 알부민의 융합은, 예를 들어, HAS 또는 이의

단편을 코딩하는 핵산이 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산에 결합되도록 유전자 조작에 의해 달성될 수 있다. 이후, 적합한 숙주는 융합 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 예를 들어, 적합한 플라스미드의 형태로 융합된 뉴클레오티드 서열로 형질전환되거나 형질감염될 수 있다. 발현은, 예를 들어, 원핵 세포 또는 진핵 세포로부터 시험관내에서 또는, 예를 들어, 유전자 도입 유기체로부터 생체내에서 수행될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 융합 단백질의 발현은 포유동물 세포주, 예를 들어, CHO 세포주에서 수행된다. 형질전환은 외인성 유전자 재료(외인성 핵산)의 세포막을 통한 직접 흡수, 도입 및 발현으로부터 생성되는 세포의 유전적 변경을 의미하기 위해 본원에서 광범위하게 사용된다. 형질전환은 일부 세균에서 자연적으로 발생하지만, 이는 또한 다른 세포에서 인공적인 수단에 의해 수행될 수 있다.

[0240] 또한, 일부민 자체는 이의 순환 반감기를 연장시키기 위해 변형될 수 있다. IL-15에 대한 변형된 일부민의 융합은 상기한 유전적 조작 기술 또는 화학적 접합에 의해 달성될 수 있고, 생성되는 융합 분자는 비변형된 일부민과의 융합의 반감기를 초과하는 반감기를 갖는다(참조: WO2011/051489).

[0241] 대안적인 일부민 결합 전략: 다수의 일부민-결합 전략이 접합된 지방산 쇄를 통한 일부민 결합(아실화)을 포함하는 직접 융합에 대한 대안으로서 개발되었다. 혈청 일부민은 지방산에 대한 수송 단백질이기 때문에, 일부민-결합 활성을 갖는이들 천연 리간드가 작은 단백질 치료제의 반감기 연장을 위해 사용되었다. 예를 들어, 당뇨병에 승인된 제품인 인슐린 디테르미르(LEVEMIR)는 유전적으로 변형된 인슐린에 접합된 미리스틸 쇄를 포함하여 장기간 지속되는 인슐린 유사체를 생성한다.

[0242] 본 발명은 일부민 결합 도메인(ABD) 폴리펩티드 서열 및 본원에 기재된 하나 이상의 폴리펩티드의 서열을 포함하는 융합 단백질을 고려한다. 문헌에 기재된 임의의 ABD 폴리펩티드 서열은 융합 단백질의 성분일 수 있다. 융합 단백질의 성분은, 본원에 기재된 링커와 같은 링커를 통해 임의로 공유 결합될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 융합 단백질은 N-말단 잔기로서 ABD 폴리펩티드 서열 및 C-말단 잔기로서 본원에 기재된 폴리펩티드를 포함한다.

[0243] 본 발명은 또한 단편이 실질적으로 일부민 결합을 보유하는 일부민 결합 폴리펩티드의 단편; 또는 단량체 단위로서 적어도 두 개의 일부민 결합 폴리펩티드 또는 이의 단편을 포함하는 일부민 결합 폴리펩티드의 다양체 또는 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 고려한다. ABD 및 관련 기술의 일반적 논의를 위해, WO 2012/050923, WO 2012/050930, WO 2012/004384 및 WO 2009/016043을 참조한다.

[0244] 다른 분자와의 접합: 접합을 위한 추가의 적합한 성분 및 분자는, 예를 들어, 티로글로불린; 테타누스톡소이드; 디프테리아 톡소이드; 폴리아미노산, 예를 들어, 폴리(D-리신: D-글루탐산); 로타바이러스의 VP6 폴리펩티드; 인플루엔자 바이러스 해마글루티닌, 인플루엔자 바이러스 핵단백질; 키홀 림펫 혜모시아닌(KLH); 및 B형 간염 바이러스 코어 단백질 및 표면 항원; 또는 상기의 임의의 조합을 포함한다.

[0245] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드 서열의 N- 및/또는 C-말단에서 하나 이상의 추가의 성분 또는 분자, 예를 들어, 또 다른 폴리펩티드(예: 대상체 폴리펩티드에 이종성인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드) 또는 담체 분자의 접합을 고려한다. 따라서, 예시적인 폴리펩티드 서열은 또 다른 성분 또는 분자와의 접합체로서 제공될 수 있다.

[0246] 접합체 변형은 제2 분자로부터 유래된 활성을 추가의 또는 상보적 기능 또는 활성과 함께 활성을 보유하는 폴리펩티드 서열을 초래할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 서열은, 예를 들어, 용해도, 저장, 생체내 또는 유효 반감기 또는 안정성, 면역원성의 감소, 생체내 지연되거나 조절된 방출 등을 촉진시키기 위해 분자에 접합될 수 있다. 다른 기능 또는 활성은 비접합된 폴리펩티드 서열에 비해 독성을 감소시키는 접합체, 비접합된 폴리펩티드 서열보다 더욱 효율적으로 세포 또는 기관의 유형을 표적화하는 접합체, 또는 본원에 나타낸 질환, 장애 또는 상태(예: 암)와 관련되는 원인 또는 효과를 추가로 대응하기 위한 약물을 포함한다.

[0247] IL-15 폴리펩티드는 또한 크고, 천천히 대사되는 거대분자, 예를 들어, 단백질; 다당류, 예를 들어, 세파로스, 아가로스, 셀룰로스 또는 셀룰로스 비드; 중합체성 아미노산, 예를 들어, 폴리글루탐산 또는 폴리리신; 아미노산 공중합체; 불활성화된 바이러스 입자; 불활성화된 세균성 독소, 예를 들어, 디프테리아, 테타누스, 콜레라 또는 류코톡신 분자로부터의 톡소이드; 불활성화된 세균; 및 수지상 세포에 접합될 수 있다. 이러한 접합된 형태는, 경우에 따라, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있다.

[0248] 접합을 위한 추가의 후보 성분 및 분자는 단리 또는 정체에 적합한 것들을 포함한다. 특별한 비제한적인 예는 결합 분자, 예를 들어, 비오틴(비오틴-아비딘 특이적 결합 쌍), 항체, 수용체, 리간드, 렉チン, 또는, 예를 들어, 플라스틱 또는 폴리스티렌 비드, 플레이트 자기 비드, 시험 스트립 및 막을 포함하는 고체 지지체를 포함하는 분자를 포함한다.

- [0249] 양이온 교환 크로마토그래피와 같은 정제 방법은 접합체를 그들의 다양한 분자량으로 효과적으로 분리하는 전하 차이에 의해 접합체를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 양이온 교환 컬럼을 부하한 다음, 약 20 mM 나트륨 아세테이트, pH 약 4로 세척한 후, pH 약 3 내지 5.5, 예를 들어, pH 약 4.5에서 완충된 선형 (0 M 내지 0.5 M) NaCl 구배로 용출시킬 수 있다. 양이온 교환 크로마토그래피로 수득된 분획의 함량은 통상적인 방법, 예를 들어, 질량 분광법, SDS-PAGE, 또는 분자량에 의해 분자 실체를 분리하는 다른 공지된 방법을 사용하여 분자량에 의해 동정될 수 있다.
- [0250] Fc-융합 분자: 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 서열의 아미노- 또는 카복실- 말단은 면역글로불린 Fc 영역(예: 인간 Fc)에 융합되어 융합 접합체(또는 융합 분자)를 형성할 수 있다. Fc 융합 접합체는 생체 의약품의 전신 반감기를 증가시키는 것으로 나타났고, 따라서 생체 의약품은 덜 빈번한 투여를 필요로 한다.
- [0251] Fc는 혈관을 둘러싸고 있는 내피 세포에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하고, 결합시, Fc 융합 분자는 분해로부터 보호되고, 순환에 재방출되어 순환에서 분자를 더 오래 유지시킨다. 이러한 Fc 결합은 내인성 IgG가 이의 긴 혈장 반감기를 유지하는 메커니즘으로 간주된다. 보다 최근의 Fc-융합 기술은 생체 의약품의 단일 커피를 전통적인 Fc-융합 접합체와 비교하여 생체 의약품의 약물동력학적 및 약력학적 특성을 최적화하기 위해 항체의 Fc 영역에 연결시킨다.
- [0252] 다른 변형: 본 발명은 하나 이상의 특성을 향상시키기 위해, 현재 공지되거나 장래에 개발될 IL-15의 다른 변형의 사용을 고려한다. 하나의 그러한 방법은 웨프티드 서열의 특징을 변형시키기 위해 다른 분자에 결합된 하이드록시에틸 전분 유도체를 사용하는 헤실화에 의한 폴리펩티드 서열의 변형을 포함한다. 헤실화의 다양한 국면은, 예를 들어, 하기에 기재되어 있다: U.S. 특허원제2007/0134197호 및 제2006/0258607호.
- [0253] 본 발명은 또한 융합 태그로서 소형 유비퀴틴 유사 변경유전자(Small Ubiquitin-like Modifier; SUMO)를 포함하는 융합 분자를 고려한다(LifeSensors, Inc.; Malvern, PA). SUMO에 대한 본원에 기재된 폴리펩티드의 융합은 발현의 증진, 용해도의 향상 및/또는 정제 방법의 개발에서의 도움을 포함하는 몇 가지 유익한 효과를 전달할 수 있다. SUMO 프로테아제는 SUMO의 3차 구조를 인식하고, SUMO의 C-말단에서 융합단백질을 절단하여 목적하는 N-말단 아미노산을 갖는 본원에 기재된 폴리펩티드를 방출시킨다.
- [0254] 본 발명은 또한 PASylation™ (XL-Protein GmbH (Freising, Germany))의 사용을 고려한다. 이 기술은 신장 사구체의 기공 크기를 넘어서는 단백질의 치료적 생체활성에 부정적인 영향을 미치지 않고 관심 있는 단백질의 겉보기 분자 크기를 확장시켜 단백질의 신장 클리어런스를 감소시킨다.
- [0255] 링커: 링커 및 그들의 용도는 상기 기재되었다. 본 발명의 폴리펩티드 서열을 변형시키기 위해 사용된 임의의 상기 성분 및 분자는 임의로 링커를 통해 접합될 수 있다. 적합한 링커는 일반적으로 변형된 폴리펩티드 서열과 연결된 성분 및 분자 사이의 일부 이동을 허용하기에 충분한 길이의 "가요성 링커"를 포함한다. 링커 분자는 일반적으로 약 6 내지 50 원자 길이이다. 링커 분자는 또한, 예를 들어, 아릴 아세틸렌, 2 내지 10개 단량체 단위를 함유하는 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민, 이산, 아미노산 또는 이의 조합일 수 있다. 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고, 하기와 같은 임의의 적합한 길이일 수 있다: 1개의 아미노산(예: Gly), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 또는 50 이상 아미노산.
- [0256] 예시적인 가요성 링커는 글리신 중합체 (G_n), 글리신-세린 중합체(예: $(GS)_n$, $GSGS_n$ (서열번호: 22), $GGGS_n$ (서열번호: 23), $(G_mS_o)_n$, $(G_mS_oG_m)_n$, $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$ (서열번호: 24), $(GSGGS_m)_n$ (서열번호: 25), $(GS(G_m)_n$ (서열번호: 26) 및 $(GGGS_m)_n$ (서열번호: 27), 및 이의 조합, 여기서 m , n 및 o 는 각각 독립적으로 적어도 1의 정수로부터 선택된다), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 상대적으로 비구조화되고, 따라서 성분들 사이에 중성 테테르로서 작용할 수 있다. 예시적인 가요성 링커는 GGSG (서열번호: 28), GGSAG (서열번호: 29), GSGSG (서열번호: 30), GSGGG (서열번호: 31), GGGSG (서열번호: 32) 및 GSSSG (서열번호: 33)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0257] 본 발명의 특정 구현예에서, PEG는 하나 이상의 PEG 분자에 공유 결합된 활성화된 링커를 통해 IL-15에 접합된다. 링커는, 화학적으로 반응성이고 웨프티드 상의 반응성 그룹에 공유 결합할 준비가되어 있는 경우, "활성화"된다. 본 발명은, 적합한 반응 조건하에 하나 이상의 PEG 분자를 수용할 수 있고 아미노산 잔기와 공유 결합을 형성할 수 있다면, 임의의 활성화된 링커의 사용을 고려한다. 특별한 국면에서, 활성화된 링커는 다른 부착 부위(예: 리신의 엡실론 아미노 그룹 또는 히스티딘의 이미노 그룹)에 의해 매우 선택적인 방식으로 알파 아미노 그룹에 부착한다.

