

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5685363号
(P5685363)

(45) 発行日 平成27年3月18日 (2015. 3. 18)

(24) 登録日 平成27年1月23日 (2015. 1. 23)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C O 7 K 14/54 (2006. 01)

C O 7 K 14/54 Z N A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 33 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-522097 (P2008-522097)
 (86) (22) 出願日 平成18年7月19日 (2006. 7. 19)
 (65) 公表番号 特表2009-501543 (P2009-501543A)
 (43) 公表日 平成21年1月22日 (2009. 1. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2006/002663
 (87) 国際公開番号 W02007/010401
 (87) 国際公開日 平成19年1月25日 (2007. 1. 25)
 審査請求日 平成21年5月18日 (2009. 5. 18)
 (31) 優先権主張番号 05291556.8
 (32) 優先日 平成17年7月20日 (2005. 7. 20)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 505048910
 シテリ
 C Y T H E R I S
 フランス国、92130・イシー・レ・ム
 リノー、アベニユ・ジャン・ジャック・ル
 ソー・175
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 モール, ミシエル
 フランス国、エフ-92100・ブーロニ
 ュ、リュ・ナシオナル・67
 (72) 発明者 アスリーヌ, ブリジット
 フランス国、エフ-92400・クールブ
 ボワ、リュ・セバストポール・12/14

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリコシル化された I L - 7、調製及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも3つのグリコシル化されたアミノ酸残基を含有し、6.5未満の平均等電点、及びSDSゲル電気泳動法によって測定される27kDaを超える平均分子量を有する、精製された、哺乳類の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチド。

【請求項 2】

グリコシル化部位が、I L - 7 ポリペプチド配列中に天然に存在する及び/又は人工的に作製される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

哺乳類の I L - 7 ポリペプチドがヒト I L - 7 ポリペプチドであり、グリコシル化部位が、位置70、91及び116に存在する A s n 残基；位置110に存在する T h r、下記の表に列挙された人工的に作製された任意のグリコシル化部位

10

【表 1】

Lys28Asn ; Ile30Ser	
Lys28Asn ; Ile30Thr	
Ile30Asn ; Ser32Thr	
Leu35Ser	
Leu35Thr	
Glu38Ser	10
Glu38Thr	
Phe39Ser	
Phe39Thr	
Phe42Ser	
Phe42Thr	
Glu52Ser	20
Glu52Thr	
Val82Asn ; Glu84Ser	
Val82Asn ; Glu84Thr	
Lys97Asn ; Arg99Ser	
Lys97Asn ; Arg99Thr	
Ala102Asn ; Leu104Ser	
Ala102Asn ; Leu104Thr	30
Leu104Asn ; Glu106Ser	
Leu104Asn ; Glu106Thr	
Leu128Ser	
Leu128Thr	
Ile145Asn ; Met147Ser	
Ile145Asn ; Met147Thr	
Met147Asn ; Thr149Ser	40

又はそれらの組み合わせから選択される、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

- a) 哺乳類型の糖鎖；
- b) 複合 N - 糖鎖を含む糖鎖；
- c) α 2 , 6 - シアリルトランスフェラーゼ又は α 2 , 3 - シアリルトランスフェラーゼによってシアル化された糖鎖；及び / 又は
- d) 3 から 30 の間のシアリル - N - アセチルガラクトサミンを示すシアル化された糖鎖；

から選択される N 結合型糖鎖を含む又は該 N 結合型糖鎖に富む、請求項 1 から 3 の何れか

一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

末端のシアル酸残基を有する O 結合型糖鎖を含む又は末端のシアル酸残基を有する O 結合型糖鎖に富む、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

糖鎖が、部分的又は完全な末端シアル化を有する四岐から二岐の構造を含む、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

哺乳動物宿主において、インビボでの延長された半減期及び平均滞留時間を示す、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 8】

次の 3 つの架橋 Cys : 1 - 4 (Cys 2 - Cys 9 2) ; 2 - 5 (Cys 3 4 - Cys 1 2 9) ; 3 - (Cys 4 7 - Cys 1 4 1) を含む、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 1 のポリペプチドである請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

哺乳類の IL - 7 ポリペプチドを含む過剰グリコシル化された IL - 7 構成物であって、前記哺乳類の IL - 7 ポリペプチドの少なくとも 80 % が、少なくとも 3 つのグリコシル化されたアミノ酸残基、6 . 5 未満の平均等電点、及び SDS ゲル電気泳動法によって測定される 27 KDa を超える平均分子量を有する、過剰グリコシル化された IL - 7 構成物。

20

【請求項 11】

構成物に含まれる哺乳類の IL - 7 ポリペプチドの 80 ~ 95 % が、少なくとも 3 つの異なるアミノ酸残基上で N - グリコシル化される、請求項 10 に記載の構成物。

【請求項 12】

構成物に含まれる哺乳類の IL - 7 ポリペプチドの少なくとも 80 % が、1 つの O - グリコシル化部位及び最大 7 つの N - グリコシル化部位を含む、3 つから最大 8 つの異なるアミノ酸残基上でグリコシル化される、請求項 10 又は 11 に記載の構成物。

30

【請求項 13】

構成物に含まれる哺乳類の IL - 7 ポリペプチドの 80 % ~ 95 % が、1 つの O - グリコシル化部位及び最大 7 つの N - グリコシル化部位を含む、3 つから最大 8 つの異なるアミノ酸残基上でグリコシル化される、請求項 12 に記載の構成物。

【請求項 14】

哺乳類の IL - 7 ポリペプチドがヒト IL - 7 ポリペプチドである、請求項 10 から 13 の何れか一項に記載の構成物。

【請求項 15】

哺乳類の IL - 7 ポリペプチドがイヌの IL - 7 ポリペプチドである、請求項 10 から 13 の何れか一項に記載の構成物。

【請求項 16】

グリコシル化部位が、IL - 7 ポリペプチド配列中に天然に存在する及び / 又は人工的に作製される、請求項 10 から 15 の何れか一項に記載の構成物。

40

【請求項 17】

哺乳類の IL - 7 ポリペプチドがヒト IL - 7 ポリペプチドであり、グリコシル化部位が、位置 70、91 及び 116 に存在する Asn 残基；位置 110 に存在する Thr、下記の表に列挙された人工的に作製された任意のグリコシル化部位、

【表 2】

Lys28Asn ; Ile30Ser	
Lys28Asn ; Ile30Thr	
Ile30Asn ; Ser32Thr	
Leu35Ser	
Leu35Thr	
Glu38Ser	10
Glu38Thr	
Phe39Ser	
Phe39Thr	
Phe42Ser	
Phe42Thr	
Glu52Ser	
Glu52Thr	20
Val82Asn ; Glu84Ser	
Val82Asn ; Glu84Thr	
Lys97Asn ; Arg99Ser	
Lys97Asn ; Arg99Thr	
Ala102Asn ; Leu104Ser	
Ala102Asn ; Leu104Thr	
Leu104Asn ; Glu106Ser	30
Leu104Asn ; Glu106Thr	
Leu128Ser	
Leu128Thr	
Ile145Asn ; Met147Ser	
Ile145Asn ; Met147Thr	
Met147Asn ; Thr149Ser	40

又はそれらの組み合わせから選択される、請求項 10 から 14 及び 16 の何れか一項に記載の構成物。

【請求項 18】

前記 IL - 7 ポリペプチドが、

- a) 哺乳類型の糖鎖；
- b) 複合 N - 糖鎖を含む糖鎖；
- c) α 2 , 6 - シアリルトランスフェラーゼ又は α 2 , 3 - シアリルトランスフェラーゼによってシアル化された糖鎖；及び / 又は
- d) 3 から 30 の間のシアリル - N - アセチルガラクトサミンを示すシアル化された糖

鎖；

から選択されるN結合型糖鎖を含む又は該N結合型糖鎖に富む、請求項10から16の何れか一項に記載の構成物。

【請求項19】

前記IL-7ポリペプチドが、末端のシアル酸残基を有するO結合型糖鎖を含む又は末端のシアル酸残基を有するO結合型糖鎖に富む、請求項10から18のいずれか一項に記載の構成物。

【請求項20】

糖鎖が、部分的又は完全な末端シアル化を有する四岐から二岐の構造を含む、請求項10から18のいずれか一項に記載の構成物。

10

【請求項21】

前記IL-7過剰グリコシル化されたポリペプチドが、哺乳動物宿主において、インビボでの延長された半減期及び平均滞留時間を示す、請求項10から20の何れか一項に記載の構成物。

【請求項22】

前記IL-7過剰グリコシル化されたポリペプチドが、次の3つの架橋Cys: 1-4 (Cys2-Cys92); 2-5 (Cys34-Cys129); 3-(Cys47-Cys141)を含む、請求項10から21のいずれか一項に記載の構成物。

【請求項23】

前記IL-7過剰グリコシル化されたポリペプチドが、配列番号1のポリペプチドである請求項22に記載の構成物。

20

【請求項24】

a) IL-7ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞を、流加培養又は灌流培養モードで培養すること、

b) 前記細胞から産生されたIL-7ポリペプチドを収集すること、及び

c) 疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー又はゲルろ過クロマトグラフィーのいずれか単独又は各種組み合わせのうちの少なくとも一工程を含む方法によって、前記IL-7ポリペプチドを精製すること

を含む、請求項1から9の何れか一項に記載のIL-7ポリペプチドを産生する方法。

30

【請求項25】

請求項1から9のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項10から23のいずれか一項に記載の構成物の有効量と、及び医薬として適合性のある1つ又はそれ以上の担体又は賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項26】

対象における免疫反応を引き起こし又は調節するための医薬の製造のための、請求項1から9の何れか一項に記載のポリペプチド又は請求項10から23のいずれか一項に記載の構成物の使用。

【請求項27】

医薬が、延長されたリンパ球新生の刺激及び/又は免疫反応の増幅の誘導のための医薬である、請求項26に記載の使用。

40

【請求項28】

医薬が、ウイルス感染を治療するための医薬である、請求項26に記載の使用。

【請求項29】

過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドが、インターフェロン分子とともに投与される、請求項28に記載の使用。

【請求項30】

医薬が、免疫無防備状態の対象における胸腺新生の回復を改善させるためのものである、請求項26に記載の使用。

【請求項31】

50

過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドが、角化細胞増殖因子、幹細胞因子、ゴナドスチムリンアンタゴニスト又は成長ホルモンとともに投与される、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドが、悪性細胞、ウィルス又は細菌に対する治療用免疫化を提供するために、抗原又は抗原の混合物とともに投与される、請求項 26 に記載の使用。

【請求項 33】

過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドが更に、G M - C S F とともに投与される、請求項 32 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新たな及び改善されたインターロイキン - 7 ポリペプチド並びにこれを含む組成物、それらの調製及び使用に関する。本発明は、より具体的には、改善された特性を有する過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチド並びにそれらの製造及び治療上の使用に関する。本発明は、人工的に作製されたグリコシル化部位を含有する修飾されたアミノ酸配列を有する新規の I L - 7 ポリペプチド、及び対応する核酸分子、ベクター及び組換え宿主又は宿主細胞も開示する。本発明は、ヒト対象を含む哺乳動物対象の治療的又は予防的処置のためのこのようなポリペプチド、細胞又は核酸の使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

B 及び T リンパ球は、免疫反応の主要なエフェクター細胞である。両細胞クラスは、各クラスの分化において識別可能な段階に相当する前駆細胞又は前駆体細胞を介して、哺乳動物骨髄中の造血幹細胞から最終的に由来すると考えられている。成熟 T 細胞は胸腺において主として発達し、T リンパ球の発達の初期段階において、骨髄から胸腺まで遊走する前駆体細胞からおそらく発達する。リンパ球系細胞の発達は、多様な間質細胞によって産生される増殖因子、生存因子及び分化因子に依存している。I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 5、インターフェロンガンマ、B S F - 2、ニューロロイキン、トランスフォーミング増殖因子ベータ及び I L - 7 を含む多数の因子は、成熟した末梢 B 細胞及び T 細胞上に対して活性がある。

【0003】

「インターロイキン - 7」又は「I L - 7」とは、プレ B 細胞として知られた固有前駆体細胞を含む、骨髄由来のリンパ球前駆細胞及び前駆体細胞の増殖を誘導できる哺乳動物内因性分泌型糖タンパク質を指す。骨髄細胞系の間質要素を起源とするので、I L - 7 は、胸腺間質細胞、腸及び他の上皮細胞、幾つかの樹状細胞及び濾胞樹状細胞、角化細胞及び一般的に全てのリンパ組織によっても分泌される。この分子に対する別の表記は、「プレ B 細胞増殖因子」及び「リンホポエチン (l y m p h o p o i e t i n) - 1」である。

【0004】

欧州特許第 0314415 号 (又は米国特許第 4,965,195 号) は、哺乳動物インターロイキン - 7 タンパク質及び対応する DNA を記載している。ヒト I L - 7 アミノ酸配列は、位置 70、91 及び 116 に存在する A s n 残基に位置する 3 つの N 結合型グリコシル化部位の候補を含有する。C O S 細胞中での h I L - 7 (ヒト I L - 7) の一過性組換え発現によって、約 20、24 及び 28 k D a の見かけの分子量を有する 3 つのタンパク質バンドとして、r - h u I L - 7 (組換えヒト I L - 7) を可視化することができた (C o s m a n e t a l . ; L y m p h o k i n e R e c e p t o r I n t e r a c t i o n s ; 1989 ; 179 : 229 - 236)。B H K 細胞中での h I L - 7 の安定した組換え発現も報告された (A r m i t a g e e t a l . ; T h e J o u r n a l o f I m m u n o l o g y ; 1990 ; 144 : 938 - 941)。し

10

20

30

40

50

かしながら、天然に存在するヒトIL-7のグリコシル化状態、特にO-グリコシル化状態は、文献に記載されておらず、又は研究されてもおらず、IL-7特性に対するグリコシル化特性の影響は、これまで検討されてこなかった。更に、欧州特許第0314415号に記載されている、イー・コリ(E.coli)中で産生された非グリコシル化成熟ヒトIL-7(r-hIL-7)は、17,387ダルトンの分子量を示し、多様なリンパ球集団の増殖に基づいた特異的なバイオアッセイにおいて、インビトロで高い活性を示す。G-CSF、GM-CSF、IFN、HGF等の他のサイトカイン及び増殖因子も、グリコシル化なしに、完全な治療活性を示す。

【0005】

WO2004/018681は、次のジスルフィド架橋：1から4(C2からC92)、2から5(C34からC129)及び3から6(C47からC141)を含むヒトIL-7の活性な配座異性体、並びにこれを製造又は性質決定する方法及びその使用を開示する。

【0006】

IL-7は、当初、主たる活性が前駆体B細胞増殖の誘導であるサイトカインとして開示された(Namen A.E. et al.; Journal of Experimental medicine; 1988; 167:988-1002)。さらに最近になって、IL-7は、T細胞発達の初期段階における胸腺細胞(T細胞)の生存及び増殖に関与するとして開示されている(Shuluns K.S. et al.; Nature Immunology; 2000; 1(5):426-432)。IL-7経路は、特に胸腺細胞を発達させる上で、リンパ球の発達のために必須である(Maeurer M.J. et al.; Int. Rev. Immunol.; 1998; 16:309-22、Fry T.J. et al.; Blood; 2002; 99:3892-904)。さらに、Fry及び共同研究者は、多因子性作用における胸腺非依存性T細胞再生の有力な調節物質としてIL-7を同定した(Fry T.J. et al.; Blood; 2001; 97(6):1525-1533)。IL-7は、成熟型T細胞を強力に調節し、成熟型T細胞に対する本効果に加えて、IL-7は、抗原提示細胞の発達に影響し得る(Marquez C. et al.; J. Exp. Med.; 1995; 181:475-83)。IL-7は、CD4+とCD8+の両サブセットにおいて、メモリーT細胞再生に必須である(Kondrack R.M. et al.; J. Exp. Med.; 2003; 198:1797-806、Kaech S.M. et al.; Nat. Immunol.; 2003; 4:1191-8)。

【0007】

従って、IL-7は、T細胞前駆体の増殖の刺激、抗体分泌B細胞の増殖の刺激、抗原によって駆動されるT細胞末梢増殖の刺激、並びにナイーブT細胞及び他の造血細胞種の産生における使用に関して治療的に大きな可能性を秘めている。活性なIL-7分子の特に興味深い治療用途は、リンパ球減少性患者、すなわち癌に対して治療されている患者、骨髄又は幹細胞の移植を受けた患者、後天性又は遺伝的免疫不全を呈する患者、高齢者又はCD4数の低い全ての患者の免疫再構築である。他の有用性は、特異的免疫反応(ワクチン増強)を生じさせる又は亢進させるために、新たなナイーブCD4 T細胞を産生するか又は特異的プールを拡大するIL-7の能力に存する。

【0008】

その治療可能性に照らせば、効率的な治療用途に適した生物に活性なIL-7ポリペプチド又は改善されたIL-7ポリペプチドを開発することに大きな興味を持たれる。この点において、市販の多様なサイトカイン及び増殖因子には免疫原性がほとんどないものがある(例えば、インターフェロン α 「IFN α 」、顆粒球コロニー刺激因子「G-CSF」)ので、対応する製剤原料は、組換えタンパク質に対して一般的に受け入れられている慣用のレベル以外に、非常に特異的なポリペプチド純度を必要としない。これに対して、他の増殖因子はより免疫原性であり(例えば、ベータインターフェロン「 β -IFN」、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子「GM-CSF」)、又は、その特異的活性は、

10

20

30

40

50

生命に対して非常に重大な意味を有する（例えば、エリスロポエチン「EPO」）ので、薬物製剤原料のポリペプチド純度及び特性は明確に研究しなければならない、免疫原性から保護するために狭い限界内に維持されなければならない。

【0009】

IL-7は、独特な分子である。その固有の免疫亢進特性のために、治療剤として使用されるIL-7は、特に、抗IL-7免疫原性（抗IL-7結合性抗体又は中和抗体）を惹起する傾向がある。この免疫原性は、タンパク質の長期治療活性に対して有害である。抗IL-7抗体は、IL-7薬物動態を調節でき、その治療活性を中和できる。

【0010】

変化したポリペプチド配列（例えば、酸化型、還元型、脱アミド型又は切断型の形態）、共有結合又は非共有結合IL-7多量体（凝集したIL-7分子等の）などの多様なIL-7分子種が、抗IL-7免疫原性を惹起するのに関与する。それゆえ、より安定で、分子間凝集の傾向がほとんどなく、免疫原性及び更に生物活性のほとんどないIL-7ポリペプチド及び製剤原料を確定することは重大な意味を有する。実際、多くの薬物の活性がAUCパラメータと相関しているのに対して、IL-7の活性は、半減期パラメータ、より具体的には、平均残存時間と相関している。