- [0258] 일부 구현예에서, 활성화된 PEG는 하기 화학식으로 나타낼 수 있다: $(PEG)_b-L'$, 여기서 PEG는 링커의 탄소원자에 공유 결합하여 에테르 결합을 형성하고, b는 1 내지 9이고(즉, 1 내지 9개의 PEG 분자는 링커에 부착될 수 있다), L'는, 예를 들어, 아미노산 잔기 상의 아미노 또는 이미노 그룹과 반응하여 IL-15에 대한 PEG의 공유 결합을 제공할 수 있는 반응성 그룹(활성화된 잔기)을 함유한다. 다른 구현예에서, 활성화된 링커(L')는 화학식 RCHO의 알데하이드를 함유하고, 여기서 R은 선형 또는 분지된 C₁₋₁₁ 알킬이고; IL-15에 활성화된 링커의 공유 결합 후, 링커는 2 내지 12개의 탄소원자를 함유한다. 본 발명은 프로피온알데하이드가 예시적인 활성화된 링커인 구현예를 고려한다. PEG-프로피온알데하이드(CH₂CH₂CHO)는 다음에 기재되어 있고: US 특허 제5,252,714호, 시판된다(예: Shearwater Polymers (Huntsville, AL). 다른 활성화된 PEG-링커는, 예를 들면, 하기로부터 상업적으로 수득될 수 있다: Shearwater Polymers and Enzon, Inc. (Piscataway, N. J.).
- [0259] 일부 구현예에서, 하나 이상의 PEG 분자를 IL-15에 공유 결합시키는 것이 바람직하고, 적합한 활성화 분지된(즉, "다중-암화된") 링커가 사용될 수 있다. IL-15의 아미노산 잔기 상의 아미노 그룹(예: N-말단에서 알파 아미노 그룹)에 둘이상의 PEG 분자를 공유 결합시키는 임의의 적합한 분지된 PEG 링커가 사용될 수 있다. 특별한 구현예에서, 본 발명에 의해 고려되는 분지된 링커는 두 개 또는 세 개의 PEG 분자를 함유한다. 예로서, 분지된 링커는 가수분해적으로 안정하고, 상기한 바와 같이, 아미노산 잔기의 아미노 그룹과 반응하는 활성화 잔기(예: 알데하이드 그룹)을 함유하는 선형 또는 분지된 지방족 그룹일 수 있고; 분지된 링커의 지방족 그룹은 2 내지 12개의 탄소를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 지방족 그룹은, 예를 들어, 3개의 탄소원자 각각에 3개의 PEG 분자(즉, 총 9개의 PEG 분자) 및 3급-부틸의 네 번째 탄소 상에 반응성 알데하이드 잔기를 함유할 수 있는 3급-부틸일 수 있다.
- [0260] 추가의 예시적인 분지된 PEG 링커는 하기에 기재되어 있다: U.S. 특허 제5,643,575호, 제5,919,455호, 제7,052,868호 및 제5,932,462호. 당업자는, 예를 들어, 반응성 알데하이드 잔기의 첨가로 분지된 PEG 링커에 대한 변형을 제조할 수 있다. 사용하기 위한 링커의 제조방법은 또한 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 예를 들어, 상기 나열된 US 특허에 기재되어 있다.
- [0261] 치료적 및 예방적 용도
- [0262] 본 발명은 하기의 용도를 고려한다: 본원에 기재된 IL-15 폴리펩티드(예: PEG-IL-15), 광범위한 범위의 질환, 장애 및/또는 상태, 및/또는 이의 증상을 치료하거나 예방하는데. 특별한 용도가 이후 상세히 기재되지만, 본 발명이 그렇게 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 특별한 질환, 장애 및 상태의 일반적인 카테고리가 이후 기재되지만, 질환, 장애 및 상태 중의 일부는 하나 이상의 카테고리의 구성원일 수 있고, 나머지는 임의의 개시된 카테고리의 구성원이 아닐 수도 있다.
- [0263] 이하 보다 상세히 논의된 바와 같이, IL-15는 하기와 관련된 질환, 장애 및 상태에서 역할을 하는 것으로 나타났다: 면역 및 염증성 기능(예: 자가면역 관련 질환(예: 류마티스성 관절염), 유우종증, 염증성 장 질환 및 이식 거부); 암(예: 백혈병, 림프 증식성 장애 및 고형 종양); 및 감염성 질환(예: HIV). [참조: 예를 들어, Fehniger, 등, Blood 97(1) (Jan 1, 2001)].
- [0264] 면역 및 염증성 상태. 일부 구현예에서, 본 발명은 면역계의 억제 및 면역 관련 질환, 장애 및 상태의 치료를 고려한다. 본원에 사용된 바와 같이, "면역 질환", "면역 상태", "면역 장애", "염증성 질환", "염증성 상태", "염증성 장애" 등과 같은 용어는 광범위하게 임의의 면역- 또는 염증성 관련 상태(예: 병리학적 염증 및 자가면역 질환)를 포함하는 것을 의미한다. 그러한 상태는 종종 다른 질환, 장애 및 상태와 불가분하게 되어있다. 예로서, "면역 상태"는 감염(급성 및 만성), 종양 및 면역계에 의한 박멸에 저항하는 암을 포함하여, 암, 종양 및 혈관 신생과 같은 증식성 상태를 의미할 수 있다.
- [0265] 본원에 기재된 IL-15 웨პ티드는 야생형 IL-15 및 IL-15 수용체 복합체 사이의 상호작용의 결과로서 통상적으로 발생하는 하나 이상의 세포성 이벤트를 억제하기에 유효한 양의 투여를 통해 면역 기능을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 IL-15 웨პ티드를 코딩하는 핵산 분자 또는 본원에 기재된 IL-15 웨პ티드를 발현시키는 제조합 세포가 투여될 수 있다. 특별한 구현예에서, IL-15 웨პ티드는 야생형 IL-15와 유사한 친화도를 갖는 IL-15 수용체 복합체에 결합하지만, 세포 신호 전달을 활성화시키지 못한다. IL-15 웨პ티드가 야생형 IL-15와 효과적으로 경쟁하고, IL-15 신호전달에 대한 반응에 통상적으로 관련된 이벤트를 억제하는 것이 유리하다.
- [0266] 예를 들어, 염증성 사이토카인에 의해 유발될 수 있는 면역- 및 염증 관련 질환, 장애 및 상태의 비제한적인 목

록에는 관절염(예: 류마티스성 관절염), 유육종증, 신부전, 루푸스, 천식, 건선, 대장염, 췌장염, 알레르기, 수술 합병증(예: 염증성 사이토카인이 치유를 방지하는 경우), 빈혈 및 섬유근육통을 포함한다. 만성 염증과 관련될 수 있는 다른 질환 및 장애는 하기를 포함한다: 알츠하이머병, 울혈성 심부전, 뇌졸중, 대동맥 판막 협착증, 아테로스clerosis(동맥경화증), 골다공증, 파킨슨병, 감염, 염증성 장 질환(예: 크론병 및 궤양성 대장염), 알레르기성 접촉 피부염 및 기타 습진, 전신 경화증, 이식 및 다발성 경화증. IL-15 분자가 (예를 들어, 현재의 치료법의 제한으로 인해) 특히 효과적일 수 있는 상기한 질환, 장애 및 상태의 일부는 이후에 보다 상세히 기재된다.

[0267] 본 발명의 IL-15 폴리펩티드는 염증성 장 질환(IBD)의 치료 및 예방에 특히 효과적일 수 있다. IBD는 크론병(CD) 및 궤양성 대장염(UC)을 포함하고, 이를 둘 다는 위장관의 어느 부분에도 영향을 미칠 수 있는 특발성 만성 질환이고, 여러 가지 부작용과 관련되고, 장기적인 UC 환자는 결장암 발병 위험이 증가한다. 현재의 IBD 치료는 염증 증상을 조절하는 것을 목표로 하고, 특정 제제(예: 코르티코스테로이드, 아미노살리실레이트 및 표준 면역억제제(예: 사이클로스포린, 아자티오프린 및 메토트렉세이트))는 제한된 성공을 경험했지만, 장기간 치료는 간 손상(예: 섬유증 또는 간경변) 및 골수 억제를 유발할 수 있고, 환자는 종종 그러한 치료에 대해 불응성이 된다.

[0268] 통상적인 면역 매개 만성 피부 질환의 집합체인 건선은 미국에서 450만 명 이상의 사람에게 영향을 미치고, 이 중 150만 명은 중간 내지 중증 형태의 질환을 갖는 것으로 간주된다. 또한, 건선 환자의 10% 이상은 관절 주위의 뼈와 결합 조직을 손상시키는 건선성 관절염이 발병한다. 건선의 기본 생리학의 이해가 개선되어, 예를 들어, 질환의 염증성 성질의 원인인 T 림프구와 사이토카인의 활성을 표적화하는 제제의 도입을 초래하였다. 그러한 제제는 ENBREL (에타네르셉트), REMICADE (인플릭시맙) 및 HUMIRA (아달리무맙)을 포함하는 TNF-α 억제제(또한, 류마티스성 관절염(RA)을 치료하는데 사용됨), 및 AMEVIVE (알레파셉트) 및 RAPTIVA (에팔리주맙)와 같은 T-세포 억제제를 포함한다. 이러한 제제 중 일부는 특정 환자 집단에서 어느 정도 효과적이지만, 모든 환자를 효과적으로 치료하는 것으로 나타난 제제는 없었다.

[0269] 일반적으로 관절의 막 내벽(활막)에서 만성 염증을 특징으로 하는 류마티스성 관절염(RA)은 미국 인구의 약 1%(약 210만 명)에 영향을 미친다. 염증 과정에서 TNF-α 및 IL-1을 포함하는 사이토카인의 역할에 대한 더 깊은 이해는 새로운 부류의 질환 변형성 항류마티스성 약물(DMARD)의 개발 및 도입을 가능하게 했다. 제제 (이중 일부는 다른 적응증에 대한 치료 양식과 중복된다)는 ENBREL (에타네르셉트), REMICADE (인플릭시맙), HUMIRA (아달리무맙) 및 KINERET (아나킨라)를 포함한다. 이들 제제 중의 일첨가 증상을 완화하고, 구조적 손상의 진행을 억제하며, 특별한 환자 집단에서 신체 기능을 향상시키지만, 개선된 효능, 보완 작용 메커니즘 및 낮은/덜 심각한 부작용을 갖는 대안의 제제가 여전히 필요하다.

[0270] 장기 및 조직의 이식 거부는 특정 상황에서 IL-15 관련 성분을 포함하는 것으로 밝혀졌다. 거부 반응은 타고난 면역 반응의 성분과 함께 세포성 면역과 체액성 면역 둘 다에 의해 매개되는 적응성 면역 반응이다. 상이한 유형의 이식 장기 및 조직은 종종 거부 메커니즘의 균형이 상이하다. 신장, 심장, 골수, 피부 및 혈액은 이식 거부에 가장 빈번하게 관련되는 장기 및 조직이다. 이식 거부 반응의 치료는 종종 거부 반응의 의학적 카테고리(예: 초급, 급성 또는 만성)에 의해 결정된다.

[0271] 면역억제 요법은 이식 거부 반응을 치료하는 주요 수단을 구성한다. 치료는 일반적으로 코르티코스테로이드(예: 프레드니손)로 개시된다. 병용 요법은 전형적으로 칼시뉴린 억제제(예: 사이클로스포린 및 타크로리무스) 및 항증식성 제제(예: 아자티오프린)의 첨가를 수반한다. 특별한 면역 성분에 특이적인 항체는 면역억제 요법에 첨가될 수 있고; 항체 치료제는 모노클로날 항-IL-2R α 수용체 항체(예: 다클리주마드) 및 모노클로날 항-CD20 항체(예: 리툭시맙)를 포함한다. 많은 상황에 도움이 되지만, IL-15 관련 제제와 같은 대체 치료 양식이 필요하다.

[0272] 뇌 및 척수에서 미엘린의 여러 부분의 염증 및 흉터를 포함하는 심각하게 쇠약하게 하는 자가면역 질환인 다발성 경화증(MS)을 앓고 있는 대상체는, 현재 치료가 단지 증상을 완화시키거나 장애의 진행을 지연시키기 때문에, 본원에 기재된 IL-15 폴리펩티드에 의해 특히 도움을 받을 수 있다.

[0273] IL-15의 상승된 혈청 수준은 C형 간염 유발 간 질환 동안 및 간 경변 및 만성 간염에서 관찰되었다. IL-15 수준은 특히 간세포 암종을 앓고 있는 대상체에서 상승된다.

[0274] 유사하게, IL-15 폴리펩티드는 환자의 사고, 기억 및 언어 과정을 심각하게 손상시키는 뇌 장애인 알츠하이머병(AD); 예를 들어, 비정상적인 운동, 강직 및 진전을 특징으로 하는 CNS의 진행성 장애인 파킨슨병(PD); 및 진성 당뇨병과 같은 신경퇴행성 장애를 앓고 있는 대상체에게 특히 유리할 수 있다. 이러한 장애는 진행성이고 쇠약하게 하며, 어떤 치료제도 이용 가능하지 않다.

- [0275] 암 및 관련 상태. 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 IL-15 분자(예: 웨티드)는 IL-15 수용체를 발현시키는 세포의 바람직하지 않은 증식을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 IL-15 웨티드를 코딩하는 핵산 분자 또는 본원에 기재된 IL-15 웨티드를 발현시키는 재조합 세포가 투여될 수 있다. IL-15가 항증식 효과를 발휘하는 작용의 기본 메커니즘의 이해가 본 발명의 실행하는데 필요하지 않지만, 세포 증식은 보체 유도 세포 분해 또는 항체 의존성 세포 독성에 의해 억제될 수 있다.
- [0276] 본원에 기재된 IL-15 웨티드는 암, 예를 들어, 자궁, 경부, 유방, 전립선, 고환, 위장관(예: 식도, 구인두, 위, 소장 또는 대장, 결정 또는 직장), 신장, 신장 세포, 방광, 뼈, 골수, 피부, 두경부, 간, 담낭, 심장, 폐, 췌장, 타액선, 부신, 갑상선, 뇌(예: 신경교정), 신경절, 중추 신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS)의 암, 및 조혈계 및 면역계(예: 비장 또는 흉선)의 암을 포함하는 증식성 상태 또는 장애를 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 또한, 예를 들어, 면역원성 종양, 비면역원성 종양, 휴면 종양, 바이러스 유도 암(예: 상피 세포 암, 내피 세포 암, 편평 세포 암종 및 유두종 바이러스), 선암종, 림프종(예: 피부 T-세포 림프종(CTCL), 암종, 흑색종, 백혈병, 골수종, 육종, 기형종, 화학 유발 암, 전이 및 혈관 신생을 포함하는 다른 암 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0277] 특별한 구현예에서, 종양 또는 암은 하기와 같다: 결장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 신경교아종 또는 백혈병(예: HTLV-1 - 매개된 성인 T-세포 백혈병). 용어(들) 암 관련 질환, 장애 및 상태의 사용은 암과 직접 또는 간접적으로 관련된 상태를 광범위하게 지칭하는 것을 의미하고, 예를 들어, 혈관 신생 및 형성 장애와 같은 전암 상태를 포함한다.
- [0278] 일부 구현예에서, 본 발명은 IL-15 분자 및 예가 본원의 다른 곳에 제시되어 있는 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 진단제를 사용하여 증식성 상태, 암, 종양 또는 전암 상태를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0279] 바이러스성 및 세균성 상태. 바이러스성 및 세균성 질환, 장애 및 상태에서 IL-15의 역할에 대한 관심이 증가하고 있다. IL-15는 이의 수용체 결합 활성 및 다른 인자에 따라 자극 및 억제 효과 둘 다를 생산하는 것으로 가정되었다.
- [0280] 인간 면역결핍 바이러스(HIV)와 관련하여, IL-15는 IL-2의 작용을 모방하는 이의 능력을 통해 두 가지 모순되는 효과를 갖는다. 하나의 효과는 면역 기능의 잠재적으로 유익한 향상이고, 다른 효과는 HIV 복제의 잠재적으로 유해한 활성화이다. 이러한 반대 효과는 또한 다른 바이러스 관련 장애에도 존재한다. IL-15와 바이러스 부하의 변동 사이에서 밀접한 시간적 상관관계가 관찰되었다.
- [0281] 본 발명은 IL-15로의 치료가 유익할 수 있는 임의의 바이러스 질환, 장애 또는 상태의 치료 및/또는 예방하는데 IL-15 폴리웨티드의 사용을 고려한다. 고려되는 바이러스성 질환, 장애 및 상태의 예는 엡스타인-바 바이러스, B형간염, C형 간염, HIV, 단순 포진 바이러스 및 시토메갈로바이러스(CMV)를 포함한다.
- [0282] IL-15는 최근에 특정 세균성 및 다른 침입성 감염과 관련되어 있다. 예로서, 보고는 다음을 나타낸다: 하기에 의해 유발된 감염 전에 재조합 IL-15의 투여: 예를 들어, 살모넬라(Salmonella) 및 플라스모듐 팔시파룸(Plasmodium falciparum)가 유기체에 대한 속주 방어 및 유기체의 클리어런스를 향상시킨다.
- [0283] **약제학적 조성물**
- [0284] 본 발명의 IL-15 폴리웨티드는 대상체에게 투여하기에 적합한 조성물의 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 이러한 조성물은 IL-15 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 "약제학적 조성물"이다. 특정 구현예에서, IL-15 폴리웨티드는 치료적으로 허용되는 양으로 존재한다. 약제학적 조성물은 본 발명의 방법에 사용될 수 있고; 따라서, 예를 들어, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 치료 및 예방 방법 및 용도를 실행하기 위해 대상체에게 생체외 또는 생체내 투여될 수 있다.
- [0285] 본 발명의 약제학적 조성물은 의도된 투여 방법 및 투여 경로에 적합하도록 제형화될 수 있고; 예시적인 투여 경로는 본원에 제시된다. 또한, 약제학적 조성물은 본 발명에 의해 고려되는 질환, 장애 및 상태를 치료하거나 예방하기 위해 본원에 기재된 다른 치료적 활성제 또는 화합물과 함께 사용될 수 있다.
- [0286] 약제학적 조성물은 전형적으로 본 발명에 의해 고려된 치료적 유효량의 IL-15 폴리웨티드 및 하나 이상의 약제학적으로 및 생리학적으로 허용되는 제형화제를 포함한다. 적합한 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제는 산화방지제(예: 아스코르브산 및 중황산나트륨), 방부제(예: 벤질 알코올, 메틸 파라벤, 에틸 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조에이트), 유화제, 혼탁화제, 분산제, 용매, 충전제, 벌크화제, 세정제, 완충제, 비히클, 희석제 및/또는 보조제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 적

합한 비히클은 가능하게는 비경구 투여용 약제학적 조성물에 통상적인 다른 재료로 보충된 생리 식염수 용액 또는 시트레이트 완충 식염수일 수 있다. 중성 완충 생리 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 생리 식염수는 추가의 예시적인 비히클이다. 당업자는 본원에서 고려되는 약제학적 조성물 및 투여 형태에 사용될 수 있는 다양한 완충제를 용이하게 인식할 것이다. 전형적인 완충제는, 약제학적으로 허용되는 약산, 약 염기 또는 이의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예로서, 완충제 성분은 수용성 재료, 예를 들어, 인산, 타르타르산, 락트산, 석신산, 시트르산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 글루탐산 및 이의 염일 수 있다. 허용되는 완충제는, 예를 들어, 트리스 완충제, N-(2-하이드록시에틸)페페라진-N'-(2-에탄설폰산)(HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산(MES), 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산 나트륨 염(MES), 3-(N-모르폴리노)프로판설폰산(MOPS), 및 N-트리스[하이드록시메틸]메틸-3-아미노프로판설폰산(TAPS)을 포함한다.

[0287]

약제학적 조성물이 제형화된 후, 이는 멸균 바이알에 용액, 혼탁액, 젤, 에멀젼, 고체 또는 탈수되거나 동결 건조된 분말로서 저장될 수 있다. 이러한 제형은 즉시 사용 가능한 형태, 사용 전에 재구성이 필요한 동결 건조된 형태, 사용 전에 희석을 필요로 하는 액체 형태 또는 다른 허용되는 형태로 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 단일 사용 용기(예: 단일 사용 바이알, 앰플, 주사기 또는 자동 주입기(예를 들어, EpiPen®과 유사))로 제공되는 반면, 다용도 용기(예: 다용도 바이알)가 다른 구현예에서 제공된다. 임플란트(예: 이식 가능한 펌프) 및 카테터 시스템, 저속 주사 펌프 및 장치를 포함하는 임의의 약물 전달 장치가 IL-15를 전달하기 위해 사용될 수 있고, 이들 모두는 당업자에게 익히 공지되어 있다. 일반적으로 피하 또는 근육내로 투여되는 데포 주사제는 또한 정의된 기간에 걸쳐본원에 개사된 폴리펩티드를 방출시키는데 이용될 수 있다. 데포 주사제는 일반적으로 고체- 또는 오일 기반이고, 일반적으로 본원에 제시된 제형화 성분 중 적어도 하나를 포함한다. 당업자는 데포 주사제의 가능한 제형 및 용도에 친숙하다.

[0288]

약제학적 조성물은 멸균 주사 가능한 수성 또는 유성 혼탁액의 형태로 존재할 수 있다. 이 혼탁액은 본원에 언급된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁화제를 사용하는 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사 가능한 제제는 또한 비독성 경구 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 가능한 용액 또는 혼탁액, 예를 들어, 1,3-부탄 디올 중의 용액으로 존재할 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 희석제, 용매 및 분산 매질은 물, 링거액, 등장성 염화나트륨 용액, Cremophor EL™(BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산염 완충된 생리 식염수(PBS), 에탄올, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 포함한다. 또한, 멸균 비휘발성 오일은 용매 또는 혼탁화 매질로서 통상적으로 사용된다. 이 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 블렌드 비휘발성 오일이 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주사제의 제조에서 용도를 찾는다. 특별한 주사 가능한 제형의 장기한 흡수는 흡수를 지연시키는 제제(예: 알루미늄모노스테아레이트 또는 젤라틴)를 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0289]

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

[0290]

경구 투여에 적합한 정제, 캡슐제 등은 코팅되지 않거나 공지된 기술에 의해 코팅되어 위장관에서 봉해 및 흡수를 지연시키고 이에 의해 지속된 작용을 제공할 수 있다. 예를 들어, 시간 지연 재료, 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 사용될 수 있다. 그들은 또한 제어 방출을 위한 삼투성 치료용 정제를 형성하기 위해 당해 분야에 공지된 기술로 코팅될 수 있다. 추가의 제제는 투여된 조성물의 전달을 조절하기 위해 생분해성 또는 생체적합성입자 또는 중합체성 물질, 예를 들어, 폴리에스테르, 폴리아민 산, 하이드로겔, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리언하이드라이드, 폴리글리콜산, 에틸렌-비닐아세테이트, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 프로타민 세레이트, 또는 락티드/글리콜리드 공중합체, 폴리락티드/글리콜리드 공중합체 또는 에틸렌비닐아세테이트 공중합체를 포함한다. 예를 들어, 경구 제제는 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 또는 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐을 사용하여 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 또는 콜로이드 약물 전달 시스템에 포함될 수 있다. 콜로이드성 분산 시스템은 수중유에멀젼, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 거대분자 복합체, 나노-캡슐, 마이크로스피어, 마이크로비드 및

지질계 시스템을 포함한다. 상기 언급된 제형의 제조방법은 당업자에게 자명할 것이다.

[0291] 경구 용도용 제형은 또한 활성 성분이 불활성 고체 희석제, 예를 들어, 탄산칼슘, 인산칼슘, 카울린 또는 미세 결정성 셀룰로스와 혼합된 경질 젤라틴 캡슐로서, 또는 활성 성분이 물 또는 유성 매질, 예를 들어, 땅콩 오일, 액체 파라핀 또는 올리브 오일과 혼합된 연질 젤라틴 캡슐로서 제공될 수 있다.

[0292] 수성 혼탁액은 이의 제조에 적합한 부형제와 혼합물로 활성 재료를 함유한다. 이러한 부형제는 혼탁화제, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시-프로필메틸셀룰로스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐-피롤리돈, 트라가칸트 겔 및 아카시아 겔; 분산제 또는 습윤제, 예를 들어, 천연 발생 포스파티드(예: 레시틴), 또는 알킬렌과 지방산의 축합 생성물(예: 폴리옥시-에틸렌 스테아레이트) 또는 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방족 알코올(예: 헬타데카에틸렌옥시세탄올의 경우)의 축합 생성물 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨로부터 유래된 부분 에스테르의 축합 생성물(예: 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레이트) 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분 에스테르의 축합 생성물(예: 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레이트)일 수 있다. 수성 혼탁액은 또한 하나 이상의 방부제를 함유할 수 있다.

[0293] 유성 혼탁액은 활성 성분을 식물성 오일, 예를 들어, 아라키스 오일, 올리브 오일, 참기름 또는 코코넛 오일에 또는 액체 파라핀과 같은 광유에 혼탁시킴으로써 제형화될 수 있다. 유성 혼탁액은 중점제, 예를 들어, 밀랍, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올을 함유할 수 있다. 상기 제시된 것들과 같은 감미제, 및 향미제가 맛이 좋은 경우 제제를 제공하기 위해 첨가될 수 있다.

[0294] 물을 첨가하여 수성 혼탁액을 제조하기에 적합한 분산성 분말 및 과립은 분산제 또는 습윤제, 혼탁화제 및 하나 이상의 방법제와 혼합물로 활성 성분을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁화제는 본원에 예시된다.

[0295] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 수중유 에멀젼 형태로 존재할 수 있다. 유상은 식물성 오일, 예를 들어, 올리브 오일 또는 아라키스 오일, 또는 광유, 예를 들어, 액체 파라핀, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 천연 발생 겔, 예를 들어, 아카시아 겔 또는 트라가칸트 겔; 천연 발생 포스파티드, 예를 들어, 대두, 레시틴 및 지방산으로부터 유래되는 에스테르 또는 부분 에스테르; 헥시톨 무수물, 예를 들어, 소르비탄 모노올레이트; 및 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트일 수 있다.

[0296] 제형은 또한 임플란트, 리포솜, 하이드로겔, 프로드럭 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는 조절 방출 제형과 같은, 신체로부터 신속한 분해 또는 제거로부터 조성물을 보호하는 담체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 스테아레이트와 같은 시간지연 재료는 단독으로 또는 왁스와 함께 사용될 수 있다.

[0297] 본 발명은 직장 투여용 좌제 형태로 IL-15 폴리펩티드의 투여를 고려한다. 좌제는 약물을 상온에서 고체이지만 직장 온도에서 액체이고, 따라서 직장에서 용해되어 약물을 방출시키는 적합한 비자극성 부형제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 재료는 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0298] 본 발명에 의해 고려된 IL-15 폴리펩티드는 현재 공지되어 있거나 장래에 개발될임의 다른 적합한 약제학적 조성물(예: 비내 또는 흡입용 스프레이)의 형태로 존재할 수 있다.

[0299] 제형 중의 폴리펩티드 또는 이의 단편의 농도는 광범위하게 가변적일 수 있고(예: 약 0.1중량% 미만, 통상적으로 약 2중량% 또는 적어도 약 2중량% 내지 20중량% 내지 50중량% 이상), 일반적으로, 예를 들어, 선택된 특별한 투여 방식에 따라서 유체 용적, 점도 및 대상체 기반 인자에 기초하여 주로 선택된다.