【発明の開示】

【0011】

本発明の要約

本発明は、新たな及び改善されたIL-7ポリペプチド、製剤原料並びに組成物を開示する。より具体的には、本発明は、グリコシル化の高い程度を有し、及び炭水化物部分のシアル化及びフコシル化によって、より大きな分子サイズとより低い等電点にシフトしたオリゴ糖特性を有する新規のIL-7分子種を開示する。本発明は、これらの新たなオリゴ糖特性が、これらの新たな製剤原料に対して改善された化学的及び薬学的安定性を付与し、並びに、平均残存時間（MRT）の増大によって性質決定せられる、インビボでの投与後における延長された薬物動態特性を付与することを示す。

【0012】

それゆえ、本発明は、改善された特性を有する新規のグリコシル化された又は過剰グリコシル化された新規IL-7ポリペプチドを提供する。本発明は、人工的に作製されたグリコシル化部位を含有する修飾されたアミノ酸配列を有する新規IL-7ポリペプチド、及び対応する核酸分子、ベクター及び組換え宿主又は宿主細胞も開示する。本発明は、ヒト対象を含む哺乳動物対象の治療的又は予防的処置のためのこのようなポリペプチド、細胞又は核酸の使用にも関する。従って、本発明は、安定性の増大、タンパク質分解及び凝集に対する感受性の低下、インビボでの有利な長期の活性及び低下した免疫原性を示すことにより、改善された包括的又は特異的免疫反応を哺乳動物対象中に生じさせ得る、新規の活性なIL-7ポリペプチド、製剤原料及び医薬組成物を開示する。

【0013】

本発明の目的は、過剰グリコシル化されたIL-7構成物（composition）に存する。

【0014】

本発明の更なる目的は、精製された過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドに存する。

【0015】

このような過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドは、少なくとも3つのNグリコシル化されたアミノ酸残基を含有する。

【0016】

本発明の更なる目的は、哺乳動物対象を治療するための、過剰グリコシル化されたIL-7と医薬として許容される賦形剤又は媒体とからなる医薬の製造のための過剰グリコシル化されたIL-7の使用に関する。

【0017】

本発明の更なる目的は、哺乳動物対象を治療するための医薬の製造のための過剰グリコシル化されたＩＬ－７構成物の使用に関する。

【００１８】

本発明の更なる目的は、過剰グリコシル化されたＩＬ－７組成物の有効量を対象に投与することを含む、対象において免疫反応を生じさせる又は刺激する方法である。

【００１９】

本発明の更なる目的は、Ｔ細胞を、過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチド又は組成物と接触させ、それによりＴ細胞の増殖を亢進させることを含む、Ｔ細胞の増殖を生体外で亢進させるための方法である。

【００２０】

特定の実施形態において、過剰グリコシル化されたＩＬ－７構成物は、少なくとも３つの別個のアミノ酸残基上でグリコシル化された少なくとも８０％、好ましくは８０％と９５％の間のＩＬ－７ポリペプチドを含む組成物である。このような残基は、ＩＬ－７ポリペプチド配列内に天然に存在する及び／又は人工的に作製されるグリコシル化部位のいずれかであり得る。

【００２１】

更なる特定の実施形態において、過剰グリコシル化されたＩＬ－７構成物は、１つのＯ－グリコシル化部位及び最大７つのＮ－グリコシル化部位を含む、少なくとも３つから最大８つの異なるアミノ酸残基上でグリコシル化された、少なくとも８０％、好ましくは８０％と９５％の間のＩＬ－７ポリペプチドを含む構成物である。このような残基は、ＩＬ－７ポリペプチド配列内に天然に存在する及び／又は人工的に作製されるＮ－グリコシル化部位のいずれかであり得る。

【００２２】

この点において、本発明の更なる目的は、修飾されたアミノ酸配列を有するＩＬ－７ポリペプチドに関し、前記配列は、少なくとも１つの人工的に作製されたグリコシル化部位を含む。特定の実施形態によると、本発明のＩＬ－７ポリペプチドは、１、２、３又は４個の、より好ましくは１、２又は３個の、更により好ましくは１又は２個の人工的に作製されたグリコシル化部位を含む。更に開示されるように、人工的に作製されたグリコシル化部位は、好ましくは、Ｎ結合型グリコシル化部位である。本発明のＩＬ－７ポリペプチドは、あらゆる哺乳動物に由来し得、特にヒト起源であり得る。更に、このようなＩＬ－７ポリペプチドは、成熟ＩＬ－７ポリペプチドの配列を含み得、又は例えば、分泌ペプチド等の付加的なアミノ酸残基を含む。これに加えて又はこれに代えて、ＩＬ－７ポリペプチドは、好ましくは、以下の３つのジスルフィド架橋：Ｃｙｓ：１から４（Ｃｙｓ２からＣｙｓ９２）；２から５（Ｃｙｓ３４からＣｙｓ１２９）；３から６（Ｃｙｓ４７からＣｙｓ１４１）を含む特異的な配座異性体である。このような修飾されたＩＬ－７ポリペプチドの具体例は、以下の表１に開示されるような少なくとも１つのアミノ酸修飾又はその組み合わせを含む。

【００２３】

本発明の更なる目的は、上で論述されているＩＬ－７ポリペプチドをコードする核酸分子に存する。前記核酸分子は、あらゆるＤＮＡ又はＲＮＡ分子であり得、典型的にはｃＤＮＡ分子であり得る。

【００２４】

本発明の更なる目的は、配列番号１９を含む分泌シグナルをコードする核酸分子に存する。

【００２５】

本発明の更なる目的は、上記核酸分子を含むベクターに存する。前記ベクターは、あらゆる原核生物又は真核生物ベクター、典型的には真核生物ベクターであり得、プラスミド、エピソードＤＮＡ、コスミド、ウィルスベクター、人工染色体等から選択され得る。前記ベクターは、例えばプロモーター、ターミネーター、ポリＡ、複製開始点、相同領域、イントロン、遺伝子５′又は３′非翻訳領域（ＵＴＲ）等、選択された宿主細胞中でのコ

10

20

30

40

50

ード核酸の適切な発現を可能にする全ての制御配列を含み得る。

【 0 0 2 6 】

上記核酸及びベクターは、例えば多様なコンピテント宿主細胞において組換え哺乳動物 IL - 7 ポリペプチドを産生するために、及び遺伝子治療目的のために使用され得る。

【 0 0 2 7 】

本発明の別の目的は、上に開示されている核酸又はベクターを含む組換え宿主細胞に存する。このような組換え細胞は、原核細胞、又は、より好ましくは酵母、昆虫、植物若しくは哺乳動物細胞等の真核細胞、例えば、より好ましくは、例えば、ヒト起源のグリコシルトランスフェラーゼ及び / 又は 2 - 6 - シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を発現又は過剰発現させるために形質導入された組換え宿主細胞であり得る。

10

【 0 0 2 8 】

本発明の別の目的は、上記 IL - 7 ポリペプチド、典型的には、過剰グリコシル化された IL - 7 ポリペプチドを含む製剤原料に存する。より好ましくは、製剤原料は、グリコシル化されていない又はモノグリコシル化された IL - 7 ポリペプチド約 1 0 % 未満を含む及び / 又は生成物関連不純物を実質的に含まない。

【 0 0 2 9 】

本発明は、医薬（「薬物製品」）又は医薬組成物の製造における上記製剤原料の使用にも関する。

【 0 0 3 0 】

本発明は更に、上記 IL - 7 ポリペプチド又は組成物又は製剤原料の有効量と、 1 つ又はそれ以上の医薬として適合性のある担体又は賦形剤とを含む医薬組成物に関する。

20

【 0 0 3 1 】

本発明は、上記 IL - 7 ポリペプチドと特異的に免疫反応性を示す抗体及びその断片又は誘導体を；該抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を、及び該抗体、その断片又は誘導体を含む診断、アッセイ又は治療に適した組成物を提供する。

【 0 0 3 2 】

本発明の更なる態様は、原核又は真核宿主細胞から上記 IL - 7 ポリペプチドを産生する方法、及び試料中でこのような IL - 7 ポリペプチドの存在を検出若しくは測定し、又は試料を性質決定する方法である。

【 0 0 3 3 】

特定の態様において、上記 IL - 7 ポリペプチドを産生する方法は、

a) 上記組換え宿主細胞を培養すること、及び

b) 前記細胞から産生された IL - 7 ポリペプチドを回収すること

を含む。

30

【 0 0 3 4 】

好ましい実施形態によると、発現は、効率的なグリコシル化モチーフが IL - 7 ポリペプチド、特にシアル酸残基へ付加できる条件下で実施される。

【 0 0 3 5 】

更なる好ましい実施形態において、産生は、指数関数的成長期の終了時に細胞を維持する流加培養又は灌流培養モードにおいて実施される。このような条件は、翻訳後修飾の質を高め、及び IL - 7 ポリペプチドあたりのシアル化の程度をより高くすることに寄与する。特定の実施形態によると、コード核酸は、分泌シグナル及び / 又は最適化された核酸配列を含み、及び / 又は宿主細胞は真核宿主細胞である（例えば、哺乳動物又は昆虫又は酵母細胞）。

40

【 0 0 3 6 】

本発明の別の目的は、対象において免疫反応を引き起こし又は調節し、特に延長されたリンパ球新生の刺激を誘導するための及び / 又は免疫反応を増幅させるための医薬組成物の製造のための、上記の又は上記方法によって得られた IL - 7 ポリペプチド又は過剰グリコシル化された IL - 7 組成物の使用に関する。

【 0 0 3 7 】

50

本発明は、免疫不全を伴う疾患を予防又は治療するための医薬組成物の製造のための上述の又上記方法によって得られたＩＬ－７ポリペプチドの使用にも関する。

【００３８】

以下に論議されるように、本発明のポリペプチドは、インビボでの受容体相互作用及び活性を付与する延長された血漿半減期及び平均残存時間及び／又は改善された安定性及び／又はより短い長期免疫原性を示し、これにより、哺乳動物対象、特にヒト対象における多様な病的症状を治療するためにそれらを使用することが可能となる。

【００３９】

発明の詳細な説明

本発明は、過剰グリコシル化されたＩＬ－７組成物、それらの製造及び医薬産業におけるそれらの使用に関する。本発明は、まず、ＩＬ－７の活性及び／又は特性が、ポリペプチドのグリコシル化特性に依存して亢進し得ることを示す。本発明は、驚くべきことに、インビトロでのデータとは異なり、少なくとも２つから好ましくは３つの占有されたＮ結合型グリコシル化部位及び１つのＯ結合型グリコシル化部位並びにオリゴ糖部分の最大化された末端シアル化を有するＩＬ－７ポリペプチドによって、インビボでの最高活性を達成できることも開示する。本発明は、延長された活性（これにより投与頻度を低下できる。）及び／又は減少した長期免疫原性を示す、人工的に作製された過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドも開示する。ＩＬ－７の有用性を考慮すると、このようなポリペプチド及び組成物は、ヒト対象を含む対象における免疫反応を制御する上で使用するのに、極めて価値があり有用な活性分子である。

【００４０】

従って、本発明の第一の目的は、過剰グリコシル化されたＩＬ－７構成物に存する。

【００４１】

本発明の更なる目的は、哺乳動物対象を治療するための過剰グリコシル化されたＩＬ－７と医薬として許容される少なくとも１つの担体又は賦形剤とからなる医薬の製造のための過剰グリコシル化されたＩＬ－７の使用に関する。

【００４２】

本発明の更なる目的は、過剰グリコシル化されたＩＬ－７構成物の有効量を対象へ投与することを含む、前記対象中に免疫反応を引き起こし又は刺激するための方法である。

【００４３】

本発明の更なる目的は、対象中に免疫反応を引き起こし又は刺激するための医薬の製造のための過剰グリコシル化された（及び好ましくは高度にシアル化された）ＩＬ－７構成物の使用に関する。

【００４４】

ＩＬ－７ポリペプチド

本発明において、「ＩＬ－７ポリペプチド」は、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ネコ又はイヌ）ＩＬ－７ポリペプチドを示す。より好ましくは、ＩＬ－７ポリペプチドは、特に治療薬又はワクチンとして使用するためのヒトＩＬ－７ポリペプチドである。あるいは、特にヒト以外の霊長類での実験又は獣医学用途で使用する場合、ＩＬ－７ポリペプチドは、サルＩＬ－７ポリペプチド又はイヌポリペプチド等のその他の哺乳動物ＩＬ－７ポリペプチドであり得る。

【００４５】

本発明の好ましいヒトＩＬ－７ポリペプチドは、欧州特許第３１４４１５号又はＷＯ２００４／０１８６８１ Ａ２に記載されているアミノ酸配列、並びにその全ての天然バリエーション及び相同体を含む。ヒトＩＬ－７の配列は、遺伝子バンクからも入手可能である。典型的な野生型タンパク質は、１５２個のアミノ酸と、及び、必要に応じて、更なるＮ末端メチオニン残基を含む（配列番号１）。そのバリエーションには、より好ましくは、ＳＮＰ、スプライシング変異体等を含む天然の多型から生じる天然の対立遺伝子バリエーションが含まれる。特定の実施形態において、ＩＬ－７ポリペプチドという用語は、配列番号１の配列を有するポリペプチド又はその天然バリエーションを表すものとする。

【 0 0 4 6 】

更なる実施形態において、ＩＬ－７ポリペプチドは、イヌＩＬ－７ポリペプチドである。これに関して、本発明は、本願の更なる目的である、単離されたＩＬ－７ポリペプチドの配列を初めて開示する。特に、本発明は、配列番号７に図示されたアミノ酸配列を含むＩＬ－７ポリペプチド、及びその全ての天然バリエーション、相同体又は異なる断片に関する。バリエーション又は相同体という用語は、アミノ酸の１つ又は限定された数の欠失、置換又は付加により、配列番号７とは異なるポリペプチドを表す。好ましくは、このような変異体又は相同体は、配列番号７と８５％超、好ましくは９０％超、好ましくは９５％超、最も好ましくは９８％超の同一性の百分率を示す。

【 0 0 4 7 】

本発明において使用されるＩＬ－７ポリペプチドは、好ましくは組換えＩＬ－７である。本明細書で使用される「組換え」という用語は、ポリペプチドが組換え発現系から、すなわちＩＬ－７ポリペプチドをコードする核酸分子を含有するように遺伝子操作された、宿主細胞の培養物（例えば、微生物又は昆虫又は植物又は哺乳動物）から、又は遺伝子導入植物又は動物から得られるか又はそれに由来する。「微生物」とは、細菌発現系において生成される組換えタンパク質を表す。「哺乳動物」とは、哺乳動物発現系において生成される組換え糖タンパク質を表す。後述のように、これらの宿主細胞は全て、好ましくは天然に又は遺伝子組換え後に、適切なグリコシルトランスフェラーゼ及び／又はシアリルトランスフェラーゼ遺伝子を発現すべきである。ＩＬ－７ポリペプチドは、適切なインビトロ又はインビボでのグリコシルトランスフェラーゼ及び／又はシアリルトランスフェラーゼ分子の使用を通じて、又はオリゴ糖構造を結合させることによってグリコシル化できる。

【 0 0 4 8 】

ヒトＩＬ－７ポリペプチドの具体例は、ジスルフィド架橋Ｃｙｓ ２－Ｃｙｓ ９ ２、Ｃｙｓ ３ ４－Ｃｙｓ １ ２ ９及びＣｙｓ ４ ７－Ｃｙｓ １ ４ １を含む、配列１のポリペプチドである。

【 0 0 4 9 】

また、本発明のＩＬ－７ポリペプチドは、成熟ＩＬ－７ポリペプチドの配列を含み得、又は、例えば分泌ペプチド等の付加的なアミノ酸残基を更に含む。このような分泌ペプチドの好ましい例には、ＥＰＯシグナルペプチド、ＳＥＡＰシグナルペプチド、ＩｇＧカップシグナルペプチド、ラクトトランスフェリン／ビトロネクチンシグナルペプチド、ＶＩＰ／ビトロネクチンシグナルペプチド及びサイトスタチンビスシグナルペプチドからなる群から選択されるシグナルペプチドが含まれるが、これらに限定されるわけではない。これらのシグナルペプチドの配列は、それぞれ、配列番号１３から１８に示されている。特定の実施形態において、シグナルペプチドは、ＥＰＯシグナルペプチド及びＩＬ－７シグナルペプチド由来の配列との間で、本発明者らによって作製されたハイブリッドコンストラクトである。ＥＰｙ ７又はＥＰ ７と呼ばれるこのシグナルペプチドの配列は、配列番号１９に示されており、本発明の具体的な目的である。

【 0 0 5 0 】

過剰グリコシル化されたＩＬ－７及び構成物

本発明において、「過剰グリコシル化されたＩＬ－７」という用語は、少なくとも３つの占有されたグリコシル化部位を有する、すなわち、少なくとも３つのグリコシル化されたアミノ酸残基を有するＩＬ－７ポリペプチドを表す。

【 0 0 5 1 】

「グリコシル化部位」とは、グリコシル化（すなわち、炭水化物構造の付着）に供される、ポリペプチド中のあらゆるアミノ酸残基又は領域を示す。このような部位は、典型的には、Ｎ－グリコシル化部位（すなわち、Ｎ結合を通じて炭水化物構造が付着できる、ポリペプチド中のあらゆるアミノ酸残基又は領域）及び／又はＯ－グリコシル化部位（すなわち、Ｏ結合を通じて炭水化物構造が付着できる、ポリペプチド中のあらゆるアミノ酸残基又は領域）である。グリコシル化のためのコンセンサス配列は、本分野において、それ

自体公知である。例示として、コンセンサス N - グリコシル化部位は、典型的には、以下の構造、すなわち、X がプロリン以外の全てのアミノ酸である A s n - X - S e r / T h r を有する。以下に開示されているように、このようなグリコシル化部位は、I L - 7 ポリペプチド配列内に天然に存在する及び / 又は前記配列内に人工的に付加される又は作製されるかのいずれかであり得る。

【 0 0 5 2 】

「過剰グリコシル化された I L - 7 構成物」という用語は、I L - 7 ポリペプチドの少なくとも 8 0 % が、少なくとも 3 つの占有されたグリコシル化部位、すなわち少なくとも 3 つのグリコシル化されたアミノ酸残基を有する I L - 7 構成物を表す。好ましくは、このような組成物は、少なくとも、3 つの N - グリコシル化部位においてグリコシル化され、及び、場合によって、1 つの O - グリコシル化部位においてグリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの少なくとも 8 0 % を含む。このような組成物は、最も好ましくは、グリコシル化されていない又はモノグリコシル化された I L - 7 ポリペプチドを実質的に欠如し、従って、ビグリコシル化された I L - 7 ポリペプチドを最大 2 0 % 含む。好ましい実施形態において、過剰グリコシル化された I L - 7 組成物とは、I L - 7 ポリペプチドの少なくとも 9 0 % が 3 つの N - グリコシル化部位において、及び場合によって、1 つの O - グリコシル化部位においてグリコシル化された I L - 7 組成物を表す。このような組成物は、最も好ましくはグリコシル化されていない I L - 7 ポリペプチド又はモノグリコシル化された I L - 7 ポリペプチドを実質的に欠如し、従って、モノ - O - グリコシル化された、又はされていないビ - N - グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドを最大 1 0 % 含む。