투여 경로

[0301] 본 발명은 임의의 적합한 방식으로 IL-15 문자, 및 이의 조성물의 투여를 고려한다. 적합한 투여 경로는 비경구(예: 근육내, 정맥내, 피하(예: 주사 또는 임플란트), 복강내, 대장내, 관절내, 복강내, 대뇌내(뇌실질내) 및 뇌실내), 경구, 비강, 질내, 설하, 안내, 직장, 국소(예: 경피), 설하 및 흡입을 포함한다. 일반적으로 피하 또는 근육내 투여되는 데포 주사제는 또한 규정된 시간 동안 본원에 개시된 IL-15 문자를 방출시키는데 이용될 수 있다.

[0302] 본 발명의 특별한 구현예는 비경구 투여를 고려하고, 추가의 구현예에서, 비경구투여는 피하이다.

병용 요법

[0304] 본 발명은 하나 이상의 활성 치료제(예: 사이토카인) 또는 다른 예방적 또는 치료적 방식(예: 방사선)과 병용하

여 IL-15 분자의 사용을 고려한다. 이러한 병용 요법에서, 다양한 활성제는 종종 상이한 상보적 작용 메커니즘을 갖는다. 이러한 병용 요법은 하나 이상의 제제의 용량 감소를 가능하게 하여 하나 이상의 제제와 관련되는 부작용을 감소시키거나 제거함으로써 특히 유리할 수 있다. 또한, 이러한 병용 요법은 기본적인 질환, 장애 또는 상태에 대해 상승작용적 치료 또는 예방 효과를 가질 수 있다.

[0305] 본원에 사용된 바와 같이, "병용"은 별도로 투여될 수 있는, 예를 들어, 개별 투여를 위해 별도로 제형화된 요법(예: 키트로 제공될 수 있다), 및 단일 제형(즉, "공동-제형")으로 함께 투여될 수 있는 요법을 포함하는 것을 의미한다.

[0306] 특정 구현예에서, IL-15 폴리펩티드 및 하나 이상의 활성 치료제 또는 다른 예방적 또는 치료적 양식은 순차적으로 투여되거나 적용될 수 있고, 예를 들어, 하나의 제제는 하나 이상의 다른 제제 이전에 투여된다. 다른 구현예에서, IL-15 폴리펩티드 및 하나 이상의 활성 치료제 또는 다른 예방적 또는 치료적 양식은 동시에 투여되고, 예를 들어, 둘 이상의 제제는 동시에 또는 거의 동시에 투여되고; 둘 이상의 제제는 둘 이상의 개별 제형으로 존재할 수 있거나 단일 제형(즉, 공동-제형)으로 조합될 수 있다. 둘 이상의 제제가 순차적으로 또는 동시에 투여되는지의 여부에 관계없이, 그들은 본 발명의 목적을 위해 병용 투여되는 것으로 간주된다.

[0307] 본 발명의 IL-15 폴리펩티드는 상황하에 적합한 임의의 방식으로 적어도 하나의 다른 (활성) 제제와 병용하여 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제 및 본 발명의 적어도 하나의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 일정 기간 동안 유지된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나 이상의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단되는(예: 대상체가 안정한 경우) 한편, 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 일정한 투여 섭생으로 유지된다. 추가의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단되는(예: 대상체가 안정한 경우) 한편, 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 감소된다(예: 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 섭생). 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 감소되거나 중단되는(예: 대상체가 안정한 경우) 한편, 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 증가된다(예: 고용량, 더 빈번한 투여 또는 더 긴 치료 섭생). 또 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료는 유지되고, 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 감소되거나 중단된다(예: 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 섭생). 또 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 활성제로의 치료 및 본 발명의 IL-15 폴리펩티드로의 치료는 감소되거나 중단된다(예: 저용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 섭생).

[0308] 면역 및 염증성 상태. 본 발명은 면역- 및/또는 염증 관련 질환, 장애 및 상태 뿐만 아니라 이와 관련된 장애를 IL-15 분자 및 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 진단제로 치료하고/하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0309] 병용 요법에 유용한 치료제의 예는 하기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 비스테로이드성 항염증성 약물(NSAID), 예를 들어, 아스피린, 이부프로펜 및 다른 프로페온산 유도체(알미노프로펜, 베녹사프로펜, 부클로식산, 카프로펜, 펜부펜, 페노프로펜, 플루프로펜, 플루르비프로펜, 인도프로펜, 케토프로펜, 미로프로펜, 나프록센, 옥사프로진, 퍼르프로펜, 프라노프로펜, 수프로펜, 티아프로펜산 및 티옥사프로펜), 아세트산 유도체(인도메타신, 아세메타신, 알클로페낙, 클리다낙, 디클로페낙, 펜클로페낙, 펜클로직산, 펜티아작, 푸이로페낙, 이부페낙, 이속세파, 옥스피낙, 술린다, 티오피낙, 톨메딘, 지도메타신 및 조메피락), 페남산 유도체(플루페남산, 메클로페남산, 메페남산, 니플룸산 및 톨페남산), 비페닐카복실산 유도체(디플루니살 및 플루페니살), 옥시캄(이속시캄, 피록시캄, 수독시캄 및 테독시칸), 살리실레이트(아세틸 살리실산, 설파살라진) 및 피라졸론(아파존, 베즈피페릴론페프라존, 모페부타존, 옥시펜부타존, 페닐부타존). 다른 조합은 사이클로옥시개나제-2(COX-2) 억제제를 포함한다.

[0310] 조합을 위한 다른 활성제는 스테로이드, 예를 들어, 프레드니솔론, 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 베타메타손, 텍사메타손 또는 하이드로코르티손을 포함한다. 이러한 조합은, 스테로이드의 하나 이상의 부작용이 필요한 스테로이드 투여량을 감소시킴으로써 감소되거나 심지어 제거될 수 있기 때문에, 특히 유리할 수 있다.

[0311] 예를 들어, 큐마티스성 관절염을 치료하기 위한 조합에 사용될 수 있는 활성제의 추가의 예는 사이토카인 억제성 항염증성 약물(들)(CSAID); 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자의 항체 또는 이의 길항제, 예를 들어, TNF, LT, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 또는 PDGF를 포함한다.

[0312] 활성제의 특별한 조합은 자가면역 및 후속적인 염증성 캐스케이드의 상이한 지점에서 간섭할 수 있고, 하기를 포함한다: TNF 길항제, 예를 들어, 키메라, 인간화 또는 인간 TNF 항체, REMICADE, 항-TNF 항체 단편(예: CDP870), 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 이의 유도체, p75TNFR1gG (ENBREL.) 또는 p55TNFR1gG (LENERCEPT), 가용성 IL-13 수용체 (sIL-13), 및 또한 TNF α -전환 효소 (TACE) 억제제; 유사하게, IL-1 억제제

(예: 인터류킨-1-전환 효소 억제제)가 효과적일 수 있다. 다른 조합은 인터류킨 11, 항-P7s 및 p-셀렉틴 당단백질 리간드(PSGL)를 포함한다. 본원에 기재된 IL-15 폴리펩티드와의 조합에 유용한 제제의 다른 예는 인터페론- β 1a (AVONEX); 인터페론- β 1b (BETASERON); 코파손; 고암 산소; 정맥내 면역글로불린; 클라브리빈; 및 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자에 대한 항체 또는 이의 길항제(예: CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체)를 포함한다.

[0313] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0314] 앞 및 관련 상태. 본 발명은 증식성 상태; 암, 종양 또는 전암 질환, 장애 또는 상태를 IL-15 분자 및 하나의 추가의 치료제 또는 진단제로 치료하고/하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0315] 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오텐파 및 사이클로스포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프루설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카보구온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스파오라미드 및 트리메틸올로멜라미nę를 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 질소 머스타드, 예를 들어, 키오람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜필란, 노벰비킨, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어, 카무슨, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예를 들어, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칙티노마이신, 칼리키아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사산물, 예를 들어, 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어, 테노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시풀루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예를 들어, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노글루테티미드; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미토크산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; 라족산; 시조페란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노시드(Ara-C); 사이클로포스파미드; 티오텐파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탈셀; 클로람부실; 겨시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 및 백금 배위 쟈물, 예를 들어, 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미토크산트론; 빙크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT11; 토포아이소미라제 억제제; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 래티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 중의 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0316] 화학요법제는 또한 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항호르몬제, 예를 들어, 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제성 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, 오나프리스톤 및 토레미펜을 포함하는 항에스트로겐제; 및 항안드로겐제, 예를 들어, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 상기 중의 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 특정 구현예에서, 병용 요법은 호르몬 또는 관련 호르몬제의 투여를 포함한다.

[0317] IL-15 폴리펩티드와 조합하여 사용될 수 있는 추가의 치료 양식은 사이토카인 또는 사이토카인 길항제, 예를 들어, IL-12, INF α , 또는 항-상피 성장 인자 수용체, 방사선 요법, 또 다른 종양 항원에 대한 모노클로날 항체, 모노클로날 항체와 독소의 복합체, T-세포 보조제, 골수 이식, 또는 항원 제시 세포(예: 수지상 세포 요법)를 포함한다. 백신(예를 들어, 가용성 단백질로서 또는 단백질을 코딩하는 핵산으로서)도 또한 본원에 제공된다.

[0318] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0319] 바이러스성 및 세균성 상태. 본 발명은 바이러스성 질환, 장애 및 상태 뿐만 아니라 이와 관련된 장애를 IL-15 분자 및 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 진단제(예: 하나 이상의 항바이러스성 제제 및/또는 바이러스 요법

과 관련되지 않는 하나 이상의 제제)로 치료하고/하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0320] 이러한 병용 요법은 다양한 바이러스 라이프-사이클 단계를 표적화하고, 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 상이한 작용 메커니즘을 갖는 항바이러스제를 포함한다: 바이러스 비코팅의 억제제(예: 아만타딘 및 리만티딘); 역전사 효소 억제제(예: 아시클로비르, 지도부딘 및 라미부딘); 인테그라제를 표적화하는 제제; 전사 인자의 바이러스 DNA에의 부착을 차단하는 제제; 번역에 영향을 미치는 제제(예: 앤티센스 분자)(예: 포미비르센); 번역/리보자임 기능을 조절하는 제제; 프로테아제; 바이러스 어셈블리 조절제(예: 리팜피신); 및 바이러스 입자의 방출을 억제하는 제제(예: 자나미비르 및 오셀타미비르). 하기의 치료 및/또는 예방: 특정 바이러스 감염(예: HIV)은 종종 항바이러스제의 그룹("각테일")을 수반한다.

[0321] IL-15 폴리펩티드와 조합하여 사용하기 위해 고려되는 다른 항바이러스제는 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 아바카비르, 아데포비르, 아만타딘, 암프레나비르, 암플리겐, 아르비돌, 아타자나비르, 아트리풀라, 보세프레비레트테트, 시도포비르, 콤비비르, 다루나비르, 엘라비르딘, 디다노신, 도코사놀, 에독수딘, 에파비렌츠, 엠트리시타빈, 엔푸비르티드, 엔테카비르, 팜시클로비르, 포삼프레나비르, 포스카르네트, 포스포네트, 간시클로비르, 이마시타빈, 이무노비르, 이독수리딘, 이미퀴모드, 인디나비르, 이노신, 다양한 인터페론(예: 페그인터페론 알파-2a), 로피나비르, 로비리드, 마라비록, 모록시딘, 메티사존, 넬피나비르, 네비라핀, 넥사비르, 펜시클로비르, 페라미비르, 플레코나릴, 포도릴로톡신, 랠테그라비르, 리바비린, 리토나비르, 피라미딘, 사퀴나비르, 스타부딘, 텔라프레비르, 테노포비르, 티프라나비르, 트리플루리딘, 트리지비르, 트로만타딘, 트루바다, 발라시클로비르, 발간시클로비르, 비크리비록, 비다라빈, 비라미딘, 및 잘시타빈.

[0322] 막대형 그람 음성 세균의 살모넬라(Salmenella) 속의 IL-15 치료는 현재 개발중인 백신과 조합하여 가장 효과적인 것으로 간주된다. 플라스모듐 팔시파룸(Plasmodium falciparum) 기생충의 치료를 위한 병용 요법과 관련하여, 항말라리아 약물(예: 콜로르퀸) 및 아르테미시니스가 IL-15 웨პ티드와의 병용 요법에 효과적일 수 있다.

[0323] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

투여

[0325] 본 발명의 IL-15 폴리펩티드는, 예를 들어, 투여 목적(예: 목적하는 분해도); 제형이 투여되는 대상체의 연령, 체중, 성별 및 건강 및 신체 조건; 투여 경로; 및 질환, 장애, 상태 또는 이의 증상의 성질에 의존하는 양으로 대상체에게 투여될 수 있다. 투여 섭생은 투여되는 제제(들)와 관련되는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도를 고려할 수 있다. 효과적인 투여량 및 투여 섭생은, 예를 들어, 안전성 및 용량 증가 시험, 생체내연구(예: 동물 모델), 및 당업자에게 공지된 다른 방법으로부터 용이하게 결정될 수 있다.

[0326] 일반적으로, 투여 파라미터는, 투여량이 대상체에게 비가역적으로 독성일 수 있는 양(최대 허용 용량(MTD)) 미만 및 대상체에서 측정가능한 효과를 생성하기 위해 필요한 양 이상이어야 한다고 지시한다. 이러한 양은, 예를 들어, 투여 경로 및 다른 인자를 고려하여 ADME와 관련된 약동학적 및 약력학적 파라미터에 의해 결정된다.

[0327] 유효 투여량(ED)은 그것을 복용하는 대상체의 일부분에서 치료 반응 또는 목적하는 효과를 생성하는 제제의 투여량 또는 양이다. 제제의 "중간 유효 투여량" 또는 ED50은 그것이 투여되는 집단의 50%에서 치료 반응 또는 목적하는 효과를 생성하는 제제의 투여량 또는 양이다. ED50은 일반적으로 제제의 효과의 합리적인 기대치의 척도로서 사용되지만, 임상의가 모든 관련 인자를 고려하여 적절하다고 간주할 수 있는 투여량일 필요는 없다. 따라서, 일부 상황에서, 유효량은 계산된 ED50 이상이고, 다른 상황에서 유효량은 계산된 ED50 미만이고, 또 다른 상황에서 유효량은 계산된 ED50과 동일하다.

[0328] 또한, 본 발명의 IL-15 분자의 유효 투여량은, 대상체에게 1회 이상의 투여량으로 투여되는 경우, 건강한 대상체에 비해 목적하는 결과를 생성하는 양일 수 있다. 예를 들어, 특별한 장애를 앓고 있는 대상체의 경우, 유효 투여량은 그 장애의 진단 파라미터, 척도, 마커 등을 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 90% 이상까지 향상시키는 양일 수 있고, 여기서 100%는 정상 대상체가 나타내는 진단 파라미터, 척도, 마커 등으로서 정의된다. 본원에 기재된 질환, 장애 또는 상태를 치료하는데 필요한 IL-15 분자의 양은 당해 분야에 공지된 IL-15 활성 검정에 의해 결정될 수 있는 접합된 단백질의 IL-15 활성을 기본으로 한다.

[0329] IL-15 분자의 치료적 유효량은 약 0.01 내지 약 100 μg 단백질/kg 체중/일, 약 0.1 내지 20 μg 단백질/kg 체중/일, 약 0.5 내지 10 μg 단백질/kg 체중/일, 또는 약 1 내지 4 μg 단백질/kg 체중/일 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, IL-15 분자의 치료적 유효량은 약 1 내지 16 μg 단백질/kg 체중/일 범위일 수 있다. 본 발명은 전

달하기 위해 연속 주입에 의한 IL-15 분자의 투여, 예를 들어, 약 50 내지 800 μg 단백질/kg 체중/일을 고려한다. 주입 속도는, 예를 들어, 부작용 및 혈구수의 평가에 기초하여 변할 수 있다.

[0330] 경구 제제의 투여를 위해, 조성물은 활성 성분 1.0 내지 1000mg, 특히 활성 성분 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0 또는 1000.0mg을 함유하는 정제, 캡슐제 등의 형태로 제공될 수 있다.

[0331] 특정 구현예에서, 개시된 IL-15 폴리펩티드의 용량은 "단위 투여 형태"로 함유된다. "단위 투여 형태"란 어구는 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 목적하는 효과를 생성하기에 충분한 본 발명의 IL-15 폴리펩티드의 소정량을 단독으로 또는 하나 이상의 추가의 제제와 함께 함유한다. 단위 투여 형태의 파라미터는 특별한 제제 및 달성되는 효과에 의존한다는 것이 이해된다.

키트

[0333] 본 발명은 또한 IL-15, 및 이의 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 고려한다. 키트는 일반적으로 이하 기재되는 바와 같이 다양한 성분을 수용하는 물리적 구조의 형태이고, 예를 들어, 본원에 기재된 방법을 실시하는데 이용될 수 있다.

[0334] 키트는 (예를 들어, 멸균 용기에 제공된) 본원에 개시된 하나 이상의 IL-15 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 이는 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물의 형태일 수 있다. IL-15 폴리펩티드는 사용할 준비가 되거나, 예를 들어, 투여 전에 재구성 또는 희석을 필요로 하는 형태로 제공될 수 있다. IL-15 폴리펩티드는 사용자에 의해 재구성될 필요가 있는 형태로 존재하고, 키트는 또한 IL-15 폴리펩티드와 함께 또는 별도로 포장된 완충제, 약제학적으로 허용되는 부형제 등을 포함할 수 있다. 병용 요법이 고려될 경우, 키트는 여러 제제를 별도로 함유할 수 있거나, 그들은 이미 키트로 조합될 수 있다. 키트의 각 성분은 개별 용기 내에 포함될 수 있고, 다양한 용기 모두는 단일 패키지 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 키트는 내부에 수용된 성분을 적절히 유지시키기 위해 필요한 조건(예: 냉동 또는 동결)을 위해 설계될 수 있다.

[0335] 키트는 내부의 성분에 대한 식별 정보 및 사용 지침(예: 투여 파라미터, 작용 메커니즘, 약물동태학 및 약력학을 포함하는 활성 성분(들)의 임상 약리학, 부작용, 금기사항 등)을 포함하는 라벨 또는 포장 삽입물을 함유할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 로트 번호 및 유효 기간과 같은 제조업자 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은, 예를 들어, 성분을 수용하는 물리적 구조에 통합되거나 물리적 구조 내에 별도로 함유되거나 키트의 성분(예: 앰플, 튜브 또는 바이알)에 부착될 수 있다.

[0336] 라벨 또는 삽입물은 디스크(예: 하드 디스크, 카드, 메모리 디스크), CD- 또는 DVD-ROM/RAM과 같은 광학 디스크, DVD, MP3, 자기 테이프, 또는 RAM 및 ROM과 같은 전기 저장 매체 또는 자기/광학 저장 매체, 플래시 매체 또는 메모리-타입 카드와 같은 이들의 하이브리드와 같은 컴퓨터 판독 가능한 매체를 추가로 포함하거나 이에 통합될 수 있다. 일부 구현예에서, 실제 지침은 키트에 존재하지 않지만, 원격 공급원으로부터, 예를 들어, 인터넷을 통해 지침을 수득하는 수단이 제공된다.

실험

[0338] 하기 실시예는 본 발명을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되며, 발명자가 그들의 발명으로 간주하는 범위를 제한하는 것을 의도하지 않고, 그들은 이하 실험이 수행되었고 수행될 수 있는 모든 실험임을 나타내고자 의도하지 않는다. 본 시제로 기술된 예시적 설명은 반드시 수행될 필요는 없고, 오히려 설명이 본원에 기재된 데이터 등을 생성하기 위해 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 사용된 숫자(예: 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위한 노력이 수행되었지만, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다.

[0339] 다르게 기술되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도($^{\circ}\text{C}$)이고, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다.

[0340] 하기를 포함하는 표준 약어가 사용된다: bp = 염기쌍(들); kb = 킬로베이스(들); pl = 피코리터(들); s 또는 sec = 초(들); min = 분(들); h 또는 hr = 시간(들); aa = 아미노산(들); kb = 킬로베이스(들); nt = 뉴클레오티드(들); ng = 나노그램; μg = 마이크로그램; mg = 밀리그램; g = 그램; kg = 킬로그램; dL 또는 mL = 데시리터; μl 또는 μL = 마이크로리터; mL 또는 mL = 밀리리터; l 또는 L = 리터; nM = 나노몰; μM = 마이크로몰; mM = 밀리몰; M = 몰; kDa = 킬로달톤; i.m.= 근육내(로); i.p.= 복강내(로); s.c.= 피하(로); QD = 매일; BID = 1일 2회; QW = 매주; QM = 매월; HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피; BW = 체중; U = 단위; ns

= 통계적으로 유의하지 않음; PBS = 인산염 완충된 식염수; PCR = 폴리머라제 연쇄 반응; NHS = N-하이드록시석 신이미드; DMEM = 이글 배지의 둘베코 변형; GC = 계놈 카페; ELISA = 효소 결합 면역 흡착 검정; EDTA = 에틸렌디아민테트라아세트산; PMA = 포르볼 미리스테이트 아세테이트; rhIL-15 = 재조합 인간 IL-15; LPS = 리포다당류.

[0341] 재료 및 방법

하기 일반적 재료 및 방법이 이하 실시예에 사용될 수 있다:

[0343] 분자 생물학의 표준 방법이 기재되어 있다(참조: 예를 들어, Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; 및 Ausubel, 등 (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N. Y., 이는 하기로 기재한다: 세균 세포에서 클로닝 및 DNA 돌연변이 생성 (Vol.1), 포유동물 세포 및 효모에서 클로닝 (Vol.2), 당접합체 및 단백질 발현 (Vol.3), 및 생물 정보학 (Vol.4)).

[0344] 과학 문헌은 면역침전, 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리 및 결정화 뿐만 아니라 화학적 분석, 화학적 변형, 번역후 변형, 융합 단백질의 생산 및 단백질의 글리코실화를 포함하는 단백질 정제 방법을 기재한다(참조: 예를 들어, Coligan, 등 (2000) Current Protocols in Protein Science, Vols.1-2, John Wiley and Sons, Inc., NY).

[0345] 폴리클로날 및 모노클로날 항체의 생산, 정제 및 단편화가 기재되고(예: Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY); 리간드/수용체 상호작용을 특성화하는 표준 기술이 이용 가능하고(참조: 예를 들어, Coligan 등 (2001) Current Protocols in Immunology, Vol.4, John Wiley, Inc., NY); 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함하는 유동 세포 계측법이 이용 가능하고(참조: 예를 들어 Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ); 예를 들어, 진단 시약으로서 사용하기 위한, 핵산 프라이머 및 프로브, 폴리펩티드 및 항체를 포함하는 핵산을 변형시키는데 적합한 형광 시약이 이용 가능하다(Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO.).

[0346] 면역계의 조직학의 표준 방법이 기재되어 있다(참조: 예를 들어, Louis 등 (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NY).

[0347] 면역 세포(CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포)의 결실은 항체 매개 제거에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 250 µg의 CD4- 또는 CD8-특이적 항체를 매주 주사할 수 있고, 세포 결실은 FACS 및 IHC 분석을 사용하여 검증할 수 있다.

[0348] 예를 들어, 항원성 단편, 리더 서열, 단백질 폴딩, 기능적 도메인, 글리코실화 부위 및 서열 정렬을 결정하기 위한 소프트웨어 패키지 및 데이터베이스가 이용 가능하다(참조: 예를 들어, GCG 워스콘신 패키지 (Accelrys, Inc., San Diego, CA); 및 DeCypher™ (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV)).

[0349] 면역적격 Balb/C 또는 B-세포 - 결핍 Balb/C 마우스는 하기로부터 입수될 수 있고: The Jackson Lab., Bar Harbor, ME, 표준 절차에 따라서 사용될 수 있다(참조: 예를 들어, Martin et al (2001) Infect. Immun., 69(11): 7067-73 and Compton 등 (2004) Comp. Med. 54(6): 681-89). 본 발명에 의해 고려되는 실험 작업에 적합한 다른 마우스 균주는 당업자에게 공지되어 있고, 일반적으로 하기로부터 이용 가능하다: The Jackson Lab. 당업자는 본 발명을 실시하는데 또한 사용될 수 있는 모델 및 세포주(예: 염증 모델)에 친숙하다.

[0350] 혈청 IL-15 농도 수준 및 노출 수준은 당해 분야에 사용되는 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 혈청 노출 수준 검정은 마우스 꼬리 절단으로부터 플레이 모세관으로 전혈(약 50 µL/마우스)을 수집하고, 원심분리로 혈청 및 혈액 세포를 분리하고, 다음에 의해 IL-15 노출 수준을 결정함으로써 수행될 수 있다: 표준 ELISA 키트(예: R&D 시스템) 및 기술. 대안적으로, 또는 또한, 이하 기재된 ELISA 프로토콜(또는 유사한 프로토콜)은 뮤테인 또는 변형된 뮤테인의 생체내 반감기를 결정하는 수단으로서 인간 IL-15의 혈청 수준을 측정하도록 조정될 수 있다.

[0351] 뮤테인의 생성 및 평가

[0352] 인간 IL-15 발현 벡터, pSecTag2hygro-huIL15의 어셈블리. 인간 IL-15 포유동물 발현 벡터는 DNA 주형 및 프라이며 5'-tataGGCCAGCCGCCgcgcaccATGAGAATTCTGAAACCACATTGAG-3' (서열번호: 34) 및 5'-tatagggcccTCAAGAAGTGTTGATGAACATTGG-3' (서열번호: 35)로서 pCMV6-AC-인간-IL15(Origene #SC324164,

Genbank 수탁 #NM_000585.4)를 사용하는 백금 Pfx DNA 폴리머라제 (Life Technologies #11708-039, 제조업자의 프로토콜에 따라)를 사용하여 PCR을 통해 완전 인간 IL-15 개방 판독 프레임을 증폭시킴으로써 조립될 수 있고, 생성되는 PCR 반응은 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen #28106)를 사용하여 정제될 수 있다. 정제된 인간 IL-15 PCR 단편 및 포유동물 발현 벡터 pSecTag2hygro (B)(Life Technologies #V910-20)는 pSecTag2hygro (B) 소화에 첨가된 송아지 장 포스파타제(New England Biolabs, Ipswich, MA)를 사용하여 37C에서 1시간 동안 SfiI 및 ApaI (New England Biolabs, Ipswich, MA)로 소화시켰다. 소화된 DNA 단편은 1% 아가로스 겔(Lonza #54803)에서 1시간 동안 100V에서 작동시킨 다음, 절단하고 QIAquick 겔 추출 키트(Qiagen #28706)를 사용하여 정제할 수 있다. 인간 IL-15 PCR 단편은 신속한 DNA 결찰 키트(Roche #11635379001)를 사용하여 pSecTag2hygro (B) 벡터에 결찰시키고, One Shot TOP10 화학적 적격 이. 콜리(Life Technologies #C404006)로 형질전환시키고, 100 μg/mL 암피실린을 함유하는 한천 플레이트에 플레이팅하고, 37C에서 밤새 성장시킬 수 있다. 다음 날, 세균 콜로니를 개별적으로 집어 LB + 100 μg/mL 암피실린을 함유하는 3 mL 배양물에 넣고, 200 RPM의 진탕 배양기에서 37C에서 8 내지 20시간 동안 성장시킬 수 있다. 이어서, 각 배양물 2 mL를 2 mL 튜브에 분액화하고, 세포를 10 분 동안 탁상 원심분리기에서 6000 RPM으로 펠렛화하고, 배지를 흡인시키고, QIAprep Spin Miniprep 키트 (Qiagen #27106)를 사용하여 DNA를 세균으로부터 정제할 수 있다. 올바른 발현 벡터는 DNA 서열분석 (MC Lab, South San Francisco, CA)을 통해 동정될 수 있다.