【 0 0 5 3 】

I L - 7 一次アミノ酸配列は、3 つの N - グリコシル化部位の候補、すなわち位置 7 0、9 1 及び 1 1 6 に位置するアスパラギン (A s n) 残基 (ヒト野生型配列に関して、配列番号 1 参照。) を含む。更に、本発明は、I L - 7 配列が 1 つの O - グリコシル化部位、すなわち位置 1 1 0 にトレオニン (T h r) 残基も含有することを示す。特定の実施形態において、本発明の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドは、1 つの占有された O - グリコシル化部位を伴っている又は伴っていない占有された上述の 3 つの N - グリコシル化部位を有する I L - 7 ポリペプチドであり、I L - 7 組成物は、I L - 7 ポリペプチドの少なくとも 8 0 % が上述の N - グリコシル化部位において、及び場合によって O - グリコシル化部位においてもグリコシル化された I L - 7 組成物である。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態において、過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドは、人工的に付加又は作製された更なるグリコシル化部位を含み得る。従って、本発明の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドは、少なくとも 3 つの N - グリコシル化部位及び 1 つの O - グリコシル化部位が占有された I L - 7 ポリペプチドであり、該部位は、天然に存在し及び / 又は人工的に付加 / 作製され、過剰グリコシル化された I L - 7 組成物は、I L - 7 ポリペプチドの少なくとも 8 0 % が、少なくとも 4 つのグリコシル化部位においてグリコシル化された I L - 7 組成物であり、該部位は、天然に存在し及び / 又は人工的に付加 / 作製される。

【 0 0 5 5 】

この点において、本発明は、ここに、人工的に作製された少なくとも 1 つのグリコシル化部位を含む修飾されたアミノ酸配列を有する I L - 7 ポリペプチドを開示する。特定の実施形態によると、本発明の I L - 7 ポリペプチドは、1、2、3 又は 4 個の、より好ましくは 1、2 又は 3 個の、更により好ましくは 1 又は 2 個の人工的に作製されるグリコシル化部位を含む。

【 0 0 5 6 】

人工的に作製されるグリコシル化部位は、好ましくは N 結合型グリコシル化部位である。コンセンサス N - グリコシル化部位は、典型的には、以下構造、すなわち、X がプロリン以外の全てのアミノ酸である A s n - X - S e r / T h r を有する。

【0057】

グリコシル化部位は、集合した合成オリゴヌクレオチドから、又はIL-7一次アミノ酸配列内の多様な位置での変異誘発法などの幾つかの技術、及び本分野でそれ自体公知の次の技術を使用して、作製され又は化学的に付加され得る。修飾されたIL-7ポリペプチドは、IL-7受容体に結合する能力を保持すべきであるので、グリコシル化部位は、最も好ましくは、IL-7受容体に結合するIL-7の能力を変化させないIL-7ポリペプチド配列の領域又はドメイン内に作製される。より好ましくは、前記部位は、好ましくはグリシン残基のすぐ近傍以外の、前記ポリペプチドの α 螺旋の外側に導入される。好ましくは、より強固で、前記ポリペプチドの三次構造にとって重要な領域を回避するため、前記部位は最も可動性のある領域に導入される。好ましくは、グリコシル化部位の作製は、ジスルフィド架橋に関連する全てのシステイン残基（例えば、Cys 2、34、47、92、129及び141）にも、IL-7ポリペプチドとその同族受容体との相互作用に関連する何れの重要な残基（例えば、Ser 19、Leu 23及び77、Tyr 12、Val 15、Gln 22、Lys 81及びGlu 84）にも、前記ポリペプチドの活性に関連する全ての保存された残基（例えば、Arg 133、Gln 136、Glu 137、Lys 139及び144、Thr 140及びAsn 143）にも影響を及ぼさない。典型的には、前記グリコシル化部位は、典型的なコンセンサスグリコシル化部位を作製するために、基準IL-7ポリペプチドの一次配列内での1つ又は数個のアミノ酸残基を変異させ、欠失させ、又は付加させることによって、作製される。

10

【0058】

特定の実施形態において、本発明は、Lys 28 Asn - Ile 30 Ser - Ile 30 Thr - Ile 30 Asn - Ser 32 Thr - Leu 35 Ser - Leu 35 Thr - Glu 38 Ser - Glu 38 Thr - Phe 39 Ser - Phe 39 Thr - Phe 42 Ser - Phe 42 Thr - Glu 52 Ser - Glu 52 Thr - Val 82 Asn - Glu 84 Thr - Glu 84 Ser - Lys 97 Asn - Arg 99 Thr - Arg 99 Ser - Ala 102 Asn - Leu 104 Thr - Leu 104 Ser - Leu 104 Asn - Glu 106 Thr - Glu 106 Ser - Leu 128 Ser - Leu 128 Thr - Ile 145 Asn - Met 147 Thr - Met 147 Ser - Met 147 Asn - Thr 149 Ser から（又は他の哺乳動物IL-7ポリペプチド中の対応する位置から）選択される1つ又は数個のアミノ酸修飾を含むヒト（又は哺乳動物）IL-7ポリペプチドの配列を含むIL-7ポリペプチドに関する。

20

30

【0059】

本発明の（ヒト）IL-7ポリペプチドの具体例は、以下の表1に開示されるアミノ酸修飾を含む。

【0060】

【表 1】

表 1

IL-7 ポリペプチドのアナログ	アミノ酸の変化
HG28a	Lys28Asn ; Ile30Ser
HG28b	Lys28Asn ; Ile30Thr
HG30	Ile30Asn ; Ser32Thr
HG33a	Leu35Ser
HG33b	Leu35Thr
HG36a	Glu38Ser
HG36b	Glu38Thr
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser
HG40b	Phe42Thr
HG50a	Glu52Ser
HG50b	Glu52Thr
HG82a	Val82Asn ; Glu84Ser
HG82b	Val82Asn ; Glu84Thr
HG97a	Lys97Asn ; Arg99Ser
HG97b	Lys97Asn ; Arg99Thr
HG102a	Ala102Asn ; Leu104Ser
HG102b	Ala102Asn ; Leu104Thr
HG104a	Leu104Asn ; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn ; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG145a	Ile145Asn ; Met147Ser
HG145b	Ile145Asn ; Met147Thr
HG147	Met147Asn ; Thr149Ser

【 0 0 6 1 】

上述のアミノ酸修飾は、IL-7 の結合親和性を実質的に変化させずに N - グリコシル化部位を作出し、これにより本発明の改善された IL-7 ポリペプチドが作製される。

【 0 0 6 2 】

「結合親和性を実質的に変化させない」という用語は、結合親和性が、変化しない又は受容体との相互作用から生じるインビボでの効果に影響を与えずに低下し得ることを意味する。インビトロで定量化された場合、結合親和性は、50%未満、好ましくは40%未満、好ましくは30%未満、好ましくは20%未満、好ましくは5%未満低下し得る。

【 0 0 6 3 】

また、上述の修飾は、本発明の I L - 7 ポリペプチド内の数個の更なるグリコシル化部位を作製するために組み合わせることができる。この点において、本発明は、少なくとも 1 つから 4 つの更なる (N 結合型) グリコシル化部位の付加によって修飾される (ヒト又は哺乳動物) インターロイキン - 7 の一次配列を有する生物学的に活性な全ての I L - 7 ポリペプチドに関する。本発明の更に好ましい実施形態は、 1 つ又は 2 つの更なる (N 結合型) グリコシル化部位を含むインターロイキン - 7 の一次配列を含む生物学的に活性な I L - 7 ポリペプチドである。

【 0 0 6 4 】

本発明の最も好ましい I L - 7 ポリペプチドは、生物学的に活性である、すなわち、前記 I L - 7 ポリペプチドは、インターロイキン - 7 受容体へ結合することができ、特異的バイオアッセイにおいてインビトロでの活性を示す及び / 又はインビボでの増加した平均残存時間 (M R T) を示す。

【 0 0 6 5 】

E D 5 0 値が最大活性の半分と等しい用量に対応する用量 / 反応バイオアッセイ研究において、グリコシル化されていない標準物質と過剰グリコシル化された I L - 7 との間の活性の比較を実施した。過剰グリコシル化は、通常、バイオアッセイにおいて減少された活性をもたらすが、インビボ活性の低下を意味しない。本発明の状況において、動態学的特性は、実際、インビボでの活性を改善する。

【 0 0 6 6 】

E D 5 0 がインビボでの I L - 7 の活性を反映しないという事実に関わらず、E D 5 0 は、グリコシル化の同一レベルを有する異なる試料間での比較を可能とする。この枠組みにおいて、グリコシル化されていない標準物質に関する典型的な E D 5 0 値は、0 . 5 から 2 . 0 n g I L - 7 / m L の間の範囲に及んでいたのに対し、過剰グリコシル化された E D 5 0 値は、過剰グリコシル化された 1 . 5 から 3 . 5 n g の I L - 7 / m L の間の範囲に及んでいた。

【 0 0 6 7 】

本発明の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドは、改善された安定性、並びに哺乳動物宿主におけるインビボでの延長された半減期及び平均残存時間を示す。「改善された安定性」、「延長された半減期及び平均残存時間」という用語は、グリコシル化されていない形態との比較において理解されるべきである。好ましくは、半減期の増大は、少なくとも約 3 倍であり、好ましくは、少なくとも約 5 から 2 0 倍である。平均残存時間 (M R T) とは、初期投与後の患者の血中の各 I L - 7 分子の残存時間の平均を意味する。好ましくは、M R T の増大は、グリコシル化されていない形態の M R T と比較して、少なくとも約 2 倍であり又は好ましくは少なくとも約 4 から 1 0 倍である。

【 0 0 6 8 】

例えば、過剰グリコシル化された形態の血漿半減期は、3 0 から 4 0 時間の範囲にあることが示されたのに対し、グリコシル化されていない形態の血漿半減期は、通常、5 から 8 時間である (両形態が同一条件下で皮下的に投与されるとき、すなわち 1 回の注入の場合) 。平均残存時間 (M R T) は、約 4 0 時間であったのに対し、グリコシル化されていない形態では約 1 0 時間であった。

【 0 0 6 9 】

本発明は、本発明の I L - 7 ポリペプチドの全ての別個の断片、すなわち、上に開示されているアミノ酸修飾を含むあらゆる断片、又は上に開示される人工的に作製されたグリコシル化部位を含むあらゆる断片も包含することが理解されるべきである。このような断片は、典型的に、少なくとも 5 つのアミノ酸残基、典型的に少なくとも 8、9、1 0、1 1、1 2 又は 1 5 の残基を含有し、最大 2 0、3 0、4 0、5 0 又はそれ以上の連続したアミノ酸残基を含有し得る。このような断片は、特異的抗体を産生するために、アンタゴニストとして又は免疫原として使用され得る。

【 0 0 7 0 】

また、上述のアミノ酸位置はヒトIL-7ポリペプチド配列への参照によって付与されているが、本発明は、ヒトの配列に対する配列アライメントに基づいた哺乳類配列中の相
同的突然変異によって修飾された哺乳動物IL-7の一次配列を有するIL-7ポリペ
プチドも包含することは理解されるべきである。

【0071】

本発明の好ましい実施形態は、

Phe39Ser - Phe39Thr - Phe42Ser - Phe42Thr - Leu
104Asn - Glu106Thr - Glu106Ser - Leu128Ser - Leu
128Thr - Met147Asn及びこれらの組み合わせ、又はこれらの別個の断片
からなる群から選択される1つ又は数個のアミノ酸修飾を含む生物学的に活性な新規IL
-7ポリペプチドに関する。

10

【0072】

本発明の最も好ましい修飾されたIL-7ポリペプチドは、以下の表2に開示される。

【0073】

【表2】

表2

IL-7 ポリペプチド変種	アミノ酸の変化
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser
HG40b	Phe42Thr
HG104a	Leu104Asn ; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn ; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG147	Met147Asn ; Thr149Ser

20

30

【0074】

本発明の更なる特定の目的は、上に開示されている一次アミノ酸配列を含む過剰グリコ
シル化されたIL-7ポリペプチドである。

【0075】

オリゴ糖単位

本発明の過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチド中の特定のグリコシル化部位に
付着されたオリゴ糖単位の構造及び数は変化し得る。これらは、例えば、N - アセチルグ
ルコサミン、N - アセチルガラクトサミン、マンノース、ガラクトース、グルコース、フ
コース、キシロース、グルクロン酸、イズロン酸及び/又はシアル酸であり得る。

40

【0076】

より好ましくは、過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドは、

a) 哺乳動物型の糖鎖、好ましくはCHO細胞によって発現された種類の前記糖鎖；
b) 複合N - 糖鎖（例えば、三岐又は二岐構造）を含み、より好ましくは高マンノース
及びアセチルグルコサミン分子及び多量の末端シアル酸残基を含有する糖鎖；

c) 末端シアル酸残基を有さず、及び好ましくは末端シアル酸残基を有するO - 糖鎖を
含む糖鎖；

d) α 2, 6 - シアリルトランスフェラーゼ又は α 2, 3 - シアリルトランスフェラー
ゼによってシアル化された糖鎖；及び/又は

50

e) 3 から 30 の、好ましくは 7 から 23 の間のシアリル - N - アセチルガラクトサミンを示すシアル化された糖鎖；
から選択される N 結合型及び / 又は O 結合型糖鎖を含む（又はそれらに富む。）。

【0077】

特に好ましい糖鎖は、部分的又は完全な末端シアル化を有する三岐又は二岐構造を含む。更なる好ましい糖鎖は、三岐構造及びトリ又はビスシアル化、及び / 又はジシアル化を有する二岐構造を含む。このような炭水化物の例は、表 4 に開示され、モチーフ 2420 番、2623 番、2785 番及び 3092 番を含む。

【0078】

更なる特異的实施形態によると、本発明の過剰グリコシル化されたインターロイキン - 7 ポリペプチドは、（ウェスタンブロットによって確認された）ゲル電気泳動法によって、6.5 未満の平均等電点、及び 27 kDa 超の、28 kDa と 65 kDa の間の（ $7N + 1O$ グリコシル化に関する理論値）、好ましくは（ $3N + 1O$ グリコシル化に対して示されるような）28 kDa と 35 kDa との間の見かけの平均分子量を有し、これは、質量分析による 25 kDa に相当する。

【0079】

特定の実施形態において、本発明の過剰グリコシル化された IL - 7 ポリペプチドは、 $\alpha 2, 6$ シアリルトランスフェラーゼを安定的に発現し、及び CMP - Neu5Ac ヒドロラーゼ活性の欠失、好ましくは CHO グリコシル化変異体を有する哺乳動物グリコシル化変異体によって産生される。このようなグリコシル化には、典型的には、N - アセチルグルコサミン、N - アセチルガラクトサミン、マンノース、ガラクトース、グルコース、フコース、キシロース、グルクロン酸、イズロン酸及び / 又はシアル酸が含まれる。

【0080】

他の実施形態において、過剰グリコシル化された IL - 7 ポリペプチドは、ヒト間質細胞系又は上皮細胞系、HEK - 293（ヒト胚性腎臓）、HER（ヒト胚性網膜）、HEK（ヒト上皮角化細胞）、ヒト胸腺又はヒト皮膚上皮細胞系、ヒト骨髄又はヒト骨髄間質細胞系から選択され得るヒト宿主細胞中での組換え技術によって産生される。

【0081】

本発明の最も好ましい過剰グリコシル化されたインターロイキン - 7 ポリペプチドは、次の特徴を有する。

【0082】

a) 前記ポリペプチドは、組換えられた生成細胞株中で改善された分泌特性及び産生速度を有し；及び / 又は

b) 前記ポリペプチドは、IL - 7 ポリペプチドあたりのシアル酸残基を多量に含有し、等電点の値を減少させ、及び平均残存時間の改善をもたらす；及び / 又は

c) 前記ポリペプチドは、分子間凝集から保護され；及び / 又は

d) 前記ポリペプチドは、タンパク質分解に対して低下した感受性を有し；及び / 又は

e) 前記ポリペプチドは、マスクされた抗原部位を含有し、低下した免疫原性傾向、MHC II 分子を通じた、APC（抗原提示細胞）捕捉、プロセッシング及び提示に対して低下した脆弱性を反映し；及び / 又は

f) 前記ポリペプチドは、化学的安定性を増大させ；及び / 又は

g) 前記ポリペプチドは、グリコシル化されていない親ペプチドと比較して、インビボでの延長された生物学的半減期を有し（IL - 7 の長期作用イソフォーム）；及び / 又は

h) 前記ポリペプチドは、主として、より優れた平均残存時間（MRT）のために、グリコシル化されていない親タンパク質と比較してインビボでの増大した薬理学的活性を有し；及び / 又は

i) 前記ポリペプチドは、より長期間作用する生成物のために、1 週間に 3 / 4 回から 1 週間に 2 回又は 1 回又は 2 週間ごとに 1 回まで、投薬スケジュールをあまり頻繁にせず；及び / 又は

j) 前記ポリペプチドは、改善された薬物動態学的特性（減少したピーク濃度及び改善

10

20

30

40

50

された平均残存時間)を示し、及び/又は

k) 前記ポリペプチドは、質量分析から測定される25 KDa、又はSDS-PAGE分析から測定される27 kDaを上回る平均分子量及び6.5を下回る平均等電点を示す。

【0083】

本発明のポリペプチドは、単量体の形態であるか、又は選択した特定の化合物と会合され、若しくは複合体化され得る。この点において、特定の実施形態において、IL-7配座異性体は、肝細胞増殖因子(「HGF」)へ、ヘテロ二量体として結合する。ヘテロ二量体は、化学的に、複合体形成によって又は組換え技術によって(すなわち遺伝子融合によって)得られ得る。

10

【0084】

他の特定の実施形態において、IL-7ポリペプチドは、IgG重鎖のFc部分へ、典型的にはペプチド蝶番領域を通じて機能的に付着される。このような融合分子は、インビボでの増加した安定性及び半減期を有する可能性を秘めている。IgG部分は、最も好ましくは、ヒトIgG1又はIgG4である。

【0085】

他の特定の実施形態において、IL-7ポリペプチドは、融合タンパク質としてヒト血清アルブミン(「HSA」)又はHSAの部分へ機能的に会合される。このような融合分子は、インビボでの増加した安定性及び延長された半減期を有する可能性を秘めている。

【0086】

20

本発明の更なる目的は、過剰グリコシル化されたIL-7組成物である。このような組成物は、好ましくは、上記、IL-7ポリペプチド配列(例えば、共通のN結合型及びO結合型炭水化物部位)内に自然に存在し及び/又は人工的に作製されるグリコシル化部位であり得る、少なくとも3つの別個のアミノ酸残基上でグリコシル化された、少なくとも80%の、好ましくは80%と95%の間のIL-7ポリペプチドを含む。

【0087】

特定の、具体的な実施形態によると、本発明は、以下のものを含む過剰グリコシル化されたIL-7構造物に関する。

【0088】

a) 3つのコンセンサスN結合型炭水化物部位(Asn70/91/116)上でグリコシル化され、1つのO結合型炭水化物部位(Thr110)上でさらにグリコシル化されている又はされていないインターロイキン-7の大部分(80%超、好ましくは90%超、最も好ましくは約95%超); 好ましくは、前記構造物は、(1つのO結合型炭水化物部位に会合されている又は会合されていない)2つのコンセンサスN結合型炭水化物部位上のみでグリコシル化されたインターロイキン-7の一部(20%未満、好ましくは約10%未満)を含有し、及び/又はモノグリコシル化されている若しくはグリコシル化されていないタンパク質を実質的に含まない; 又は

30

b) グリコシル化の1つの付加的な部位を導入するように修飾されたIL-7一次アミノ酸配列を有し、4つのN結合型炭水化物部位上でグリコシル化され、及び1つのO結合型炭水化物部位(Thr110)でさらにグリコシル化されている又はされていない生物学的に活性なインターロイキン-7類縁体の大部分(80%超、好ましくは90%超、最も好ましくは約95%超); 好ましくは、前記構造物は、(1つのO結合型炭水化物部位へ会合されている又は会合されていない)3つ又は2つのN結合型炭水化物部位上のみでグリコシル化された同一類縁体の一部(20%未満、好ましくは約10%未満)を含有する及び/又はモノグリコシル化されたタンパク質若しくはグリコシル化されていないタンパク質を実質的に含まない; 又は

40

c) グリコシル化の2つの付加的な部位を導入するように修飾されたIL-7一次アミノ酸配列を有し、5つのN結合型炭水化物部位上でグリコシル化されており、及び1つのO結合型炭水化物部位(Thr110)上でさらにグリコシル化されている又はされていないインターロイキン-7の生物学的に活性な類縁体の大部分(80%超、好ましくは9

50

0 % 超、最も好ましくは約 95 % 超) ; 好ましくは、前記構造物は、1 つの O 結合型炭水化物部位に会合されている又は会合していない 4、3 又は 2 つの N 結合型炭水化物部位の上でグリコシル化された同一類縁体の一部 (20 % 未満、好ましくは約 10 % 未満) を含有する及び / 又はモノグリコシル化されたタンパク質若しくはグリコシル化されていないタンパク質を実質的に含まない ; 又は

d) グリコシル化の 3 つの付加的な部位を導入するよう修飾された IL - 7 一次アミノ酸配列を有し、6 つの N 結合型炭水化物部位上でグリコシル化され、及び 1 つの O 結合型炭水化物部位 (Thr 110) 上でさらにグリコシル化されている又はされていないインターロイキン - 7 の生物学的に活性な類縁体の大部分 (80 % 超、好ましくは 90 % 超、最も好ましくは約 95 % 超) ; 好ましくは、前記構造物は、1 つの O 結合型炭水化物部位に会合されている又は会合されていない 5、4、3、又は 2 つの N 結合型炭水化物部位上のみでグリコシル化された同一類縁体の一部 (20 % 未満、好ましくは約 10 % 未満) を含有する及び / 又はモノグリコシル化されているか若しくはグリコシル化していないタンパク質を実質的に含まない ; 又は

e) グリコシル化の 4 つの付加的な部位を導入するように修飾された IL - 7 一次アミノ酸配列を有し、7 つの N 結合型炭水化物部位上でグリコシル化され、及び 1 つの O 結合型炭水化物部位 (Thr 110) 上でさらにグリコシル化されている又はされていないインターロイキン - 7 の生物学的に活性な類縁体の大部分 (80 % 超、好ましくは 90 % 超、最も好ましくは約 95 % 超) ; 好ましくは、前記構成物は、1 つの O 結合型炭水化物部位に会合されている又は会合されていない 6、5、4、3 又は 2 つの N 結合型炭水化物部位上のみでグリコシル化された同一類縁体の一部 (20 % 未満、好ましくは約 10 % 未満) を含有する及び / 又はモノグリコシル化された若しくはグリコシル化していないタンパク質を本質的に欠失していることを含む。

【0089】

本発明は、活性物質として上述の構成物を含む医薬組成物にも関する。

【0090】

核酸

本発明の更なる目的は、上記 IL - 7 ポリペプチドをコードする核酸分子に存する。前記核酸分子は、全ての DNA 又は RNA 分子、典型的には cDNA 分子であり得る。

【0091】

本発明の具体的目的は、配列番号 2 のヌクレオチド残基 79 から末端を含む核酸、並びにその別個の断片及び相補鎖である。

【0092】

本発明の更なる目的は、配列番号 4 を含む核酸、並びにその個別の全ての断片、(配列番号 4 と少なくとも 90 % の同一性を有する) 変異体及び相補鎖である。

【0093】

本発明の更なる目的は、配列番号 6 を含む核酸、並びにその別個の全ての断片、(配列番号 6 と少なくとも 90 % の同一性を有する) 変異体及び相補鎖である。本発明の特異的な目的は、配列番号 6 のヌクレオチド残基 79 から末端を含む核酸、並びに (配列番号 6 と少なくとも 90 % の同一性を有する) その変異体及び相補鎖である。本発明は、このような配列によってコードされるポリペプチドも包含する (例えば、配列番号 7) 。

【0094】

核酸に関連して上述に使用される「バリエント」という用語は、より具体的には、ストリンジェントな条件下で基準配列とハイブリッド形成し、及び / 又は基準配列によってコードされるポリペプチドと同種の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を示す。最も好ましいバリエントは、基準配列と少なくとも 92 % と 99 % との間 (例えば、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 %) の同一性を示す。

【0095】

本発明の更なる具体的な目的は、

【 0 0 9 6 】

【 化 1 】

CTG AAT AAC GAA ACT AAC 配列番号 8

AAC TTC ACT AAG 配列番号 9

GCC AAC GGT ACC 配列番号 10

CTG AAC GAC AGC TGT 配列番号 11 又は

ATC TTG AAC GGG 配列番号 12

10

の配列又はこれらの組み合わせを含む核酸である。

【 0 0 9 7 】

本発明の核酸の具体例は、配列番号 8 から 12 の何れか 1 つに示されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 9 8 】

本発明の更なる目的は、上記核酸分子を含むクローニング及び／又は発現ベクターに存する。前記ベクターは、あらゆる原核生物又は真核生物ベクター、典型的には真核生物ベクターであり得、プラスミド、コスミド、ウィルスベクター、人工染色体等から選択され得る。前記ベクターは、選択された宿主細胞中でのコード核酸の適切な発現を可能にするあらゆる制御配列、例えば、プロモーター、ターミネーター、ポリ A、複製開始点、組み込み領域（例えば、相同領域）、イントロン、UTR 配列、マーカー遺伝子等を含み得る。

20

【 0 0 9 9 】

本発明の具体的な目的は、哺乳動物宿主又は宿主細胞中で上記核酸の発現を可能にする調節エレメントへ操作可能に連結された核酸分子（シグナルペプチドを含む。）を含む発現ベクターである。

【 0 1 0 0 】

好ましい調節エレメントには、以下に限定されるわけではないが、構成的、組織特異的又は制御されたプロモーターを含むウィルス性、細胞性及び合成プロモーターから、特に CMV プロモーター、EFa プロモーター及びメタロチオネインプロモーターからなる群から選択され得るプロモーターが含まれる。本発明のベクター内に含有され得る更なる調節エレメントには、Bcl-2 遺伝子、UTR 配列及び MAR 配列が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

30

【 0 1 0 1 】

好ましい実施形態において、ベクターは、エピソーム発現ベクターである。

【 0 1 0 2 】

上述の核酸及びベクターは、例えば、多様なコンピテント宿主又は宿主細胞において組換え哺乳動物 IL-7 ポリペプチドを産生するために、及び遺伝子治療目的のために使用され得る。

【 0 1 0 3 】

本発明の別の目的は、上に開示されている核酸又はベクターを含む組換え宿主細胞に存する。このような組換え細胞は、原核細胞又は、より好ましくは、例えば酵母、昆虫、植物又は哺乳動物細胞等の真核細胞であり得る。

40

【 0 1 0 4 】

好ましい実施形態において、宿主細胞は、好ましくは PERC6、NSO 細胞及び BHK 細胞、好ましくは CHO 細胞から選択される哺乳動物細胞であるか、又はヒト細胞系である。ベクター、コンストラクト及び組換え細胞は、本願の以後の章において、より詳細に開示されているが、これらに限定されるわけではない。

【 0 1 0 5 】

製剤原料及び医薬組成物

50

本発明の別の目的は、所望の生成物として、上記ＩＬ－７ポリペプチド、典型的には過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドを含む製剤原料に存する。より好ましくは、前記製剤原料は、グリコシル化されていない又はモノグリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチド約１０％未満を含有するか、及び／又は生成物関連不純物を実質的に含まない。

【０１０６】

本発明は、医薬の製造（「医薬製品」）又は医薬組成物における上記製剤原料の使用にも関する。

【０１０７】

好ましい製剤原料はさらに、加工関連不純物を実質的に有しない。

【０１０８】

本願において、「製剤原料」という用語は、薬物の活性成分としての使用に適した生成物を指す。本発明に記載されている「製剤原料」は、性質上、すなわち、その生成方法（例えば、組換えＤＮＡ技術）の結果として、複雑な生成物である。

【０１０９】

本発明は、効率的な治療上の及びワクチン増強の効果をもたらすために、ＩＬ－７製剤原料又は医薬組成物が、主要分子種として、過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチド組成物を含有すべきであることをここに開示する。

【０１１０】

本明細書において使用される「実質的に有しない」という用語は、製剤原料が、生成物関連不純物及び加工関連不純物の有意な又は有害な量を含有しないことを示す。より具体的には、製剤原料は、生成物関連不純物及び加工関連不純物の５％未満、より好ましくは３％未満、さらにより好ましくは２％未満を含有すべきである。最も好ましい製剤原料は、生成物関連不純物の約１％未満及び加工関連不純物の僅かな量のみを含有する。

【０１１１】

ＩＬ－７生成物関連物質とは、例えば、ＩＬ－７の活性又は不活性ペプチド又はポリペプチド断片を含むＩＬ－７分子バリエーションを示す。ＩＬ－７関連不純物には、例えば、モノ又はビススルフィド架橋を含むヒトＩＬ－７ポリペプチド、末端切断されたＩＬ－７、脱アミド化された組換えＩＬ－７、ＩＬ－７を含む二量体若しくは多量体タンパク質、酸化メチオニン形態又はこれらの組み合わせが含まれる。

【０１１２】

それらの生物活性がどのようなものであれ、これらのＩＬ－７分子バリエーション及びＩＬ－７関連不純物は、厳密に、最小限に抑制するか、又は、製剤原料から廃棄されるべきである。

【０１１３】

加工関連不純物には、ＤＮＡ、エンドトキシン、細胞片、ウィルス等が含まれる。

【０１１４】

従って、好ましい製剤原料は、過剰グリコシル化されたＩＬ－７組成物の総重量が、本発明に記載の過剰グリコシル化されたＩＬ－７組成物の重量に対して少なくとも９５％、好ましくは少なくとも９８重量％、より好ましくは少なくとも９９．５重量％を含む製剤原料である。

【０１１５】

本発明は、製剤原料又は上記過剰グリコシル化されたＩＬ－７構成物の有効量を含む医薬組成物と、１つ以上の医薬として適合性を有するか又は許容される担体、賦形剤又は希釈剤とを含む医薬組成物にも関する。

【０１１６】

本発明は、上記過剰グリコシル化されたＩＬ－７構成物を含む医薬組成物が、ＩＬ－７のワクチン特性及び、抗原特異的免疫反応を刺激するその能力を明確に増大させることを示す。

【０１１７】

医薬として適合性を有する又は生理学的に許容される希釈剤は、中性ないし弱酸性の、

10

20

30

40

50

等張性の、緩衝化された生理的食塩水、溶液又は懸濁液から、及びより好ましくはショ糖、トレハロース及びアミノ酸から選択され得る。医薬として適合性のある担体は、好ましくは、等張性溶液を形成するための適切な緩衝液中に含有される。適切な緩衝液は、好ましくは4.5から7.5の間を、好ましくは5.0から7.0を、さらにより好ましくは約5.5を含むpH範囲を有し、好ましくは、クエン酸ナトリウム緩衝液又は酢酸アンモニウム緩衝液から選択される有機塩である。医薬組成物は、懸濁液、溶液、ゲル、粉末、固体等の形態であり得る。前記組成物は、好ましくは、液体形態である。

【0118】

前記組成物は、糖、アミノ酸、タンパク質、界面活性剤等の安定化剤を含み得る。前記組成物は、リン酸塩、塩化物等を含むあらゆる塩類溶液を含み得る。

10

【0119】

本発明の特定の医薬組成物は、活性な製剤原料に加えて、タンパク質及び/又は界面活性剤を含む。このタンパク質、又は天然源のその他の高分子量分子の存在は、宿主免疫系へのIL-7の曝露を低下させ、それゆえ、二次的な効果を回避する。より好ましくは、前記タンパク質は、ヒト由来の全てのタンパク質など、対象において非免疫原性である。タンパク質の最も好ましい例は、ヒト血清アルブミンである。界面活性剤は、ポリソルベート生成物等の公知の界面活性剤、好ましくはトウイーン20（商標）又はトウイーン80（商標）から選択され得る。本発明の具体的組成物は、組成物の投与後に注入部位でタンパク質凝集及び/又は薬物生成物の局所的な持続性によってIL-7免疫原性を防止できるヒト血清アルブミン（好ましくは2から5mg/mL）又はポリソルベート（トウイーン20又は80（典型的には0.005%））又は張力活性（*tensioactive*）物質等のその他の物質又はアミノ酸（例えば、アルギニン、グルタミン酸塩、又はアルギニンとグルタミン酸塩との混合物）又は糖（例えば、ショ糖、トレハロース、ソルビトール）を含む。

20

【0120】

この点において、本発明の特定の目的は、約1mg/mLから50mg/mLの、好ましくは約3mg/mLから20mg/mLの濃度で、過剰グリコシル化されたインターロイキン-7構成物を含有する医薬組成物に存する。好ましくは、投与されるべきグリコシル化されたインターロイキン-7の有効量は、感染性疾患の治療又は予防のためには、約10から200µg/kg/週の間で、より好ましくは約10から60µg/kg/週の間で含まれる。

30

【0121】

本発明のポリペプチド及び組成物の改善された特性を考慮して、これらの医薬組成物は、同等の治療効果を得るために、同じ量で、従来技術の組成物又は生成物よりも低頻度で投与する必要がある。より具体的には、典型的な実施形態において、これらの組成物は、1週間に3回、1週間に2回、1週間に1回、隔週ごとに1回、1ヶ月に1回、ワクチン接種前に1回又は2回又はワクチン接種の前及び後に投与される。好ましい投与計画は、7、10又は14日間に1回、医薬組成物を投与することである。

好ましい投与経路は、非経口経路である。非経口経路は、好ましくは腫瘍内、より好ましくは静脈内又は皮下的投与である。非経口投与には、動脈内、腹腔内又は筋肉内注入も含まれる。しかしながら、患者の健康状態及び反応性に応じて、その他の適切な投与経路を想定し得ることを理解すべきである。

40

【0122】

特定の実施形態において、投与経路は、経口経路である。他のポリペプチドホルモンと比較して、過剰グリコシル化されたIL-7の著しい安定性のために、過剰グリコシル化されたIL-7に対して、経口経路が実際に許容される。次に、本発明の組成物は、好ましくは、錠剤又は粉末又はカプセル等の固体形態にあるか、又は医薬として許容される適切な担体中に調製されたシロップ又は乳剤等の液体状態にある。好ましくは、担体自体は、消化管中及び循環器系中で安定であり、許容可能な血漿半減期を示す。

【0123】

50

過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドのマイクロエマルジョン又はリポソーム製剤を含有する胃酸耐性カプセル等の胃酸耐性カプセルが有利である。

【 0 1 2 4 】

この医薬組成物は、組み合わせられた、分割された又は連続した使用のために、好ましくは造血細胞増殖因子、サイトカイン、抗原分子（又は抗原）及びアジュバントから選択される、免疫刺激剤等の更なる活性成分を含み得る。

【 0 1 2 5 】

このような更なる活性成分は、組み合わせられた、分割された又は連続した使用のために、I L - 7 との組み合わせにて、又は個別に製剤化され得る。第一の変形において、活性成分は、同一の入れ物又は容器中で一緒に製剤化される。別の好ましい変形において、活性成分は、個別に、すなわち別個の容器又は容器中で調製される。この実施形態によると、前記成分は、分割して、例えば同時又は順次に（例えば、異なる注入部位で又は異なる時点で）投与され、最も効率的な生物学的効果をもたらし得る。また、上述のように、1 つ又は 2 つの活性成分の反復投与が実施され得る。

【 0 1 2 6 】

この点において、本発明は、組み合わせられた、分割された又は連続した使用のために、上記過剰グリコシル化された I L - 7 組成物と免疫刺激剤及び抗原性分子から選択される活性成分とを含む医薬組成物に関する。アジュバントは、好ましくは、個別に調合される。

【 0 1 2 7 】

造血細胞増殖因子は、好ましくは、幹細胞因子（S C F）、特に S C F、G - C S F、G M - C S F、F l t - 3 リガンド、I L - 1 5 及び I L - 2 の可溶性形態から選択される。ワクチン増強のためのサイトカイン又はケモカインの典型的な例には、T h 1 型免疫反応を誘導及び／又は刺激するサイトカインが含まれる。サイトカインは好ましくは、 α 又は γ インターフェロン、I L - 2、I L - 1 2、ランテス、B 7 - 1、M I P - 2 及び M I P - 1 α から選択される。N K 細胞活性化因子及び／又は N K T 細胞活性化因子、F G F 7 又は F G F 1 0、インターロイキン及び／又はホルモン等の他の因子が I L - 7 と組み合わせ使用され、治療上の利点をさらに提供し得ることを理解すべきである。本発明の具体的組成物は、上述の過剰グリコシル化された I L - 7 組成物と幹細胞因子、特にその可溶性形態、I L - 1 5 及び／又は F l t - 3 リガンド及び／又は F G F 1 0 とを含む。本発明の別の具体的組成物は、上述の過剰グリコシル化された I L - 7 組成物と、 α 又は γ インターフェロン、I L - 2、I L - 1 2、ランテス及び M I P - 1 α から選択されるサイトカインとを含む。