[0353] 뮤테인 발현 벡터의 생성. 인간 IL-15 뮤테인 발현 벡터는 다음 설명과 함께 제조업자의 프로토콜에 따라 Quikchange II 부위 지시된 돌연변이 생성 키트 (Agilent Technologies #200524)를 사용하여 이미 기재된 인간 IL-15 포유동물 발현 벡터 pSecTag2hygro-huIL-15를 돌연변이시킴으로써 조립되었다: 프라이머는 항상 권장된 Tm을 충족시키지는 않았고; PCR 반응은 6 내지 7분의 연장 시간으로 16 내지 18회 반복하였고; 4 μL의 DpnI - 처리된 반응물을 이전에 기재된 바와 같이 One Shot TOP10 화학적 적격 세포 (Life Technologies #C404006)로 형질전환시켰다. 3 mL miniprep 배양물을 이미 기재된 바와 같이 성장시키고, 정제하고 서열을 검증하였다. 일부 뮤테인을 위해, 400 mL 배양물을 성장시키고 정제했다. 간단하게, 하나의 세균 콜로니를 400 mL LB + 100 μg/mL 암피실린에 집어 넣고, 2L 배플 삼각 플라스크에서 200RPM의 진탕 배양기에서 37C에서 12 내지 20시간 동안 성장시켰다. 이어서, 배양물을 원심분리기 (JA-10 로터로 20분 동안 Beckman Avanti J-25T에서 6000 RPM으로)에서 펠렛화하고, 배지를 흡인시키고, DNA를 제조업자의 프로토콜에 따라 (최종 DNA 농도를 증가시키기 위해 DNA 침전 방법에 수행된, 당업자에게 친숙한 형태의 매우 최소한의 변화로) EndoFree 플라스미드 메가 키트 (Qiagen, #12381)를 사용하여 추출시켰다.

[0354] 다수의 아미노산 변화를 필요로 하는 뮤테인은 한 번에 하나의 돌연변이를 삽입함으로써 조립되었다. N-글리코실화 모티프, N-X-S 및 N-X-T의 도입은 X ≠ P (프롤린)이기 때문에 때로는 3개의 돌연변이의 도입을 필요로 했다. 뮤테인에 사용되는 넘버링 규칙은 시작 코돈을 제1 위치에 할당하므로, 첫번째 48개 잔기 (MRISKPHLRSISIQCYLCLLNNSHLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEA (서열번호: 36))는 단일 펩티드를 포함하고, 성숙한 단백질의 제1 잔기는 아스파라긴 49일 것이다.

[0355] 단백질 형질감염 프로토콜. 모든 인간 IL-15 발현 벡터(야생형 및 뮤테인)는 HEK293FT 세포 (Life Technologies #R700-07)에서 일시적으로 발현될 수 있다. 세포는 T175 플라스크 (Greiner One/CellStar #660175) 중 5% CO2에서 37C에서 50 mL의 DMEM (Life Technologies #11995-073) + 10% 특성화된 태아 소 혈청 (Hyclon/Thermo Scientific #SH30071.03) + 1X 페니실린/스트렙토마이신 (Life Technologies #15140-122)에서 유지시킬 수 있다. 합류점(confluence)에 도달시, 세포를 10 mL의 PBS + 5 mM EDTA로 분리시키고, 세포를 추가의 10 mL의 성장 배지로 수집하고, 원심분리기 (Beckman Allegra 6R)에서 1000 RPM에서 펠렛화하고, 배지를 흡인시키고, 세포를 새로운 배지에 재현탁시킨 다음, 각각 45 mL의 성장 배지를 함유하는 3개의 T175 플라스크에 나눌 수 있다.

[0356] 모든 발현 벡터는 6-웰 플레이트 또는 T175 플라스크로 형질감염시킬 수 있다. 6-웰 플레이트 형질감염의 경우, Hek293FT 세포는 합류 T175 플라스크로부터 수거할 수 있고, 세포를 상기한 바와 같이 수집한 다음, 20 mL의 새로운 성장 배지에 재현탁시킨다. 2 mL의 새로운 배지를 함유하는 6-웰 플레이트 (Falcon #353046)의 각 웰에 700 μL의 세포 혼탁액을 첨가하고, 기재된 바와 같이 밤새 성장시켰다. 다음 날, 세포를 하기 프로토콜을 사용하여 리포펙타민 2000 (Life Technologies #1388795)을 사용하여 형질감염시킬 수 있다: 250 μl의 OptiMEMI 감소 혈청 배지 (Life Technologies #31985-088)를 두 개의 예펜도르프 튜브에 분액화할 수 있고, 이어서 10 μL의 리포펙타민 2000 형질감염 시약 (Life Technologies #1388795)을 한 분액에 첨가하고, 4 μg의 DNA를 다른 분액에 첨가할 수 있다. 두 용액을 실온에서 5분 동안 별도로 배양한 다음, 두 용액을 조합하고, 그들을 실온에서 추가의 30분 동안 배양함으로써 형질감염 복합체를 형성시킬 수 있다. 이어서, 완전한 500 μL 혼합물을

6-웰 플레이트 중의 하나의 웰에 적가하고, 4시간 동안 배양기로 반환시킬 수 있다. 이어서, 형질감염 배지를 흡인시킨 다음, DMEM + 폐니실린/스트렙토마이신으로 대체하고, 약 36시간 동안 성장시킬 수 있다. 이어서, 조절된 배지를 수거하고, 4C에 저장할 수 있다. 이어서, T175-플라스크를 하기의 예외와 함께 상기한 바와 같이 형질감염시킬 수 있다: 42 내지 45 mL의 성장 배지를 갖는 T175 플라스크를 형질감염 전에 95% 합류점으로 성장시킬 수 있고, 형질감염 복합체는 175 μ L의 리포펙타민 2000을 4.4 mL OptiMEM I에, 75~100 μ uL의 DNA를 두 번째 4.4 mL의 OptiMEM I에 첨가함으로써 형성될 수 있다. 형질감염 복합체의 흡인시, 50 mL의 배지를 각 플라스크에 첨가할 수 있다.

[0357] 모의 형질감염은 빈 pSecTag2hygro (B) 발현 벡터를 함유하거나 어떤 DNA도 함유하지 않을 수 있고, 상기한 바와 같이 제조될 수 있다.

[0358] 인간 IL-15 검출 ELISA. 96-웰 플레이트 (Nunc Maxisorp #442404)를 4C에서 밤새 하기로 코팅시키고: 100 μ L/웰 PBS + 1 μ g/mL 항-인간 IL-15 항체(예: ATCC HB-12062, 클론 M111, Manassas, VA), DPBS-Tween 20 (Teknova #P0297) 중에서 6 X 200 μ L로 세척하고, 진동 플랫폼 상에서 실온에서 2시간 동안 200 μ L/웰 PBS + 5% BSA (Calbiochem #2960)에서 차단하고, 상기한 바와 같이 세척할 수 있다. 샘플을 PBS로 연속 희석할 수 있고, 100 μ L/웰을 검정 플레이트에 첨가할 수 있다. 샘플은 2회 또는 3회 실행할 수 있다. 양성 대조군으로서, 정제된 인간 IL-15가 첨가될 수 있는 반면, 모의 형질감염으로부터 완충제 또는 조절된 배지는 음성 대조군으로서 사용될 수 있고, 둘 다 연속 희석된다. 샘플을 진동 플랫폼 상에서 4 °C에서 밤새 배양한 다음, 상기한 바와 같이 세척할 수 있다. 100 μ L/웰의 PBS + 항-인간-IL-15 항체(예: ab7213; Abcam)를 각 웰에 첨가할 수 있고, 진동 플랫폼 상에서 실온에서 1시간 동안 배양하고, 상기한 바와 같이 세척한 다음, 100 μ L/웰의 당나귀 항-래빗 IgG (H+L)-HRP (Jackson Immuno Research # 711-035-152, 1: 10,000로 희석됨)를 첨가하고, 진동 플랫폼 상에서 실온에서 추가의 1시간 동안 배양할 수 있다. 플레이트를 기재된 바와 같이 세척할 수 있고, 100 μ L/웰의 1-Step Ultra TMB-ELISA (Pierce/Thermo #34029)로 1 내지 5분 동안 전개시킨 다음, 반응을 100 μ L/웰 중지 용액 (Life Technologies #SS04)으로 중지시켰다. 플레이트는 Molecular Devices M2 플레이트 판독기 상에서 450nm에서 판독할 수 있다.

[0359] 또 다른 ELISA 포맷은 (예를 들어, 인간 IL-15 Quantikine ELISA 키트 (R&D Systems #D1500, Minneapolis, MN)에서 제조업자의 권장된 프로토콜에 따라) 사전 제조된 키트를 포함할 수 있었다.

[0360] 야생형 및 뮤테인 인간 IL-15의 정제. 항-인간-IL-15 항체(예: ATCC HB-12062, 클론 M111, Manassas, VA)는 CNBr-활성화 세파로스 4 패스트풀로우 (GE Healthcare #71-5000-15 AF, 제조업자의 프로토콜에 따라)에 결합시키고, PBS로 평형화시킬 수 있다. 500 μ L 내지 1mL의 M111-세파로스를 유리 에코노-컬럼 (Bio-Rad, Hercules, CA)에 함유된 조절 배지 100 mL당 첨가하고, 진동 플랫폼 상에서 실온에서 1 내지 2시간 동안 배양할 수 있다. 배지를 중력 흐름을 통해 컬럼을 통해 작동시키고, 1X PBS (pH 7.4)로 1X 세척하고, 0.1M 글리신(pH 2.9)으로 용출시키고, 10용적%의 1M 트리스 완충제(pH 8.0)로 중화시킬 수 있다. 단백질을 농축시키고, 아미콘 울트라 원심 필터 장치 (Millipore, Billerica, MA; 5,000 kD 분자량 컷오프)를 완충제를 사용하여 PBS (pH 7.4)로 교환 할 수 있다. 단백질 농도는 280nm에서 분광 광도계로 결정될 수 있다.

[0361] SEC 분석 단백질. 1100 시리즈 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 사용하여, 20~50 μ g의 단백질을 TSK3000sw 컬럼 (Tosoh Biosciences, Tokyo, JP) 상에 주사하고, PBS (pH 7.4)로 평형화하고, 1 mL/분의 유속으로 작동시킬 수 있다.

IL-15의 폐길화

[0363] PEG (NOF Corporation, Japan)는 pH 4 내지 8에서 100mM NaCl을 갖는 50mM 포스페이트로 10 내지 100 mg/mL의 농도로 희석시킬 수 있고, 인간 IL-15는 PBS, pH 7.4로 2 내지 10 mg/mL의 농도로 희석시킬 수 있다. 최종 반응 혼합물을 10: 1 내지 2: 1- 비 범위(PEG: 인간 IL-15)로 PEG 및 인간 IL-15, 및 최종 농도 5 내지 50mM의 수소화시아노봉소나트륨을 포함할 수 있다. 반응물을 4 °C 내지 25 °C에서 2 내지 48시간 동안 배양할 수 있다. 목적하는 단백질 종 및/또는 완충제 교환을 선택하기 위해, 폐길화 단백질은 (상기한 바와 같이) SEC를 통해 분획화될 수 있고, 또는 폐길화 반응 혼합물 및/또는 완충제 교환에서 대부분의 비단백질 종을 제거하기 위해, PEG-IL-15 반응 혼합물을 한의 여과 단계를 거칠 수 있다(예를 들어, Millipore Labscale TFF 시스템은 5kDa 분자량 컷오프로 재생된 셀룰로스(PLCGC) 막과 함께 사용될 수 있다).

IL-15의 변형된 형태의 생체 활성을 결정하기 위한 검정

[0365] 본 발명은 본원에 기재된 IL-15 분자의 생체 활성을 결정하기 위한 당해 분야에 공지된 임의의 검정 및 방법의

사용을 고려한다. 이후 기재된 검정은 대표적이고, 배타적이지 않다.