【 0 1 2 8 】

本発明の別の具体的組成物は、上述の過剰グリコシル化された I L - 7 組成物、幹細胞因子及びサイトカインを含む。

【 0 1 2 9 】

上述のように、この医薬組成物は、組み合わせられた、分割された又は連続した使用のために、1 つ又は数個の抗原（又は抗原性分子）をさらに含み得る。この抗原は、あらゆる合成又は天然ペプチド、組換えタンパク質、死滅された、不活性化された又は弱毒化された病原体生成物、微生物、寄生虫、脂質等、それらの一部及びそれらの組み合わせであり得る。この抗原は、完全なタンパク質又はそのあらゆるエピトープ含有断片又は一部、特に M H C クラス I 又は M H C クラス II 分子を通じて免疫系へ提示されるペプチドであり得る。この抗原は、あらゆるウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、腫瘍抗原等であり得る。抗原の具体例には、H I V、水痘帯状疱疹ウイルス、インフルエンザウイルス、エプスタインバーウイルス、I 型又は II 型単純ヘルペスウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、デング熱ウイルス、A、B、C、D 又は E 型肝炎ウイルス、合胞体呼吸系ウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、結核菌、トキソプラズマ及びクラミジア由来の抗原が含まれる。

【 0 1 3 0 】

本発明の具体的な目的は、組み合わせられた、分割された又は連続した使用のための、上

10

20

30

40

50

述の過剰グリコシル化された I L - 7 組成物と抗原性分子とを含む組成物に関する。前記組成物は、組み合わせられた、分割された又は連続した使用のための、上に開示されている 1 つ又は数個の免疫刺激剤をさらに含み得る。

【 0 1 3 1 】

本発明の更なる具体的な目的は、上述の過剰グリコシル化された I L - 7 組成物を含む医薬組成物に関し、該医薬組成物は、対象における抗原特異的免疫反応を取得し及び / 又は刺激するために、1 つ又は数個の抗原性分子と同時に、その数日前に、又は連続して投与される。

【 0 1 3 2 】

本発明の更なる具体的な目的は、該抗原（又はそのエピトープ含有断片）及び上述の過剰グリコシル化された I L - 7 組成物を対象へ投与することを含む、対象に抗原特異的免疫反応を生じさせるか又は亢進させる方法に関する。この組成物は、対象において抗原特異的免疫反応を取得し及び / 又は刺激するために、該抗原と同時に、その数日前に、又はそれと連続して、及びより好ましくは該抗原の前に投与され得る。

【 0 1 3 3 】

別の好ましい実施形態において、本発明の組成物はアジュバントをさらに含む。アジュバントは、抗原の免疫原性を促進又は増加させ、及び T h 1 型免疫反応を誘導することができる、C p G、Q S 2 1、I S C O M 及びモノホスホリル脂質 A 等のあらゆる物質、混合物、溶液又は組成物から選択され得る。このようなアジュバントは、特に、抗原に対する特異的免疫反応を生じるか及び / 又は増幅するのに適している。アジュバントは、好ましくは、I L - 7 含有組成物とは別個に及び / 又は注入の別個の部位で、好ましくは望ましい抗原とともに調整及び投与される。

【 0 1 3 4 】

本発明は、B 又は T リンパ球の発達及び増殖の予防的又は治療的刺激のために、又は免疫反応の増強のために、ヒトの患者への非経口投与に関して適切な希釈剤、賦形剤又は担体と混合された、本発明の過剰グリコシル化されたヒト I L - 7 組成物の有効量を含む医薬組成物にも関する。本発明の医薬組成物は、延長されたリンパ球新生刺激及び / 又は増幅された免疫反応を誘導する。

【 0 1 3 5 】

本発明の医薬組成物は、B 又は T リンパ球の発達及び増殖の予防的又は治療的刺激のために、包括的及び / 又は特異的免疫再構成の増強のために、又は体液性及び / 又は細胞性免疫反応の増強のために、ヒトの患者においても使用され得る。

【 0 1 3 6 】

本発明の特定の医薬組成物は、免疫不全患者における日和見感染を予防又は低下させるために使用するためのものである。

【 0 1 3 7 】

本発明の別の特定の医薬組成物は、主要エピトープに対してのみならず、非主要又より免疫原性の低いエピトープ、ヒトの患者における特異的免疫反応のレパートリーを拡張することができる T 細胞受容体に対してより低い親和性を有するエピトープに対しても、リンパ球新生刺激を長期化し及び / 又は特異的免疫反応を生じさせるために使用するためのものである。

【 0 1 3 8 】

本発明は、免疫不全患者、癌患者、移植を経験している患者、ウィルス又は寄生虫に感染した患者、高齢者又は C D 4 数の低い全ての患者等の対象における予防的又は治療的免疫反応を生じるのに特に適している。

【 0 1 3 9 】

本発明の I L - 7 ポリペプチド及び組成物の具体的な使用及び好ましい使用には、
- 悪性細胞又は感染因子に対する特異的免疫反応の増強を誘導するのに有効な量のワクチン増強剤としての使用（抗原投与の前、途中又は実質的に同時の該組成物の投与）；及び

10

20

30

40

50

- 起源が、感染、照射、移植（BMT、SCT）又は薬物の何れであれ、患者の免疫再構成を誘導するための使用；が含まれる。

【0140】

本発明のIL-7ポリペプチド及び組成物は、単独で使用され、又は、SCF、Flt3-L、 α -IFN、 γ -IFN、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-15、IL-18及び/又はIL-21を含む（但し、これらに限定されない。）リンパ球新生因子等の他の活性成分と組み合わせて使用され得る。組み合わせ療法が使用される場合、様々な成分が、同時に、個別に又は順次に投与され得、一緒に又は個別に調整され得る。

10

【0141】

本発明のIL-7ポリペプチド及び組成物は、動物の保健の分野においてワクチン接種を強化するため及び活性物質投与の数を最小限に抑えるためなど、多様な領域において使用され得る。

【0142】

本発明は、さらに、感染した患者へ、過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチド構成物を投与することを含む、HIV感染、ウィルス肝炎、ウェストナイル熱、デング熱等のウィルス感染を治療するための方法を提供する。

【0143】

特定の実施形態において、過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドは、インターフェロン分子とともに投与されるべきである。前記インターフェロン分子は、例えば α IFN（白血球IFN）、ベータIFN（線維芽細胞IFN）、ガンマIFN（免疫IFN）、オメガIFN又はタウIFN（栄養膜因子）であり得る。

20

【0144】

本発明はさらに、免疫不全対象へ、過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチド構成物を投与することを含む、免疫不全対象において胸腺新生の回復を改善するための方法を提供する。

【0145】

好ましくは、過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドは、次いで、角化細胞増殖因子、幹細胞因子、ゴナドスチムリンアンタゴニスト又は成長ホルモンとともに投与されるべきである。

30

【0146】

過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドは、悪性細胞、ウィルス又は細菌に対する治療用免疫化を提供するための方法においても使用でき、この過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドは、抗原又は抗原の混合物、例えば上述のものとともに投与されるべきである。この状況において、過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドはさらに、GM-CSFとともに投与され得る。

【0147】

本発明の更なる目的は、T細胞を過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチド又は組成物と接触させ、これによりT細胞の増殖を亢進させることを含む、T細胞の増殖を生体外で増強させるための方法である。本方法は、養子免疫治療によって、癌又はウィルス感染を有する患者を治療するのに適したT細胞を調製するのに特に有用である。養子免疫治療は、特異的抗原（悪性抗原又はウィルス抗原）を標的とする特異的T細胞の選択的増殖のための生体外方法論である。この免疫治療技術には、一般に、患者の全血からのAg特異的Tリンパ球の単離、IL-7ポリペプチドを使用するこれらのT細胞の生体外増殖、場合によって行われる、他のサイトカインによるこれらのT細胞の生体外での活性化及び患者への投与が含まれる。他の技術が可能である。IL-7ポリペプチドは、細胞傷害性活性の亢進をさらに示すこれらのT細胞集団の生存を改善する。

40

【0148】

作製方法及びツール

50

本発明の別の態様は、上述の構成物、特に上述の過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチド、構成物及び製剤原料を、その医薬的使用に十分な量及び質で作製するための適切なコンストラクト及び方法を提供することである。

【0149】

特に、上述のように、本発明は、多様なコンピテント宿主細胞中で、及び遺伝子治療目的のために、本発明の組換えヒトIL-7ポリペプチドを作製するのに使用され得るベクター及び組換え宿主細胞を提供する。

【0150】

ベクターは、プラスミド、ウィルス、ファージ、コスミド、エピソーム等であり得る。好ましいベクターは、pBR、pcDNA、pUC、pET、pVITRO等の市販の骨格に基づいて作製することが可能なウィルスベクター（例えば、組換えアデノウィルス）及びプラスミドである。ベクターは、典型的には、IL-7ポリペプチドの発現を調節又は媒介するための調節エレメント又は配列を含む。調節配列は、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、組織特異的シグナル、ペプチドシグナル、イントロン、ターミネーター、ポリA配列、GC領域等及びこれらの組み合わせから選択され得る。このような調節エレメント又は配列は、哺乳動物、真菌、植物、細菌、酵母、バクテリオファージ又はウィルスの遺伝子に、又は人工源に由来し得る。（イー・コリ（*E. coli*）等の）原核生物発現のための有用なプロモーターには、例えば、T7 RNAポリメラーゼプロモーター（pT7）、TACプロモーター（pTAC）、Trpプロモーター、Lacプロモーター、Treプロモーター、PhoAプロモーターが含まれる。哺乳動物細胞における発現に適したプロモーターには、ウィルスプロモーター（例えば、CMV、LTR、RSV、SV40、TK、pCAG等）、家畜遺伝子プロモーター（例えば、E1f α 、ニワトリ β アクチン、ユビキチン、INSM1等）、ハイブリッドプロモーター（例えば、アクチン/グロビン等）等が含まれる。ベクターは、2つ以上のプロモーターを含み得る。前記プロモーターは、誘導可能であり得るか又は制御され得る。例えば、生成ファージから培養物を解離することによって、誘導可能又は制御されるプロモーターを使用して、生成の調節をより適切に行うことが可能となる。テトラサイクリン系、Geneswitch系、エクジソン系、エストラジオール系、RU486系、Cumate系、メタロチオネインプロモーター等の誘導可能な又は制御されるプロモーターは、文献中に見出され得る。他の系は、電流又は、局所化された超音波系、AIR誘発性発現系等のマイクロ波等に基づいている。これらの系は、本発明に記載のIL-7ポリペプチドの発現を調節するのに使用できる。

【0151】

IL-7は、抗アポトーシス因子（例えば、iex、Bcl2、BclXL等）又はサイクリン（例えば、p21、p27等）と同時に発現され得る。該IL-7及び該抗アポトーシス因子をコードするcDNAは何れも、同一プロモーターの下流に配置され得るが、IRES配列によって分離され得、又はそれらの各々がそれ自体のプロモーターの下流にあり得る。

【0152】

ベクターはさらに、慣用の配列から選択され得る複製開始点及び/又はマーカー遺伝子を含み得る。DHFR遺伝子等の増幅選択マーカーは、前記ベクターの骨格中に挿入することが可能である。

【0153】

前記ベクターは、異なる様式で組織化され得るこれらの異なる要素の多様な組み合わせをさらに含み得る。

【0154】

本発明は、上述の核酸又はベクターを含む組換え宿主細胞も提供する。宿主細胞は、あらゆる真核及び原核細胞から、典型的には哺乳動物細胞（特にヒト、げっ歯類、イヌの細胞）、細菌細胞（特にイー・コリ、バチルス・ブレビス（*Bacillus Brevis*）、バチルス・サブチリス（*Bacillus Subtilis*））、酵母細胞、植

10

20

30

40

50

物細胞及び昆虫細胞から選択され得る。これらの宿主細胞は、無血清培地に対して適合し得る。生成は、トランスジェニック動物又は植物中에서도達成され得る。

【 0 1 5 5 】

好ましい組換え宿主細胞は、哺乳動物細胞、特にヒト細胞及びそれらの誘導体又は変異体から選択される。

【 0 1 5 6 】

適切な宿主細胞の具体例には、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、ヒト胚性腎臓（ＨＥＫ－２９３）細胞、ヒト表皮角化細胞（ＨＥＫ）、ヒト間質又は上皮細胞、ＰＥＲＣ６等が含まれる。このような哺乳動物細胞において、ＩＬ－７は、機能的シグナルペプチド配列を使用する分泌型タンパク質として生成され得る。

10

【 0 1 5 7 】

本発明の具体的な目的は、配列番号２、４又は６などの核酸分子を含む真核宿主細胞である。

【 0 1 5 8 】

本発明の更なる目的は、上述のＩＬ－７組成物又はポリペプチドと免疫反応性のある抗体に関する。このような抗体は、動物の免疫化及び、血清を回収すること（ポリクローナル）又は脾臓細胞からハイブリドーマを調製すること（モノクローナル）など、慣用の方法に従って生成され得る。抗体（例えば、ＳｃＦｖ又はダイアボディ又はミニボディ）の断片（例えば、Ｆａｂ'）又は遺伝子操作された誘導体は、公知の生物学的及び化学的方法によって生成され得る。好ましい抗体は、上述の過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドと特異的に免疫反応性を示す。すなわち、好ましい抗体は、グリコシル化されていないポリペプチド又はモノグリコシル化されたポリペプチドを実質的に結合せずに、過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドを結合できる。このような他の抗原への非特異的結合又はより低い有効性の結合が観察され得るが、このような非特異的結合は、本発明の特定の過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドに対する特異的結合と区別することが可能である。

20

【 0 1 5 9 】

抗体は、好ましくは、サル、ネズミ又はヒト由来であり又はヒト化されている。

【 0 1 6 0 】

本発明は、上述のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系にも関する。

30

【 0 1 6 1 】

このような抗体は、多様なリンホカインを包含するアッセイ又は実験において過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドを検出し、又はＩＬ－７生物活性を中和する上で有用である。このようなモノクローナル抗体を含む、診断、アッセイ又は治療に適した組成物も本発明の目的である。

【 0 1 6 2 】

本発明の別の目的は、医薬等級の、上記実質的に純粋な過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドを作製するための、産業規模で使用方法が可能な方法に関する。前記方法は、治療用途に適した組換えＩＬ－７配座異性体を多量に産生する。本発明は、上述の過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドの量の存在を測定するための、ＩＬ－７含有組成物を調節する新規方法も提供する。

40

【 0 1 6 3 】

特定の態様において、上記過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチド又は構成物を産生する方法は、

a) 上記組換え宿主細胞を培養すること、及び

b) 該細胞から産生されるＩＬ－７ポリペプチドを回収すること

を含む。

【 0 1 6 4 】

ＩＬ－７の純度を増大させるために、試料は多様な処理又は条件へ供され、細胞片又は

50

ウィルス粒子等を除去する。このような処理の典型的な例には、遠心分離、清澄及び／又は透析ろ過、限外ろ過、ナノろ過が含まれる。従って、試料は、ＩＬ－７ポリペプチドに関して濃縮され得る。

【０１６５】

前記方法の収量又は効率性を増大させるために、試料が、正確に折りたたまれ及びグリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドを含有するか又は正確に折りたたまれ及びグリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドが濃縮されていることが非常に望ましい。

【０１６６】

過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドは、過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドを生成するために、本組み合わせにおいてこれまで使用されていなかった異なるそれ自体公知の技術によって精製され得る。これらの技術は、より好ましくは、単独で又は多様な組み合わせでのいずれかで、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーから選択される。このような方法によって、回収を低下させる宿主細胞ＤＮＡ及び他の不純物が除去できる。好ましい実施形態において、工程ｉｉ）は、疎水性相互作用クロマトグラフィー工程を含む。このようなクロマトグラフィーは、多様な支持体及びフォーマットを使用して、好ましくはＨＩＣブチルを使用して実施され得る。工程ｉｉ）は、全ての支持体上で、好ましくはパッチ又は適切なゲルを使用するカラムにおいて実施され得る。

【０１６７】

好ましい実施形態において、精製工程は、特異的なゲル（例えばＳｅｐｈａｄｅｘ）が装填されたカラムを通じて試料を負荷することを含む。

【０１６８】

別の好ましい実施形態において、精製工程は、目的の回収されたタンパク質を濃縮し、存在する可能性のある残余タンパク質夾雑物質を排除するために、特異的ゲル（Ｓｏｕｒｃｅ １５Ｓ）を装填したカラムを通じて試料を負荷することを包含する研磨工程を含む。

【０１６９】

別の特定の実施形態において、精製工程は、樹脂（例えば、硫酸デキストラン又はヘパリン）上に固定されたモノクローナル抗ＩＬ－７抗体を含む特異的ゲルで装填されたカラムを通じて試料を負荷することを含む。

【０１７０】

これらの方法によって、上述の実質的に純粋な過剰グリコシル化されたＩＬ－７ポリペプチドの再現性のある、効率的な作製が可能となる。組換えＩＬ－７が、ＩＬ－７の総量に関して、少なくとも９５重量％、好ましくは少なくとも９８重量％、さらにより好ましくは少なくとも９９重量％又はさらには９９．５重量％の純度で得られることができるので、前記方法は特に有利である。

【０１７１】

上記方法の各工程は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を含む分析方法によって調節され得る。最適化されたＩＬ－７の一次構造は、遺伝子及び／又はアミノ酸配列を測定することによって、トリプシン消化後のペプチドマッピング分析によって、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、サイズ排除ＨＰＬＣ、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ若しくはエレクトロスプレー等の質量分析等で分子量を測定することによって、例えば逆相ＨＰＬＣで疎水性を測定することによって、及び／又は例えば陽イオン交換クロマトグラフィー－ＨＰＬＣ若しくは等電点電気泳動分析で電荷を測定することによって調節及び性質決定され得る。

【０１７２】

本発明の更なる実施形態は、細胞培養及びＩＬ－７発現の相を分離できるように、組換え宿主細胞によるＩＬ－７発現が誘導性であり、制御された又は一過性である、上述のＩＬ－７作製方法に関する。より具体的には、特定の実施形態において、ＩＬ－７発現は、ＩＬ－７によって媒介される可能性がある毒性効果を一切有さずに、組換え宿主細胞を多量に産生できるようにするために、組換え細胞増殖、増大及び／又は培養の間、抑制又は

10

20

30

40

50

最小化することが可能である。次いで、細胞培養物内（又はその試料上）でIL-7発現を誘導することができ、組換えIL-7の効率的な合成及び放出が可能となる。

【0173】

従って、本発明の目的は、組換えIL-7ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、上に開示されている組換え宿主細胞を培養すること、及び産生された組換えIL-7ポリペプチドを回収することを含む、組換えIL-7ポリペプチドを作製する方法にも存し、ここで、前記核酸分子は、組み換え細胞増殖の間に、前記IL-7ポリペプチドの制御された発現が抑制され又は最小化され、及び生産期の間に誘導可能となるように、前記核酸分子は、前記IL-7ポリペプチドの制御された発現又は誘導性の発現を与える。この核酸は、典型的に、培地中に含有又は添加された特異的な因子の存在下又は不存在下で抑制され又は活性化され得る誘導性プロモーターを含む。この方法は、上に開示されているIL-7の過剰グリコシル化された配座異性体を産生するのに特に適している。

10

【0174】

哺乳動物宿主細胞中で機能的であり、本発明において使用することができる多様な制御された発現系又は誘導可能な発現系が、本分野において開示された。これらには、テトラサイクリンTetOn/Off系、誘導可能な薬物としてのミフェプリストン及びGAL4-E1bプロモーターを有するGeneswitch系(Invitrogen)、エクジソン系(昆虫ステロイドホルモンの類縁体であるボナステロンA又はムリステロンAによる誘導)(Invitrogen)、メタロチオネインプロモーター(亜鉛によって誘導可能)、エストラジオール系、RU486系、焦点化された超音波系、AIR(アセトアルデヒドにより誘導可能な制御)誘発性発現系、クマート(Cumate)系(Q-mate; Qbiogen)、Cre-Lox系等が含まれる。これらの制御された発現系又は誘導可能な発現系は、例えば、HEK293、HEK293 EBNA、HEK、T-REX(商標)、T-REX(商標)-HeLa、T-REX(商標)-CHO又はT-REX(商標)-ジャーカット細胞系等の多様な細胞において使用され得、誘導後に組換えIL-7を発現するように設計された組換えベクターにより形質転換され得る。

20

【0175】

あるいは、一過性形質移入は、IL-7産生から細胞増殖を分離するのに使用できる。これに関して、細胞の増殖の際に、IL-7コード配列を前記細胞へ導入するために効率的な遺伝子送達ベクターが使用される。より好ましくは、一過性導入のためのベクター系は、組換えアデノウイルス又はエピソームベクター[例えば、pCEPH(Invitrogen)、pTT(IRB:Durocher Y. et al. Nucl. Acids. Res., 2002, 30(2))又はMAR配列を使用する]等のウィルスベクターである。アデノウイルス(及び例えばAAV等の他のウィルスベクター)は、本分野で公知の技術に従って生成できる。典型的には、E1欠損アデノウイルスは、HEK293、PERC6等のE1欠損細胞系において生成される。このような一過性形質移入処理は、例えば(実施例A4に開示されるような)A549、HeLa、VERO、BHK-又はCHO-形質転換細胞等の培養物中の多様な哺乳動物細胞において実施できる。本発明において使用するのに適した別の一過性発現方法は、例えば次の文献: HEK293 EBNA又はHEK293細胞におけるDurocher Y. et al. Nucl. Acids. Res., 2002, 30(2)に開示されている。

30

40

【0176】

好ましい実施形態において、本発明の作製方法は、得られた生成物中に含有される、上に開示されている特定の過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドを性質決定し、及び測定し、又は定量化する更なる工程c)を含む。望ましい過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドの物理的及び生物学的な性質決定は、質量分析(MALDI-TOF又はエレクトロスプレー)、赤外線分光法、核磁気共鳴(NMR)によって、円二色性を測定することによって、特異的バイオアッセイにおけるIL-7の生物学的活性の評価によって、過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドに対して誘導された特異的モノクローナル抗体に対する親和性又はヘパリン親和性HPLCを測定することによって得られ得

50

る。一度性質決定されると、配座異性体の定量化は、E L I S A、バイオアッセイ、I L - 7 受容体に対する過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの親和性によって実施され得、単離された配座異性体へ適用される場合には、タンパク質の定量化のあらゆる方法によって実施され得る。

【 0 1 7 7 】

この点において、本発明は、試料中、特に医薬調製物中の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチド及び／又は関連不純物の量を同定及び／又は測定する方法も提供し、該方法にも関する。このような性質決定の方法は、バッチの品質管理において、治療的用途を満たすために、まず、タンパク質の性質及び品質を決定するために使用することが可能である。本発明は、発明の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの存在及び／又は相対的な量を測定するために、I L - 7 含有調製物を性質決定及び管理する方法を初めて提案する。好ましい方法は、ピシンコニン酸 (B C A) タンパク質アッセイ、S D S - P A G E、ウェスタンブロット、サイズ排除 H P L C、逆相 H P L C、イオン交換 H P L C、疎水性相互作用 H P L C、アミノ酸アッセイ (A A A)、等電点電気泳動 (I E F)、E L I S A、紫外線吸収及び／又はバイオアッセイを使用する。これらの方法は、単独で又は多様な組み合わせで実施され得る。

【 0 1 7 8 】

本発明は、I L - 7 製剤原料又は医薬組成物を作製する方法であり、(i) I L - 7 ポリペプチドをコードする組換え宿主細胞を培養すること、(i i) 該組換えポリペプチドを単離して、I L - 7 製剤原料を得ること、及び(i i i) 該 I L - 7 製剤原料を調整して治療用途又はワクチン用途に適した医薬組成物を得ることを含む前記方法も提供し、該方法は、さらに、該製剤原料又は医薬組成物中に、上記過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの質及び／又は量を同定、性質決定又は測定する工程を含み、より好ましくは、活性成分として、該過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの約 9 0 % 超、好ましくは 9 5 %、より好ましくは 9 8 % を含む製剤原料又は医薬組成物を選択する工程を含む。

【 0 1 7 9 】

性質決定の工程は、多様な技術によって、より好ましくはトリプシン消化を伴う又は伴わない質量分析関連方法、レクチンアフィニティクロマトグラフィー、アミノ酸アッセイ (A A A)、エンド - 及びエキソ - N - 及び O - グリカナーゼ消化 (P N G a s e A / F、O - グリコシダーゼ、ニューラミニダーゼ)、フルオロフォア支援炭水化物電気泳動、M A L D I T O F 又はエレクトロスプレー質量分析、ジスルフィド架橋に対する特異的モノクローナル抗体分析及び／又は高次構造の特徴付けによって実施され得る。分子のバリエーション及び生成物関連不純物の同定は、好ましくは、二次元電気泳動、等電点電気泳動及び脱アミドした形態に対するイオン交換クロマトグラフィー、末端切断された形態のための酵素的消化を伴うか又は伴わない逆相 H P L C から選択される 1 つ又は数個の方法を使用することによって実施される。

【 0 1 8 0 】

この工程は、臨床的又は医薬組成物の品質管理に特に適しており、これにより上述の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの約 9 5 % 超、好ましくは 9 6 %、9 8 % 又は 9 9 . 5 % 超を含む組成物のみが保持される。これらの過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドは全て、6 . 5 未満の平均等電点を示す。

【 0 1 8 1 】

本発明の別の目的は、免疫不全と関連した疾病を予防又は治療するための、特に延長されたリンパ球新生の刺激を誘導するための、免疫反応、特に抗原特異的免疫反応を惹起及び／又は増幅させるための医薬組成物の製造のための、上記方法を用いて得られた過剰グリコシル化された組換え I L - 7 ポリペプチドの使用に関する。

【 0 1 8 2 】

本発明の更なる目的は、獣医学的な用途のために、哺乳動物中で実験的及び医薬的な使用をするためのツールとしての過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの使用に関

10

20

30

40

50

する。

【 0 1 8 3 】

本発明の他の態様及び利点は、以下の実施例に記載され、前記実施例は、例示であることみなすべきであり、本願の範囲を限定するものとみなすべきではない。

【実施例】

【 0 1 8 4 】

(実施例 A)

哺乳動物細胞中での、最適化されたヒト (h) 及びサル (s) I L - 7 コードヌクレオチド配列の構築及び発現

A 1 . 最適化されたヒト I L - 7 コードヌクレオチド配列の構築

10

1 . 1 . ペプチドシグナルの最適化 :

天然 I L - 7 ペプチドシグナルに対して 5 ' 末端で連結された I L - 7 c D N A 断片の発現が非常に低いため、本発明者らは、数個のシグナルペプチド配列を検査した。新たなヒト I L - 7 コード c D N A 配列を、重合した合成オリゴヌクレオチドから化学的に取得した。

【 0 1 8 5 】

数個のシグナルペプチド配列を検査した : 高度に分泌されるタンパク質のシグナルペプチド (S P) (Barash et al . ; 2 0 0 2 ; Biochemical and Biophysical Research Communications 2 9 4 : 8 3 5 - 8 4 2) :

20

【 0 1 8 6 】

【化 2】

IL-7 SP

MFHVSFRYIF GLPPLILVLL PVASS (配列番号13)

EPO SP

MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLG (配列番号14)

SEAP SP

MLLLLLLLGL RLQLSLG (配列番号15)

30

IgGkappa SP

METDTLLLWV LLLWVPGSTG (配列番号16)

ラクトランスフェリン/ヒトネクチン SP

MKLVFLVLLF LGALGVALA (配列番号17)

シスタチン² SP

MARPLCTLLL LMATLAVALA (配列番号18)

EPO/IL-7 新規の複合型 SP

40

MGVHECPAWL WLLLSLLSLV LLPVAS (配列番号19)

【 0 1 8 7 】

HEK 2 9 3 細胞、CHO 細胞等の哺乳動物細胞中での一過性発現のため、得られた c D N A 配列を p T T 5 ベクター (Durocher et al . ; 2 0 0 2 ; Nucl . Ac . Res . ; 3 0) 中に挿入した。シグナルペプチドが良好な切断をチェックするため、得られた各タンパク質について N 末端アミノ酸を決定した。h I L - 7 の完全性が維持された。シスタチン、I g G、E P O 及びハイブリッド E P / 7 が、最良のシグナルペプチド配列であることが明らかとなった。実際、h I L - 7 発現は、少なくとも 1 0 桁増強される。

50

【0188】

1. 2. ヒトIL-7コードヌクレオチド配列の最適化：

EP/7hIL-7アミノ酸配列を維持しながら、

- (Graphical Codon Usage Analyserソフトウェアを使用する) ヒトのレアコドンの除去

- シグナルペプチド配列 (Kim et al.; 1997; Gene; 199) を除く配列の「GC」含有量を亢進させること、及び「CA」ジヌクレオチドの連続を最小化すること

によってmRNA安定性を亢進させることによって核酸配列を最適化した。

【0189】

配列を配列番号2に示す。

10

【0190】

A2. 最適化されたサルIL-7コードヌクレオチド配列の構築

ヒトIL-7コード配列に関して記載のとおり、EP/7-sIL-7最適化配列を合成した (配列番号3)。

【0191】

A3. イヌIL-7コードヌクレオチド配列の構築

イヌ腎臓cDNAライブラリ (Biochain) からのPCRによって、イヌIL-7cDNAを増幅し、ヒトIL-7コード配列に対して上述したとおり、クローニング及び配列決定を行い、IL-7SP又はEP/7SP-cIL-7配列を合成した (配列番号6)。

20

【0192】

A4. 哺乳動物発現 (BHK細胞発現又はCHO細胞発現又はHEK-293細胞発現)：

ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) (Mullis et al.; 1987; Methods in Enzymology; 155: 335-350) により、IL-7コードcDNA配列を増幅し、発現ベクターへのクローニングのための制限部位 (NotI/SwaI) を作製した。

【0193】

発現系ph-pgk-EP7-hIL-7 (図1) 又はpBh-pgk-EP7-hIL-7 (図2) を設計して、天然ヒトIL-7遺伝子配列の翻訳から推定されるIL-7タンパク質を発現させた。ベクター上に保持された抗生物質 (イー・コリにおいてクローニングするためのアンピシリン及び哺乳動物細胞において発現させるためのハイグロマイシン) 耐性マーカー遺伝子に基づいて、組換えベクター含有細胞に対する選別を実施した。

30

【0194】

本発現ベクターは、アンピシリン耐性を系に付与するpIC20Hプラスミド (ATCC) から始まるCYTHERISで完全に構築されている。該発現ベクターは、以下の2つの哺乳動物生成単位を含有する。

【0195】

1 / pgkプロモーターの調節下において、IL-7コード配列、及びpgkプロモーターを通じた転写を回避する合成ポリA配列を発現するためのもの。

40

【0196】

2 / 「sv40エンハンサー-tkプロモーター」の調節下において、ハイグロマイシン耐性を発現するためのもの。

【0197】

以下の配列をこの予備的ベクター中に挿入した。

【0198】

- 「hph-ef1a-pA」: pVitro2.mcs由来のHindIII/SbfI断片 (Invitrogen)；

50

- tkプロモーター：pMEP4由来のEcoRI/HindIII PCR断片 (Invitrogen)；

- sv40エンハンサー：pVitro2.mcs由来のBssHII/EcoRI PCR断片 (Invitrogen)；

- MARウサギβグロビン：染色質の高度に転写された領域pSG5 (Stratagene)由来のEcoRV/AgeIウサギβグロビントロン2 PCR断片中へのより優れた組み込みのための「マトリクス付着領域」候補；

- SpA：pCAT3コントロール (Promega)由来のStuI/BspEI断片

- P g kプロモーター：pQBI.p g k (Q-biogen)由来のKpnI/BssHII PCR断片； 10

- 5'UTRint1：pCAT3-コントロール (Promega)由来のHindIIIキメライントロン断片；

- NotI/SwaI又はNotI/PmlI IL-7コードcDNA及び変異体；

- hghpA：M. Goodman (DeNoto et al. ; 1981; Nucleic Acid. Res. ; 9(51): 3719-3730)により記載されたヒト成長ホルモンcDNA配列由来のNruI/SwaI合成。

【0199】

p g kプロモーター以外のIL-7プロモーター、すなわちEf1α、snRNA U1、アクチン、ユビキチン、CMVプロモーター等、又はネオマイシン等の他の選択マーカーとともに、ベクターの幾つかの変異体を調製した。 20

【0200】

配列番号2を含む哺乳動物 (HEK-293、CHO又はBHK) 発現ベクターは、p h - p g k . EP7 - h I L - 7又はp B h - p g k . EP7 - h I L - 7と呼ばれる。形質移入されたHEK-293又はCHO細胞中でのヒトIL-7の安定した発現は、発現ベクターp h - p g k . EP7 - h I L - 7又はp B h - p g k . EP7 - h I L - 7を使用して達成した。NdeIによる直鎖化の後、当業者に公知の方法を使用して、哺乳動物宿主細胞中に発現ベクターp h - p g k . EP7 - h I L - 7又はp B h - p g k . EP7 - h I L - 7を形質移入した。安定した形質転換体を確立するために使用される選択可能なマーカーは、ハイグロマイシン (Invitrogen) であった。 30

【0201】

A5. 誘導性の哺乳動物発現 (メタロチオネインプロモーター「MT1」)：

p g kプロモーターはまた、同一発現ベクター中にて、PubMed (X53530番) (Carter et al. ; 1984; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 81: 7392-7396)において参照される、化学的に合成されたBspEI/BssHII「マウスMT1」配列によって、置換されている。

【0202】

MT1は、金属依存性転写因子プロモーターである。次いで、安定したクローンの発現は亜鉛依存性である。

【0203】

A6. IL-7及びBcl2又はBclXLの哺乳動物での同時発現 (BHK細胞発現又はCHO細胞発現又はHEK-293細胞発現)：

哺乳動物宿主細胞培養における細胞生存率を亢進させるために、従って、IL-7産生の量を最適化するために、Bcl2の抗アポトーシス作用をバイオリクター生成において検査できるように、tkプロモーターとhph cDNAとの間にBcl2 cDNA配列を挿入することによって変異体発現プラスミドを調製した (Zhong et al. ; 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 90: 4533-4537; Lee et al. ; 2000; Journal of cell Science; 114(4): 677-684) (図2参照)。

【0204】

(実施例 B)

哺乳動物細胞中での I L - 7 コードヌクレオチド配列の過剰グリコシル化された類縁体の構築及び発現

B 1 . 過剰グリコシル化された I L - 7 類縁体の c D N A 配列の構築

変異誘発法を含む数個の技術を使用して、過剰グリコシル化された I L - 7 類縁体を得た。重合した合成オリゴヌクレオチドから、過剰グリコシル化された I L - 7 類縁体（あるいは、H G 3 7 - 4 0 - 1 0 4 - 1 2 6 及び - 1 4 7 ）を化学的に構築した。1 つ又はそれ以上の更なるグリコシル化部位を有する I L - 7 類縁体を与えるように、1 つ又はそれ以上の望ましい変異を導入することによって、数個の類縁体を得た。従って、N o t I 及び P m l I 制限酵素による消化の後、発現ベクター内への直接的クローニングための N o t I / P m l I 制限部位の間に、1 つ又は複数の望ましい更なるグリコシル化部位を含有する得られた全長 c D N A 配列を挿入した（図 1 又は 2 と同様であるが、適切な I L - 7 配列を含有している。）。

【 0 2 0 5 】

B 2 . 過剰グリコシル化された I L - 7 類縁体の c D N A 配列の発現

A 4 章から A 6 章に上述されているとおり、過剰グリコシル化された I L - 7 類縁体の発現を実施した。

【 0 2 0 6 】

(実施例 C)

バイオリアクター培養条件における組換え h I L - 7 の産生

高細胞密度培養物中での生産性及び増殖について最適化されたクローンを得るために、数個の培地及び成分スクリーニングによって、実施例 A 4 のような最も安定な陽性クローンを無血清懸濁培養用に適応させた。1 0 0 から 2 0 0 0 L のバイオリアクターへの播種の前に、「波動動作バッグ (w a v e b a g) 」系中で前培養を実施する。1 0 から 1 5 日間、灌流系又は流加系で 1 0 0 から 2 0 0 0 L のバイオリアクター中で細胞培養を実施する。植物ペプトンを補充した低グルタミン含有培地中で、1 千万個細胞 / m L の濃度まで細胞を増殖させた。最初の増殖段階において、培養温度を 3 7 °C に制御し、細胞密度を増大させる。数日後、約 2 8 / 3 2 °C まで温度を低下させ、細胞増殖を阻害し、より良好な発現レベルとした。さらに、温度を低下させて、分泌経路の速度を低下させ、増加した部位占有率を有する発現された I L - 7 のグリコシル化をより良好なものとした。培養終了の数日前、培地中の 0 . 5 から 1 0 m M 酪酸ナトリウムの添加により、I L - 7 発現を強化した。上述の条件下で、I L - 7 発現を細胞の内側と培地中の両方でモニターした（図 3）。高分子量 I L 7 グリコフォームを得るために、良好な酸素負荷並びに、培養時の培地中での 3 g / L のグルコース及び 3 m M のグルタミンを維持する。アミノ酸消費量もモニターし、アミノ酸の枯渇した培養物を提供する。細胞生存率が 9 0 % 未満に低下したら直ちに、細胞培養物を回収する。