- [0366] CTL-2 세포 증식 검정. 소만 등(Soman 등)(J Immunol Methods 348(1-2): 83-94 (2009 August 31))은 IL-15 생물학적 활성을 정량적으로 추산하기 위해 가용성 CellTiter96 Aqueous One Reagent (Promega; Madison, WI)을 사용하여 CTL-2의 최적화된 테트라졸륨 염료계 표색 세포 증식 검정을 설명한다. CTL-2는 IL-2 의존성 뮤린 세포주이다.
- [0367] 소만 등에 의해 기재된 것과 실질적으로 유사한 CTL-2 세포 증식 검정이 IL-15 생물학적 활성을 결정하기 위해 본원에 사용되었다. 간략하게, CTL-2 세포(ATCC TIB-214, Manassas, VA)는 10% FBS 및 10% T-STIM (Corning #354115, Tewsbury, MA)이 보충된 RPMI 1640 (Life Technologies, 11875-093, Grand Island, NY)에서 배양했다. 세포를 10,000 세포/mL 내지 100,000 세포/mL의 밀도로 5% CO₂로 보충된 37 °C에서 유지시키고, 그들이 대수 상(전형적으로 해동 후 2 내지 3주; 세포 생존율 ≥ 95%)으로 성장되고 있을 때 수거하고, T-STIM 없는 성장 배지 20mL로 4회 세척했다(1000 rpm에서 원심분리로, 5분). 이어서, T-STIM 없는 성장 배지 100 μL 중의 25,000 세포/웰을 투명한 96-웰 조직 배양 플레이트로 분액화하고, 단백질이 희석되는 동안 배양기로 반환시켰다. IL-15 샘플을 검정 배지에 이어, 일련의 2배 희석률로 8 ng/mL의 초기 농도로 희석한 다음, 100 μL를 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 첨가하고, 48시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기로 반환시켰다. 48시간 배양 기간 후, CellTiter96® Aqueous One Solution을 첨가하고(20 μL/웰), 혼탁액을 37 °C 및 5% CO₂에서 추가의 1 내지 4기간 동안 배양했다. 플레이트를 490nm에서 판독하고, 배지를 포함하는 웰의 배경 판독치는 샘플 웰 판독치로부터 뺀다.
- [0368] M07e 세포 증식 검정. 문현[참조: Kanakura 등 (Blood 76(4): 706-15 (1990 August 15)); Caliceti 등 (PLoS One 7(7): e41246. doi: 10.1371/journal.pone.0041246 (2012)); 및 Zauner 등 (BioTechniques 20: 905-13 (May 1996))]은 증식이 IL-3 또는 GM-CSF 의존적인 인간 백혈병 거핵구 세포주인 M07e를 사용하는 세포 증식 검정을 기재한다. M07e 세포는 하기로부터 구입할 수 있다: DSMZ (DSMZ 번호ACC 104; Braunschweig, Germany).
- [0369] M07e 세포주는 10% FBS, rhGM-CSF (10 ng/mL) 또는 rhIL-3(10 ng/mL)으로 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco, Grand Island, NY)에서 배양할 수 있거나; 또는, 세포는 5% FCS 및 10 ng/mL IL3으로 보충된 IMDM에서 배양할 수 있다. M07e 세포의 인자 유도된 증식을 정량화하기 위해 MTT [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (Sigma) 도입을 사용할 수 있다. 간략하게, M07e 세포의 3배 분취량을 37 °C에서 72시간 동안 평평한 바닥의 미량적량판(100 μL/웰)에서 배양할 수 있다. MTT는 배양의 최종 4시간 동안 첨가할 수 있다(PBS 중의 MTT의 5mg/mL 용액 10 μL). 72시간 후, 100 μL의 산 이소프로판올(이소프로판올 중 0.04 N HCl)을 모든 웰에 첨가하고, 혼합하고, 광학 밀도를 540nm에서 마이크로 ELISA 플레이트 판독기 상에서 측정했다.
- [0370] CD8+/CD4+T-세포 검정. 활성화된 1차 인간 CD8+ 및 CD4+ T-세포는 PEG-IL-15로 치료될 때 IFN γ, 그랜자임 B, 퍼포린 및 TNF α를 분비한다. 하기 프로토콜은 이러한 사이토카인의 생산을 스크리닝하기 위한 예시적 검정을 제공한다. 인간 1차 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 하기에 따라 단리될 수 있다: 임의의 표준 프로토콜(참조: 예를 들어, Fuss 등 (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NY). 2.5 Ml의 PBMC(1 천만 개의 세포/mL의 세포 밀도로)를 웰당 RPMI (Life Technologies; Carlsbad, CA), 10 mM HEPES (Life Technologies; Carlsbad, CA), 10% 태아 송아지 혈청 (Hyclone Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) 및 페니실린/스트렙토마이신 칵테일 (Life Technologies; Carlsbad, CA)을 함유하는 완전 RPMI로, 또는 5% CO₂로 가습된 37 °C 배양기 중의 임의의 표준 조직 배양물 처리된 6-웰 플레이트(BD; Franklin Lakes, NJ)에서 AIM-V 무혈청 배지 (Life Technologies #12055-083)로 배양할 수 있다. CD8+ 및 CD4+ T-세포는 제조 프로토콜 (Miltenyi Biotech; Auburn, CA)에 따라 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec)의 MACS 세포 분리 기술을 사용하여 단리시킬 수 있다. T-세포는 24-웰 조직 배양 플레이트(Costar #3526, Corning, NY)를 항-CD3 및 항CD-28 항체 (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)로 코딩하고, 1ml의 AIM-V 배지에 3E6 세포/웰을 첨가함으로써 활성화될 수 있다. 세포를 기재된 바와 같이 3일 동안 성장시킨 다음, 수집하고 2E6 세포/mL의 밀도로 새로운 AIM-V에 재현탁시키고, 250 μL/웰을 96-웰 조직 배양 플레이트 (Falcon # 353072, Corning, NY)로 분액화할 수 있다. 인간 PEG-IL-15를 연속으로 희석시키고, 웰에 최종 농도 1 μg/mL 내지 0.01 ng/ml로 참가할 수 있고; 세포를 가습화된 37 °C 배양기에서 3일 동안 5% CO₂로 배양할 수 있다. 이어서, 배지를 수집한 다음, 하기를 사용하여 IFN γ, 그랜자임 B, 퍼포린 및/또는 TNF α에 대해 검정할 수 있다: 상업적 ELISA 키트 및 하기 제조 프로토콜(예: Affymetrix Bioscience; San Diego, CA or R&D Systems, Minneapolis, MN)).
- [0371] NK 세포 검정. 인간 NK 세포를 PBMC 세포로부터 단리시킬 수 있고(상기한 프로토콜; 완전 RPMI에서 배양됨), 제

조 프로토콜(Miltenyi Biotech; Auburn, CA)에 따라 밀 테니 바이오텍의 MACS 세포 분리 기술을 사용하여 유사하게 단리시킬 수 있다. 세포를 성장시키고 배양할 수 있고(T-세포에 대해 기재된 바와 같이, 완전 RPMI 사용), 250 μ l의 완전 RPMI에서 5E5 세포/웰로 96-웰 조직 배양 플레이트(Falcon # 353072, Corning, NY)에 플레이팅했다. 성장을 위해 1 내지 3일 후, 배지를 T-세포에 대해 기재된 바와 같이 검정할 수 있다.

[0372] 종양 모델 및 종양 분석

임의의 당해 분야에서 허용되는 종양 모델, 검정 등을 사용하여 다양한 종양에 대한 본원에 기재된 IL-15 분자의 영향을 평가할 수 있다. 이후 기재되는 종양 모델 및 종양 분석은 이용될 수 있는 것들의 대표이다.

[0374] 동계 마우스 종양 세포를 종양 접종당 10^4 , 10^5 또는 10^6 세포로 피하 또는 피내로 주사한다. Ep2 유방 암종, CT26 결장 암종, 피부의 PDV6 편평상피 암종 및 4T1 유방암종모델이 사용될 수 있다(참조: 예를 들어, Langowski 등 (2006) Nature 442: 461-465). 면역적격 Balb/C 또는 B-세포 결핍 Balb/C 마우스가 사용될 수 있다. PEG-mIL-15는 면역적격 마우스에 투여될 수 있는 반면, PEG-hIL-15 치료는 B-세포 결핍 마우스에 존재할 수 있다. 종양은 치료가 시작되기 전에 100 내지 250 mm³의 크기에 도달하도록 허용된다. IL-15, PEG-mIL-15, PEG-hIL-15, 또는 완충제 대조군은 종양 이식으로부터 떨어진 부위에 피하 투여된다. 종양 성장은 전형적으로 전자 캘리퍼스를 사용하여 매주 2회 모니터링한다.

[0375] 종양 조직 및 림프 기관을 다수의 염증 마커에 대한 mRNA 발현을 측정하고, 다수의 염증 세포 마커에 대한 면역 조직화학을 수행하기 위해 다양한 종점에서 수거한다. 조직을 액체 질소에서 급속 동결시키고, -80 °C에 저장한다. 1차 종양 성장은 전형적으로 전자 캘리퍼스를 사용하여 매주 2회 모니터링한다. 종양 용적은 화학식 ($\text{너비}^2 \times \text{길이}/2$)를 사용하여 계산할 수 있고, 여기서 길이는 더 긴 치수이다. 종양은 치료가 시작되기 전에 90 내지 250 mm³의 크기에 도달하도록 허용된다.

[0376] 본 발명을 수행하기 위한 발명자에게 공지된 최선의 방식을 포함하는 본 발명의 특별한 구현예가 본원에 기재된다. 상기한 설명을 판독시, 개시된 구현예의 변형이 당업자에게 명백해질 수 있고, 당업자는 그러한 변형을 적절하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명은 본원에 구체적으로 기재된 바와 다르게 실시되고, 본 발명은 적용 가능한 법률에 의해 허용되는 바와 따라 본원에 첨부된 특허청구범위에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함하는 것이 의도된다. 또한, 본원에서 다르게 지시되지 않거나 문맥에 의해 명백히 다르게 모순되지 않는 한, 이의 모든 가능한 변형에서 상기한 요소의 임의의 조합이 본 발명에 포함된다.

[0377] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특히 출원, 수탁 번호 및 기타 참고 문헌은 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 참조로 인용된 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 바와 같이 본원에 참고로 인용된다.

도면

도면1

1a. IL-15 긴 신호 패티드 (LSP) 단백질 (수탁 번호BC018149.2) (서열번호: 1)

MIRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLI
QSMIHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLQVISLESGDASIHD
TVENLILANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFI
NTS

1b. IL-15 짧은 신호 패티드 (SSP) 단백질 (수탁 번호BC100962.1) (서열번호: 2)

MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM
KCFLLQVISLESGDASIHD
TVENLILANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSF
VHIVQMFI
NTS

1c. 성숙한 인간 IL-15 단백질 (서열번호: 3)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLQVISLESGDASIHD
TVENLILANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFI
NTS

도면2

2a. 긴 신호 콜레트드 (LSP) cDNA 개방 판독 프레임 (ORF) (수탁 번호BC018149.2)
(서열번호: 4)

atgagaattcggaaaccacattgagaagtattccatccaggctactgtgttacttctaaacagtcatttctaactgaagct
 ggcattcatgtctcattttggctgttcagtgcaggctctaaaacagaagccaactgggtgaatgtataagtgatttga
 aaaaaattgaagattttcaatctatgcatattgtactttatatacgaaagtgtatgttccacccaggtaaca
 gcaatgaagtgcattcttggagttacaagttttcaacttgagtcggagatgeaagttcatgatacagtagaaaaatctga
 tcatcttagcaaacaacagttgtcttaatggaatgtaaacagaatctggatgeaagaatgtgaggaactggaggaaaa
 aaatattaaagaattttgcagagtttgcataattgtccaaatgtcatcaacacttcttga

2b. 짧은 신호 콜레트드 (SSP) cDNA 개방 판독 프레임 (ORF) (수탁 번호BC100962.1)
(서열번호: 5)

atggattggaaaccatagttgtcagctgttcagtgcaggctctaaaacagaagccaactgggtgaatg
 taataagtgtattgaaaaaaaaattgaagattttcaatctatgcatattgtactttatatacgaaagtgtatgtt
 cacccaggtaacagcaatgaatgtactttcttggagttacaagttttcaacttgagtcggagatge
 aagtatttcatgatacagtagaaaaatctgatecatectagaaacaaacagttgtcttaatggaatgtaaacagaat
 ctggatgeaagaatgtgaggaactggaggaaaaatattaaagaattttgcagagtttgcataattgtccaa
 atttcatcaacacttcttga