【 0 2 0 7 】

(実施例 D)

H E K - 2 9 3 及び C H O 細胞中で発現された組換えヒト I L - 7 生成物の精製

粗細胞培地を回収し、遠心分離して全細胞及び細胞片をペレットにした。あるいは、これは、M u s t a n g X T カプセル (P a l l)、S a r t o c l e a r P (S a r t o r i u s)、M i l l i s t a k + O p t i c a p (M i l l i p o r e) 又は中空ファイバーカートリッジ (A X H クロスフロー 1 0 (G E)) 又は均等物等の清澄カプセル又はモジュール上での深層ろ過によって達成できる。メンブレンが 1 0 k D a をカットオフする C e n t r a s e t t e C a s s e t t e 装置 (P a l l L i f e S c i e n c e s) を使用して、遠心分離した培地を約 1 0 倍に濃縮し、上清の容積を低下させた。同様の空隙率を有するその他のろ過 / 濃縮系も使用できた。

【 0 2 0 8 】

濃縮した上清を遠心分離し、p H 7 . 5 に調整し、5 0 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 5 で平衡化した Q S e p h a r o s e F a s t F l o w (G e n e r a l E l e

10

20

30

40

50

ctric Healthcare) カラムへ適用した。次に、タンパク質を流水中に回収した。この陰性クロマトグラフィー工程の間、様々な夾雑物質、特にDNAが除去された。この工程に対する代替工程は、より良好な収量及び／又はわずかに迅速な処理のために、同様な条件にある確証されたMustang Qメンブレンカセット(Pall)を使用することであった。この工程に対する別の代替工程は、強力な陰イオン交換樹脂(Q Ceramic Hyper D (Biosepra)、Capto Q (GE))又はメンブレン(Sartobind Q、Sartorius)上でタンパク質を捕捉することである。

【0209】

この前精製工程の後、強力な陽イオン交換樹脂上で捕捉工程を実施した。前工程の終了時に回収される流出画分を、負荷緩衝液(50 mMリン酸ナトリウムpH 7.5)で平衡化されたFractogel EMD SO3⁻ (Merck) カラムへ負荷し、50 mMリン酸ナトリウムpH 7.5で洗浄した。50 mMリン酸ナトリウムpH 7.5中の線形NaCl勾配(15カラム容積)を使用して、溶出を実施した。

【0210】

活性画分をプールし、室温においてpH 3.5で30分間不活性化してウィルスを除いた。この工程に対する代替的な工程は、処理の終了時に多層ナノろ過によってこのウィルス不活性化工程を置換することである。

【0211】

ウィルス不活性化の後、プールしたタンパク質画分を緩衝液(200 mMリン酸ナトリウムpH 7、3 M硫酸アンモニウム)中で2倍希釈し、pHを7に調整した。次に、負荷緩衝液(50 mM燐酸ナトリウムpH 7 + 1.5 M硫酸アンモニウム)で平衡化しておいた疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)ブチルトヨパール650-M(Tosoh)カラムへタンパク質溶液を負荷した。負荷緩衝液による洗浄後、50 mMリン酸ナトリウムpH 7中の1.5 Mから0 Mまでにわたる硫酸アンモニウムの塩勾配の25カラム容積で、IL-7を溶出した。

【0212】

ヘキシルToyopearl 650-M(Tosoh)、ブチル/オクチルSephacrose(商標)4 Fast Flow(General Electric Healthcare)等の別のHIC樹脂が、この工程のために利用できる。規模を拡大する目的でのHICに対する別の代替例は、同様の結果のためにMEP HyperCel(Pall Biosepra)等の別のマトリクスを使用することであった。

【0213】

上述の捕捉工程と疎水性相互作用クロマトグラフィーを組み合わせることによって、異なるグリコシル化されたIL-7イソフォーム(図4に示されるB1からB10まで)の固有の物理化学的特性に従って、前記イソフォームを最適に分離することが可能であった。溶出画分(B1からB4までの画分)の適切な選択によって、3N結合されたhIL-7又は10グリコシル化されていないhIL-7が濃縮された。このようなグリコフォーム分離の例を図4に示す。

【0214】

高度にグリコシル化されたIL-7画分をプールし、低塩緩衝液(20 mM酢酸ナトリウムpH 6)で平衡化されたG25 Sephadex(General Electric Healthcare)カラムへ負荷した。この工程に対する代替工程は、5又は10 kDa分子量をカットオフするTFFメンブレン(Qvick start membranes, (GE), Centrimate TFF(Pall))を使用して、高塩タンパク質プールを透析ろ過することである。

【0215】

負荷緩衝液(20 mM酢酸ナトリウムpH 6)で平衡化されたSource 15S(General Electric Healthcare)カラムへ、G25工程から得られたタンパク質画分を負荷した。この研磨工程によってタンパク質を濃縮し、残余夾

10

20

30

40

50

雑物質を除去した。

【0216】

このカラムを酢酸ナトリウム負荷緩衝液で洗浄し、20 mM 酢酸ナトリウム pH 6 中の 0 から 1 M の範囲の NaCl の塩勾配の 15 カラム容積によって、IL-7 タンパク質を溶出した。溶出した画分を SDS-PAGE により分離し、クーマシーブルー又は硝酸銀のいずれかで染色した。IL-7 を含有する画分のみをプールし、最終的な精製された IL-7 タンパク質バッチを放出した。ウィルス不活性化が事前に実施されていなかった場合、精製工程には、最適なウィルス排除を保証する 2 つのろ過の更なる組み合わせも含まれ得る。ウィルス除去は、前ろ過デバイス (Planova 75、Asahi Kasei Medical) 後にナノ孔セルロースメンブレン (Planova 20N、Asahi Kasei Medical) を使用するろ過によって、又は他のウィルス除去メンブレン (Virosart、Sartorius; DV20、Millipore) によって達成できる。

10

【0217】

精製されたイー・コリの、グリコシル化された及び過剰グリコシル化された hIL-7 の SDS-PAGE を図 5 に示す。

【0218】

ゲル中のシフトは、タンパク質のグリコシル化のレベルを示す。実際、本発明で検査した過剰グリコシル化された形態 (HG-37-147 及び HG-40-104) は、十分にグリコシル化された hIL-7 よりも高分子量を有する。

20

【0219】

(実施例 E)

糖タンパク質炭水化物の分析

組換えヒト IL-7 の作製は、以下の理由のため、CHO 細胞ベースの発現系において実施したが、以下の理由に限定されるものではない。CHO 細胞は、組換えヒト治療用糖タンパク質の産生に使用される最も有効性が確認され、かつ最も一般的な現在の宿主である。さらに、シアリル- α -1-6 トランスフェラーゼを発現する遺伝的に改変された CHO 細胞株などの CHO 細胞が、ヒト細胞において観察されるのと同様に、定性的な様式で組換えタンパク質をグリコシル化できることが、多数の詳しい研究によって報告されている。この特定の特徴は、ヒト患者に注入する場合に、組換え糖タンパク質が有し得る免疫原性を低下させるために特に重要であった。

30

【0220】

イー・コリ由来の組換えヒト IL-7 との比較でグリコシル化状態を確認するために、精製された組換えヒト IL-7 生成物又は形質移入された CHO 細胞から得られた特定のグリコフォーム (3N 又は 3N+2N、1O-グリカン部分を伴うか又は伴わない。) が濃縮された画分を、ウェスタンブロットによって分析した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を使用して、CHO によって産生され、及び精製された IL-7 の異なるグリコフォームを識別して性質決定した。見かけの分子量の糖タンパク質実体は、20 kDa と 35 kDa の範囲にわたっており、主要なバンドは約 27 kDa に存在し (SDS-PAGE で観察、図 5 及び図 6 参照)、1 つの O-グリカン部分を含むか又は含まない 3 つの N-グリコシル化された形態に対応する可能性が最も高かった。この態様は、精製された産物の酵素による脱グリコシル化によって特に対処された (図 7)。

40

【0221】

質量分析を使用して、CHO によって産生され、及び精製された IL-7 のこれらのグリコフォーム (1O-グリカン部分を伴う又は伴わない 3N 又は 3N+2N) を識別的に性質決定し、1O-グリカン部分を伴う又は伴わない 3N-グリコフォームについては 25 kDa を超える分子量が得られ、1O-グリカン部分を伴う又は伴わない 2N-グリコフォームについては 23 kDa を超える分子量が得られた (図 8 参照)。さらに、上述のグリコシル化された形態は、5.8 の平均等電点を示し、高いシアル化特性を反映している (図 9 参照)。

50

【0222】

比較として、グリコシル化していないイー・コリ由来のhIL-7による同様の分析によって、約18kDaの見かけの分子量を有するタンパク質が得られ、哺乳動物細胞由来の過剰グリコシル化されたhIL-7は、27kDaと37kDaとの間の見掛けの分子量を示した。

【0223】

精製されたCHO由来のhIL-7の一般的なグリコシル化の複雑性及びN-グリカンの全体的な不均一性は、生成されたオリゴ糖の全体的な酵素的脱グリコシル化後のクロマトグラフィー分離及び質量分析によって評価した。精製されたグリコシル化されたhIL-7試料を、ペプチド-N-グリコシダーゼF (PNGase F, Roche) 等のエンドグリコシダーゼによって酵素的に消化した。放出されたN結合型オリゴ糖をペプチド構造から分離し、グラファイトCarbograph 200から300µLカラム (Alltech) 後にMALDI-TOF質量分析 (Voyager Spec, Applied Biosystems) を使用して選別した。MSスペクトルの各ピークに対応するm/z値によって、全hIL-7分子のN-グリカンの一般的な構造を同定することができた。グリカンを含むシアル酸の特異的な検出のために、(Powell AK & Harvey DJ, Rap. Com. Mass Spec. 1996において報告されるような) PNGaseにより生成されたオリゴ糖のカルボキシメチル化の後、質量分析を実施した。

10

【0224】

精製されたCHO由来のhIL-7から生じるスペクトルの分析によって、1340Daから3516Daの範囲のN-グリカンの質量が明らかとなった(図10参照)。

20

【0225】

前記スペクトルから、次のグリカン構造を決定することができた(表3参照)。

【0226】

【表 3】

表 3

m/z シグナル	観察された分子イオンの帰属
1338	Hex ₃ HexNAc ₄ + Na ⁺
1448	Hex ₄ (dHex)HexNAc ₄ + Na ⁺
1485	Hex ₃ (dHex)HexNAc ₄ + Na ⁺
1647	Hex ₄ (dHex)HexNAc ₄ + Na ⁺
1809	Hex ₅ (dHex)HexNAc ₄ + Na ⁺
1824	Hex ₃ (dHex) ₂ HexNAc ₅ + Na ⁺
1970	Hex ₅ (dHex)HexNAc ₄ (Sulph) ₂ +2Na ⁺
2012	Hex ₅ (dHex)HexNAc ₅ + Na ⁺
2157	NeuAc カルボキシ Hex ₄ (dHex)HexNAc ₅ + Na ⁺
2182	NeuAcHex ₅ (dHex)HexNAc ₄ Sulph + Na ⁺
2318	NeuAc カルボキシ Hex ₅ (dHex)HexNAc ₅ + Na ⁺
2421	Hex ₃ (dHex)HexNAc ₈ (Sulph)+ Na ⁺
2536	NeuAc カルボキシ Hex ₆ HexNAc ₆ + Na ⁺
2624	NeuAc2 カルボキシ Hex ₅ (dHex)HexNAc ₅ + Na ⁺
2786	NeuAc2 カルボキシ Hex ₆ (dHex)HexNAc ₅ + Na ⁺
2843	NeuAc2 カルボキシ Hex ₆ HexNAc ₆ + Na ⁺
3092	NeuAc3 カルボキシ Hex ₆ (dHex)HexNAc ₅ + Na ⁺
3153	NeuAc3 カルボキシ Hex ₆ HexNAc ₆ + Na ⁺

Hex: ヘキソース (ガラクトース 又は マンノース), HexNAc: N-アセチルヘキサミン(N-アセチルグ

ルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン), dHex: デオキシヘキソース (フコース), Sulph:

硫酸基, NeuAc: N-アセチルノイミン酸

【0227】

今日では、i) 観察されたオリゴ糖部分の個々の質量、ii) 各単糖の質量及びiii) グリカン生成経路の法則が公知であるので、これらを考慮すると、高度に複雑な以下のN-グリカン構造を高い確率で仮定することが可能である。

【0228】

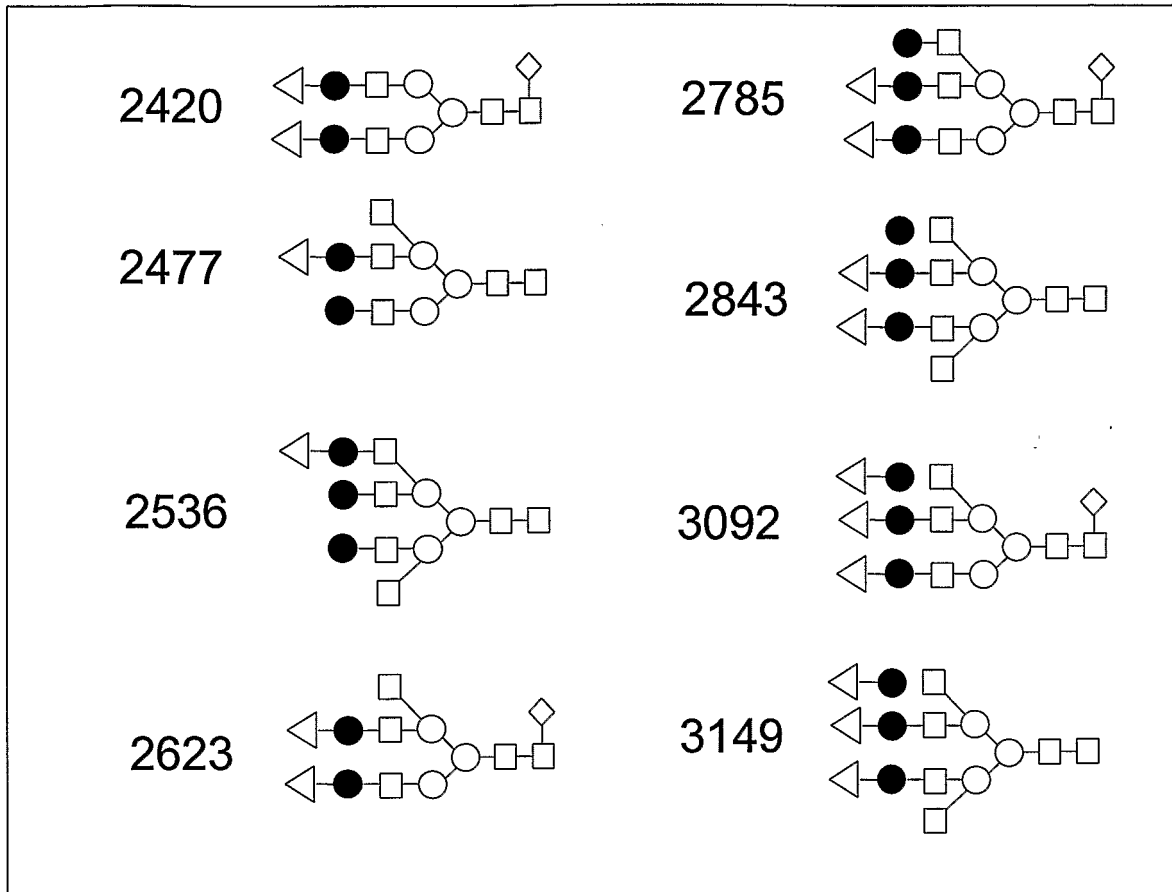
10

20

30

【表 4】

表 4: CHO由来のhIL-7(しかしこれに限定されるわけではない。)に関して特徴付けられた複合的な二岐及び三岐の哺乳動物N-グリカン



○ マンノース □ N-アセチルグルコサミン ● ガラクトース ◇ α1-3-フコース
△ シアル酸

【0229】

精製されたCHO由来のhIL-7の全てのグリカン(適用可能な場合、N-及びO-グリカン)に関して見られる異なる単糖のモル比の測定を介して、グリコシル化の複雑性をも評価した。精製されたグリコシル化されたhIL-7試料の全てのグリカンを、メタノール分解反応によって化学的に処理し、これにより、糖間のグリコシド連結を全て加水分解した。放出された単糖をペプチド構造から分離し、連結されたGas Chromatography-Mass Spectrometry Automass装置(Finnigan)を使用して選別した。公知の内部標準物質及び従来の哺乳動物N-グリカンの3マンノース含有量に関して、モル比を決定した。

【0230】

このような分析によって、CHO由来のhIL-7について、以下のモル比が付与された。

【0231】

【表 5】

表 5

単糖	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
分子量	164	180	180	221	221	309
ピーク面	43382	179120	310124	33650	344476	423587
ナノモル数	5.41	24.76	22.15	5.26	27.29	20.94
モル比	0.73	3.35	3	0.71	3.69	2.83

10

【0232】

CHO由来のhIL-7の部位特異的N-グリカンパターンの不均一性を、エンドプロテアーゼ消化後に生じたペプチドの分画及び質量分析によってアッセイした。発現されたIL-7の各N-グリコシル化部位に対応する糖ペプチドを生成するために、精製された試料をトリプシン又は他のエンドプロテアーゼで消化した。各糖ペプチドは、N末端小配列決定によって同定され、及び逆相HPLCによって分析した場合には、その特異的保持時間によって同定された。それゆえ、各糖ペプチドは、他の糖ペプチドから精製した。糖ペプチドによって生じるN-グリカンの不均一性を、MALDI-TOF MS (Q-Star, Applied Biosystems) によって分析した。MSスペクトルの各ピークに対応するm/z値によって、hIL-7の指定された部位でのN-グリカンパターンを同定できた。

20

【0233】

O-グリカン特異的レクチン(レクチンプロット、図11参照)の使用を介して、O-グリコシル化をアッセイした。

【0234】

精製されたCHO由来のhIL-7試料をSDS-PAGE分析によって分離し、PVDFメンブレンへブロットした。固定したタンパク質を、(以下に限定されるわけではないが)ペルオキシダーゼ標識したPNA(ピーナツアグルチニン)及び/又はMAA(マーキア・アムレンシス(Maackia amurensis)アグルチニン)で標識し、可視化のため染色した。精製されたCHO由来のhIL-7に対するレクチン親和性の使用を介して、グリカンの不均一性及び組成も決定した。

30

【0235】

N-及びO-グリカン構造に対する親和性を有するレクチンのアレイを選択し、96ウェルマイクロプレートに被覆するのに使用した。精製された組換えIL-7調製物の同一量を、レクチン被覆したマイクロプレートのウェル中で温置した。この工程の間、IL-7のグリカンの装飾に対する所定のレクチンの親和性に従って、IL-7の異なる量がレクチンへ結合した状態を保った。ビオチンへ連結されたIL-7特異的抗体を温置することによって、顕色を実施した。レクチン-IL-7-Absサンドイッチを、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートによって可視化した。