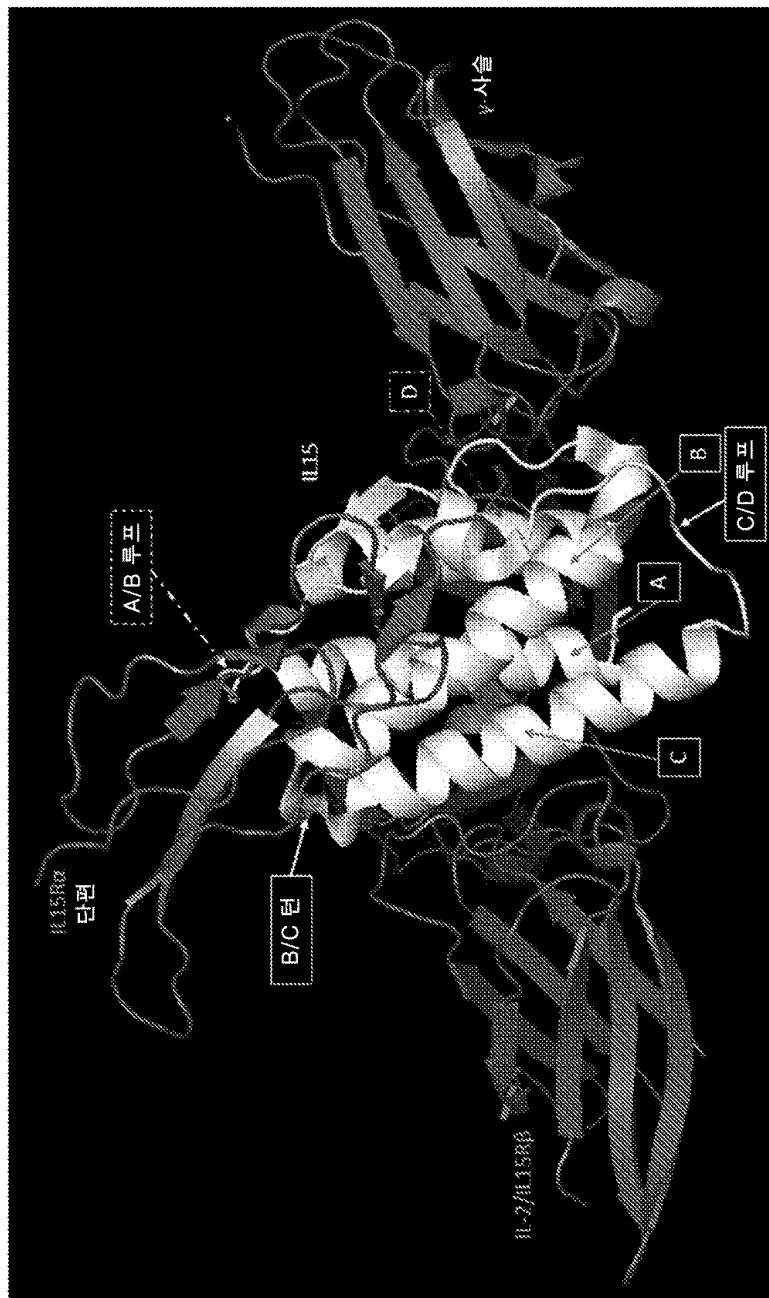
2c. 성숙한 인간 II-15 단백질을 코딩하는 핵산 서열 (서열번호: 6)

aactgggtgaatgtataagtgattgaaaaaaaaattgaagattttcaatctatgcatattgtactttatatacgaaag
 tgatgttccacccaggtaacagcaatgaatgtactttcttggagttacaagttttcaacttgagtcggagatge
 agtatttcatgatacagtagaaaaatctgatecatectagaaacaaacagttgtcttaatggaatgtaaacagaatctggatge
 aaagaatgtgaggaactggaggaaaaatattaaagaattttgcagagtttgcataattgtccaaatgtcatcaacactt
 ctgaa

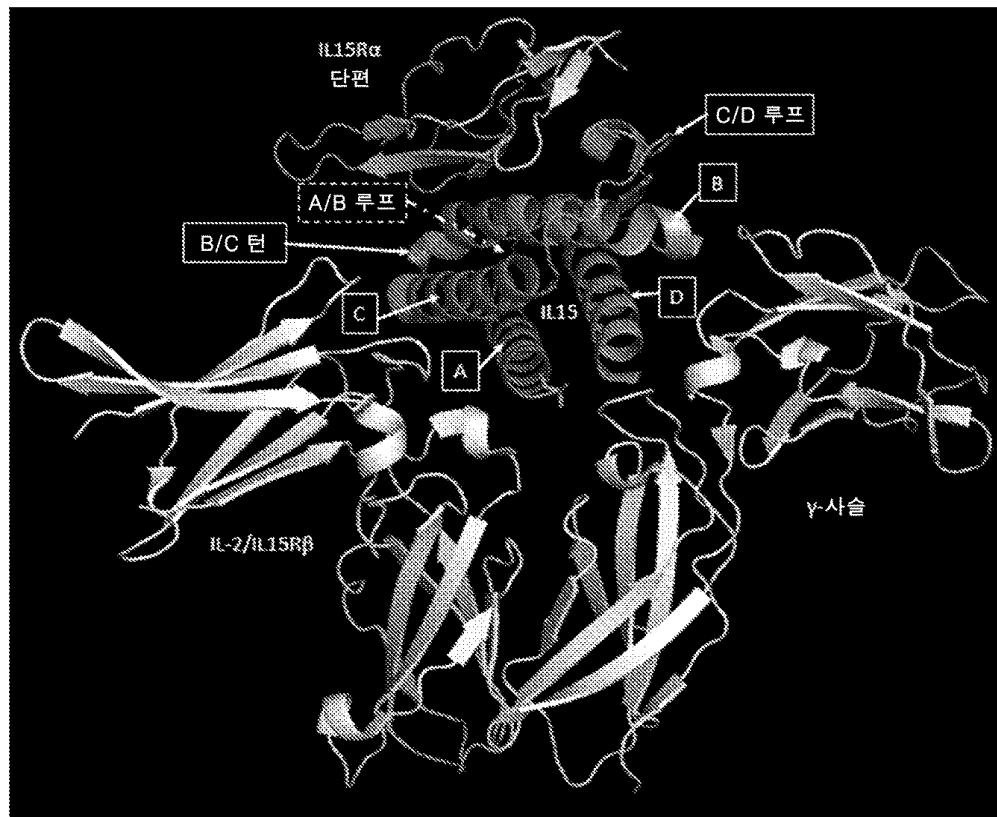
도면3

구조 모티프		나선 A																		나선 B																			
이미노산 Polymer		N	W	V	N	V	I	S	D	I	K	R	I	E	D	L	I	Q	S	M	H	I	D	A	T	L	Y	T	E	S	D								
신기 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30									
구조	83																																						
모티프																																							
이미노산 Polymer		V	H	P	S	C	K	V	T	A	M	K	C	F	L	E	L	Q	V	I	S	L	E	S	G	D	A	S	I	H									
포렌설	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60									
PEF부위																																							
구조 모티프		나선 C																		나선 D																			
이미노산 Polymer		O	T	V	E	N	L	I	S	I	T	A	N	N	S	L	S	S	N	G	N	V	T	E	S	G	C	K	E	T	C	E							
포렌설	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90									
PEF부위																																							
구조 모티프		나선 E																		나선 F																			
이미노산 Polymer		L	E	E	K	N	I	K	E	F	I	Q	S	F	V	H	I	V	Q	M	F	I	N	T	S														
포렌설	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90									
PEF부위																																							

도면4a



도면4b



도면5

		A/B 루프												B/C 루프												C/D 루프					
		내선 A						내선 B						내선 C						내선 D						내선 E					
구조	모터프	V	H	P	S	C	K	V	T	A	M	X	C	F	L	E	L	Q	V	I	S	L	E	S	G	D	A	S	I	H	
이미노산 Innosan	N	W	V	N	V	I	S	D	E	K	K	I	E	D	L	I	Q	S	M	H	I	D	A	T	L	Y	T	S	D		
PEF부위 PEF부위	2	2	3	3	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
구조 모터프 모터프	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
이미노산 Innosan	33	32	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
조립설 조립설	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PEF부위 PEF부위	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
구조 모터프 모터프	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
이미노산 Innosan	B	T	V	E	N	L	I	E	N	N	S	S	S	S	N	G	N	V	T	E	S	G	C	K	E	C	E	E			
조립설 조립설	53	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79		
PEF부위 PEF부위	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
구조 모터프 모터프	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
이미노산 Innosan	L	E	E	K	N	I	K	E	F	I	Q	S	F	V	H	I	V	Q	M	F	I	N	T	S							
조립설 조립설	43	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69		
PEF부위 PEF부위	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

도면6a

구조	나선 A												나선 B																										
	A/B 투표				A/C 투표				B/C 투표				A/B 투표				A/C 투표				B/C 투표																		
성수	N1	V3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	E13	E14	E15	E16	E17	S18	M19	H20	성수	N1	V3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	P33	S34	V35	R36	V37	T38	A39	H40
단백질	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
구조	나선 A	나선 B	나선 C...																																				
성수	I21	O22	A23	Z24	L25	Y26	Y27	E28	S29	D30	G31	P32	N33	S34	V35	R36	V37	T38	A39	H40																			
단백질	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
구조	나선 A	나선 B	나선 C...																																				
성수	K31	Q32	W33	Y34	Y35	Y36	Y37	E38	Q39	W40	S41	E52	E53	S54	G55	D56	A57	S58	H59																				
단백질	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														

도면6b

구조	상수	나선 C												나선 D																					
		CD 투프						CD 투프						나선 D						나선 D															
단비질	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	
Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
NXG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
NXZ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

서열 목록

- <110> McCauley, Scott
<120> INTERLEUKIN-15 COMPOSITIONS AND USES THEREOF
<130> ACIR-001WO
<150> US 62/063,784
<151> 2014-10-14
<160> 41
<170> KoPatent In 3.0

<210> 1
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

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

1	5	10	15
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His			
20	25	30	

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Thr Ser

<210> 2
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Leu Gly Thr Ile Asp Leu Cys Ser Cys Phe Ser Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys
 20 25 30
 Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr
 35 40 45
 Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe
 50 55 60
 Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile
 65 70 75 80
 His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser
 85 90 95
 Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu
 100 105 110
 Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val
 115 120 125
 Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 130 135
 <210> 3
 <211
 > 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 1 5 10 15
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 20 25 30
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 50 55 60
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val

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

Thr Ser

<210> 4

<211> 489

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgagaattt cgaaccaca ttggagaat attccatcc agtgctactt gtgtttactt 60

ctaaacagtc atttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt 120
 gcagggcttc ctaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaaatt 180
 gaagatctta ttcaatctat gcatattgtat gctactttat atacggaaag tcatgttac 240
 cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc ttctcttgg agttacaagt tatttcaattt 300
 gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac 360
 agtttgtctt ctaatggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag 420
 gaaaaaaata ttaagaattt ttgcagagt ttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac 480

acttcttga 489

<210> 5

<211> 408

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggatttgg gaaccataga ttgtgcagc tgttcagt cagggcttcc taaaacagaa 60
 gccaactggg tgaatgtaat aagtgattt gaaaaaaattt aagatcttat tcaatctatg 120
 catattgtat ctactttata tacggaaatg gatgttacc ccagttgcaa agtaacagca 180
 atgaagtgtt ttctcttggaa gttacaagtt atttcacttg agtccggaga tgcaagtattt 240
 catgatacag tagaaaatct gatcatccta gcaaacaaca gttgtcttc taatggaaat 300

gtaacagaat ctggatgcaa agaatgtgag gaactggagg gaaaaaaat taaagaattt 360

ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca cttcttga	408
<210> 6	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat	60
attgatgcta ctttatatac ggaaagtgtat gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg	120
aagtgcgttc tcttggagtt acaagttatt tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat	180
gatacagtag aaaatctgtat catcctagca aacaacagtt tgcctctaa tggaatgtat	240
acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg	300
cagagtttg tacatattgt ccaaattgttc atcaacactt ctgtat	345
<210> 7	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polypeptide	
<400> 7	
Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg	
1 5 10	
<210> 8	
<211> 27	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polypeptide	
<400> 8	
Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu	
1 5 10 15	
Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu	
20 25	
<210> 9	
<211> 33	
<212> PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 9

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Ala

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 10

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 11

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 12

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1	5
---	---

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 14

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 15

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 16

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide

<400> 17

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide

<400> 18

Arg Gly Arg Arg

1

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 19

Arg Lys Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 20

Arg Lys Lys Arg

1

<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 21

Arg Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Ser may be repeated n times, where n is an integer of at least

one

<400> 22

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Ser may be repeated n times, where n is an integer of at least

one.

<400> 23

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Gly may be repeated m times, where m is an integer of at least one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> Positions 1-5 may be repeated n times, where n is an integer of at least one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Ser may be repeated o times, where o is an integer of at least one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> Gly may be repeated m times, where m is an integer of at least

one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Ser may be repeated o times, where o is an integer of at least one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Gly may be repeated m times, where m is an integer of at least one.

<400> 24

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> Positions 1-5 may be repeated n times, where n is an integer of

at least one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Ser may be repeated m times, where m is an integer of at least one.

<400> 25

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> Positions 1-5 may be repeated n times, where n is an integer of at least one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Ser may be repeated m times, where m is an integer of at least one.

<400> 26

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> Positions 1-4 may be repeated n times, where n is an integer of at least one.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Ser may be repeated m times, where m is an integer of at least

one.

<400> 27

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 28

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 29

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 30

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 31

Gly Ser Gly Gly Gly

1	5
---	---

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 32

Gly Gly Gly Ser Gly

1	5
---	---

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 33

Gly Ser Ser Ser Gly

1	5
---	---

<210> 34
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide
<400> 34

tataggccca gccggccgcc gccaccatga gaatttcgaa accacatgg ag 52

<210> 35
<211> 35
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 35

tatagggccc tcaagaagtg ttgatgaaca ttgg	35
---------------------------------------	----

<210> 36

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 36

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 37

Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Ile

1	5
---	---

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 38

Asp Thr Val Glu Asn Leu

1	5
---	---

<210> 39

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 39

His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

1 5

<210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 40

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 41

Arg Gly Val Phe Arg Arg

1 5