40

【0236】

8個の異なるレクチンを使用して、IL-7精製された試料を性質決定した。各レクチンは、糖部分を特異的に認識する。グリカンモチーフ及び構造特異性をは、表6に示されている。

【0237】

表6:レクチンによって認識される糖部分のパターン並びにそれらのグリカンモチーフ及び構造特異性の一覧の要約

LEAは、リコペルシコン・エスキュレンタム(Lycopersicon esculentum)

50

l e n t u m) 由来のレクチンである。

W G A は、トリチカムパルガレ (T r i t i c u m v u l g a r e) 由来である。

U E A . I は、ユーレックスエウロペウス (U l e x e u r o p e u s) 由来である。

M A A は、マーキア・アムレンシス (M a a c k i a a m u r e n s i s) 由来である。

A C A は、アマランザスコータス (A m a r a n t h u s C a u d a t u s) 由来である。

A I A は、アルトカルパス・インテルグリフォリア (A r t o c a r p u s i n t e r g r i f o l i a) 由来である。

A B A は、アガリクス・ビスポラス (A g a r i c u s b i s p o r u s) 由来である。

P H A . L は、ファセオラス・バルガリス (P h a s e o l u s v u l g a r i s) 由来である。

【 0 2 3 8 】

【 表 6 】

表 6:

名称	Glc	GlcN Ac	Man	Fuc	Neu Ac	Gal NAc	Gal	グリカン構造特異性
LEA		+						GlcNAc β 4GlcNAc 及び N-アセチルラクタミンオリゴマー
WGA		+			+			GlcNAc, N結合型グリカンの中心 Neu5ac
UEA I				+				フコース
MAA					+			Neu5Ac α -3Gal β 4GlcNAc-
ACA						+		Gal β 3GalNAc α -O-R (T-抗原)
AIA							+	Gal α 6 or Gal β 3GalNAc (T-抗原) 乳糖
ABA							+	Gal-GalNAc α -O-R, O結合型グリカン
PHA L								Gal β 4GlcNAc β 6Man, 分岐鎖 複合型N-グリカン

【 0 2 3 9 】

結果は、図 1 2 に示されている。

【 0 2 4 0 】

レクチンは異なる親和性を明確に示し、溶液中の精製された I L - 7 タンパク質の接近可能なグリカン装飾の一般的な構造に関する情報を与える。従って、A C A、A B A 及び A I A は、G a l 及び G a l N A c に対して親和性を有する。3つのレクチンは全て陽性の応答を示し、これらの単糖を有する N - 及び O - グリカン構造の存在を示唆する。A B A によって得られた特異的シグナルは、O - グリカン構造の存在を評価する。A C A は、A I A 及びこれより低い程度の A B A と比較して弱いシグナルを有する。このことは、O グリカンが、末端残基としてわずかな G a l N A c によって伸展されていることを示す。L E A は、N - グリカン構造の存在を示す G a l N A c に対して親和性を有する。検査した G l c N A c 特異的レクチン (データ非表示) のうち、N - アセチルラクタミンに対して親和性を有するもののみが正のシグナルを示す。W G A は、N 結合型グリカンの中心構造に対する弱い結合親和性のため、弱いシグナルを示した。高度に複雑な N - グリカンは、中心構造を遮蔽し、レクチン親和性を操作するのを困難にさせる。U E A . I は、分岐鎖フコースの存在に対して特異的な活性を有する。結合はかなり弱く、不完全であるが有効な、N - グリカンのフコシル化を示す。M A A は、末端シアル酸に対して親和性を有

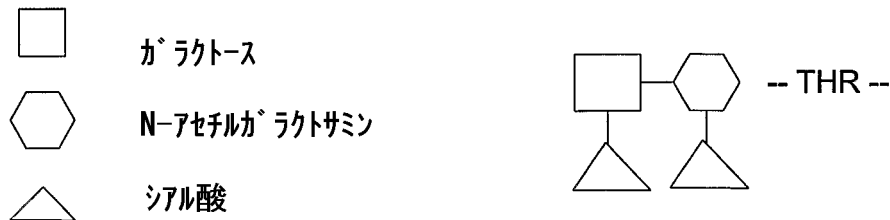
する。M A A シグナルは強く、N - 及び O - グリカンの両者に対して効果的なシアル化を示す。P H A - L は、N - グリカンの複雑な分岐鎖構造に対して親和性を有し、強いシグナルを示し、M A A の結果を確認する。P H A - L シグナルは、大きな三岐又は四岐の N - グリカンの存在を示唆する。

【 0 2 4 1 】

(適用可能な場合) C H O 由来の h I L - 7 に対して性質決定された最も典型的な哺乳動物 O - グリカン：

【 0 2 4 2 】

【 化 3 】



10

【 0 2 4 3 】

総合すると、これらの分析は、以下の図に示されているように、使用した C H O 細胞ベースの発現系が、ヒト I L - 7 複合 (三岐) N 結合型オリゴ糖を生じることを示しており、最大 10 個のシアル酸残基までの高度に部分的ないし完全なシアル化を伴って、位置 70、91 及び 116 でそれらの A S N 残基へ分岐している。また、C H O 由来の I L - 7 は、位置 T 110 に O - グリカンを含む。それゆえ、シアル化された複合型 N - グリカン及び O - グリカンを有するが、I L - 7 精製バッチは、完全に及び部分的にグリコシル化されたタンパク質の混合物をなお含有する。

20

【 0 2 4 4 】

(実施例 F)

製剤原料から薬品まで：組換え C H O 細胞によって発現された h I L - 7 の製剤、保存及び長期安定性

精製されたタンパク質の長期安定性に及ぼす多様なストレス条件 (温度、緩衝液、p H、緊張度修飾因子濃度、攪拌、強い照明) の影響を評価するためのコンビナトリー (c o m b i n a t o r y) マトリクス研究を通じて、製剤原料の最適な製剤に対する検索を実施した。高度重合型の精製された組換えヒト I L - 7 は、5 から 50 m M の間の範囲の濃度で、コハク酸塩緩衝液及び酢酸塩中で安定であることが示された。適切な p H は、p H = 5 . 0 から 7 . 0 から選択され、理想貯蔵温度は - 20 から + 4 の間であった。糖及び界面活性剤 (ポリソルベートポリマー) の低濃度を調製物へ添加して、非共有結合性の可溶性凝集を防止し得る。このような条件において、I L - 7 は、0 . 5 から 8 . 0 m g / m L、好ましくは 2 . 0 から 4 . 0 m g / m L の範囲の濃度で 12 ヶ月間超、+ 4 で (液状で) 保存できた。液状の医薬組成物は、改善された安定特性を有する。

30

【 0 2 4 5 】

(実施例 G)

特異的バイオアッセイにおける哺乳動物細胞由来の組換えヒト I L - 7 の増殖活性分析
 増殖に関して I L - 7 に厳密に依存的な (M i r e - S l o u i s e t a l . ; 2000 ; J . I m m u n o l . M e t h o d s ; 236 : 71 - 76)、C B A / C 57 B L マウス由来の骨髓細胞由来のネズミブレ B 細胞系 P B - 1 (G e r m a n C e l l B a n k D S M Z、D e u t s c h e S a m m l u n g v o n M i k r o o g a n i s m e n u n d Z e l l k u l t u r e n) への特異的バイオアッセイにおいて、哺乳動物細胞由来の組換えヒト I L - 7 の生物活性を評価した。これらの細胞を、市販の I L - 7 含有培地中の培養物中で維持し、I L - 7 に関して枯渇させた後、バイオアッセイを実施した。公知のイー・コリ由来の I L - 7 陽性対照及び I L - 7 を欠失する陰性対照と平行して、検査されるべき I L - 7 試料でバイオアッセイを実施した。

40

50

【0246】

対照又は試料由来のIL-7を、飢餓状態にした細胞培養物へ添加し、細胞増殖（この間に、分裂している細胞によって、放射性標識されたチミジン（ ^3H -Tdr、Amersham）が取り込まれる。）の用量依存的な再開を誘導した。標識の量をパルスし、液体シンチレーションベータカウンタ（Wallack）において1分間あたりの計数（cpm）で測定した。

【0247】

あるいは、MTT染色剤（ミトコンドリアRedOx活性によって還元される3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウム）又はMTS染色剤（3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-5-（3-カルボキシメトキシフェニル）-2-（4-スルホフェニル）-2H-テトラゾリウム）等の、細胞の一般的な代謝を反映する染色剤マーカーを使用しながら、本バイオアッセイを実施し得る。

【0248】

陽性対照及び検査されるべき試料の両者の連続希釈によって、アッセイされる試料/対照の量に関連したcpmの数をプロットできた。

【0249】

図13は、典型的なバイオアッセイにおいて、通常のようにして得られた用量-反応動態データ及び曲線を示す。（イー・コリ中で発現された）グリコシル化されていないr-hIL-7又は（哺乳動物細胞中で産生した）高度にグリコシル化されたr-hIL-7により、PB-1細胞増殖を誘導した。（データ地点は、三通りの測定の平均±標準偏差を表す。）

図14は、典型的なバイオアッセイにおいて通常のようにして得られた用量-反応動態データ及び曲線を示す。（イー・コリ中で発現した）グリコシル化されていないr-hIL-7又は（哺乳動物細胞中で産生した）高度にグリコシル化されているか又は過剰グリコシル化されたr-hIL-7により、PB-1細胞増殖を誘導した。（データ地点は、三通りの測定の平均±標準偏差を表す。）

各試料に関して考慮されるべき重要なパラメータは、最大活性の半分を与えるED50 = 濃度（ng/mL）であった。より高いED50は、より低い活性を意味する。IL-7バッチ間の活性の比較は、傾斜係数、最大活性等の用量反応曲線パラメータの分析を介して行った。全ての曲線パラメータから、（ng/mLでの）ED50濃度は、パラメータ変動と一緒にプールする。ED50は、インビトロでの可能な最大誘導活性の半分を誘導するのに必要なIL-7用量に相当する。この点において、高度に生物学的に活性な分子は、低いED50値に相当するのに対し、より高いED50濃度は、典型的には、インビトロでのより低い生物活性のIL-7調製物から得られる。それにもかかわらず、インビトロでの生物活性の差異は、本発明における同様のインビボでの生物活性の差異を必ずしも表さない。

【0250】

（実施例H）

霊長類での過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドの免疫原性のインビボでの評価

CHO細胞系（実施例A2、A6及びB）において発現され、実施例Dに従って精製された過剰グリコシル化されたサルIL-7（sIL-7）を、生じ得る免疫原性に関してインビボで評価した後、正常な霊長類でsIL-7の反復投与を実施した。

【0251】

実験未使用の若齢カニクイザル（マカカ・ファスシキュラリス（Macaca fascicularis））（ $n=4$ ）を研究に用いて、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ /注入の用量レベルで過剰グリコシル化されたsIL-7を与えた。処理された動物には、連続5週の期間にわたって、IL-7の総計6回の皮下投与を与えた。2ヶ月間の期間にわたって、動物を臨床的に観察した。研究を通じて、異なる時点（7投与前の第1日、第37日及び研究終了時）で、血液試料を回収した。全ての動物は研究を生き残り、sIL-7療法に対し

て有害な反応を有さなかった。s I L - 7 の投与は局所的に十分耐容性を示した。結合している抗体を検出することを目的とした特異的 E L I S A アッセイにおける妨害によって検査されるとき、抗 I L - 7 抗体は、処理された動物全ての血清中で検出されなかった。これに対して、イー・コリ由来の組換え I L - 7 は、高度に精製された製剤として生じたが、同様のプロトコールにおいて、1 : 4 0 0 から 1 : 5 0 0 0 の範囲の血清中で I L - 7 結合抗体の高い力価の産生を誘導した。

【 0 2 5 2 】

(実施例 I) 霊長類での過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドのインビボでの生物活性

正常な霊長類において h I L - 7 の薬物動態及び薬力学的特性を測定するために、C H O 細胞系 (実施例 A 1、A 6 及び B) で発現され、実施例 D のように精製された過剰グリコシル化されたヒト I L - 7 (h I L - 7) をインビボで評価した。

【 0 2 5 3 】

実験未使用の若齢カニクイザル (マカカ・ファスシキュラリス) を研究に用い、2 つの群 ; 未処理群 n = 2 及び h I L - 7 の 1 0 0 μ g / k g / 注入群 n = 2、へと分割した。異なる時点、すなわち第 1 日 (注入 0、3、6、9 及び 1 2 時間後)、2、3、4、7、2 1 及び 4 5 日目での研究を通じて血液試料を回収した。h I L - 7 の投与は注入部位で局所的な反応なく、十分に耐容された。マカクにおける h I L - 7 の単回皮下投与後、h I L - 7 の薬物動態パターン及びパラメータを最初の 7 2 時間から確立した。

・血漿特性は、ピーク吸収後に二指数関数的低下を示した。

・血漿中で観察された生成物半減期は、3 0 / 4 0 時間の範囲であった。この半減期は、同一条件下で投与されたイー・コリ由来の組換え I L - 7 で観察される半減期 (5 から 8 時間) と比較すると、有意に増大している。このことは、血液中での過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドのインビボでの改善された安定性を反映する。

・平均残存時間 (M R T) は、約 4 0 時間であったのに対し、イー・コリ生成物では約 1 0 時間であった。

・最大濃度に到達する時間は 1 8 0 分であった。

【 0 2 5 4 】

結論として、薬物動態研究は、本発明の過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドが、改善された薬力学的効果をもたらす、改善及び延長された薬物動態特性を呈することを示す。1 0 0 μ g / k g での h I L - 7 の単回注入は、ベースラインの前処理値からの変化のそれぞれ 2 0 0 % 及び 1 7 0 % である末梢 C D 3 ⁺ C D 4 ⁺ 及び C D 3 ⁺ C D 8 ⁺ T 細胞数の有意な増加を誘導した。特異的 I L - 7 受容体 α 鎖 (C D 1 2 7) を発現するリンパ球 T 細胞 (C D 4 及び C D 8) の数は、注入 6 時間後の早期に末梢血中で一過性に減少する。C D 1 2 7 を発現するリンパ球 T 細胞は末梢血中で、注入 4 8 時間後に再度現れ、注入 7 日後のみベースラインの値に戻った。イー・コリ由来の組換え I L - 7 の単回皮下投与後、C D 1 2 7 を発現するリンパ球 T 細胞のベースライン値への完全な復帰が、注入 4 日後に生じた。過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドの、より長期にわたる受容体占有率の動態をイー・コリ由来の組換え I L - 7 と比較し、以下に示されているように、霊長類中での過剰グリコシル化された I L - 7 ポリペプチドのより長い半減期を反映する。これらの結果は、I L - 7 の皮下投与がより優れた生物学的利用率をもたらすが、これは改善された薬物動態学的効果に至らず、実際、皮下注入によって得られた延長された送達特性が、静脈内注入後に得られた一過性の送達特性よりも効率的であることを示す従来の結果と合致する。ここで、タンパク質の過剰グリコシル化は、長期化された動力学的特性を誘導し、次いで、改善された薬力学的活性をもたらす。薬物の副作用は、通常、ピーク濃度と連関しているため、この延長された特性の点においても、改善された臨床的耐性が期待される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 5 5 】

【 図 1 】 図 1 : プラスミド p h - p g k . E P 7 - h I L - 7 . e f 1 a p A : 「 伸長

因子1 α 」ポリA配列； h g h p A「ヒト成長ホルモン」ポリA配列； S p A：合成ポリA配列； h p h：ハイグロマイシン耐性； A m p：アンピシリン耐性； M A Rウサギ β グロビン：推定上のウサギ β グロビン マトリクス付着領域； p r . t k：チミジンキナーゼプロモーター、 s v 4 0 e n h .：s v 4 0エンハンサー； p r p g k：ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター； 5' U T R i n t 1：キメライントロンを含む5' 非翻訳領域（h Bグロビン-イムノグロブリン）； E P 7 - h I L 7：E P 7シグナルペプチドから上流の最適化されたヒトI L - 7 c D N A。

【図2】図2：プラスミドp B h - p g k . E P 7 - h I L - 7。B c l 2：B c l 2 c D N A； I R E S：内部リボソーム流入部位

【図3】図3：第1日（D 1）から第10日（D 10）までバイオリアクター中で培養した哺乳動物細胞における組換えh I L - 7の発現の、細胞内I L - 7対分泌型I L - 7のウェスタンブロット。

10

【図4】図4：精製過程を通じてのr e c - h I L - 7グリコフォームのクロマトグラフィー分画。異なる溶出画分（B 1からB 10）におけるタンパク質含有量のS D S P A G E分析。捕捉工程及びH I C工程の両者の間、I L - 7グリコフォームを分離した。わずかに異なる物理化学特性に従って、h I L - 7グリコフォームを微分溶出するため、緩衝液勾配を使用した。分画及びその後の適切な画分の選択によって、3つの完全にグリコシル化された組換えh I L - 7（10-糖部分と結合した3N-又は2N-）が濃縮できた。MWM、タンパク質分子量マーカー（10；15；20；25；37；50；75；100；150；250 k D a）； B 1からB 10、溶出画分； B 1からB 4、更なる精製のために保持された溶出画分； C T、同一の最適化されたh I L - 7 c D N Aで形質移入されたH E K 2 9 3細胞系の培養から得られた画分B 1。

20

【図5】図5：S D S P A G E上での精製された組換えh I L - 7の分析。還元条件下でのS D S P A G Eに、精製された組換えh I L - 7の試料を負荷した。ゲルを、A . クーマシー染色 B . ウェスタンブロットにより、ゲルを評価した。MWM：分子量マーカー（10；15；20；25；37；50；75；100；150；250 k D a）。レーン1：H G - 3 7 - 1 4 7；レーン2：H G - 4 0 - 1 0 4；レーン3：H G - h I L - 7；レーン4：イー・コリh I L - 7。

【図6】図6：精製されたグリコシル化されたr e c - h I L - 7生成物のS D S - P A G Eによる比較上の見かけの分子量。レーンM = 分子量マーカー、レーン1 = 米国特許第5328988号においてN a m e n e t a l .により記載される精製された生成物の模式的呈示（約25 k D a）、レーン2 = 出願人により精製されたC H O r e c - s I L - 7生成物、レーン3 = 出願人により精製されたC H O r e c - h I L - 7生成物、レーン4 = 見かけの分子量比較のための標準物質としてのh I L - 7 1 N - 及び2 N - グリコフォーム、レーン5 = 出願人により精製されたイー・コリr e c - h I L - 7生成物（C Y T 9 9 0 0 7）。

30

【図7】図7：脱グリコシル化後の還元条件下でのS D S P A G E上での精製された組換えヒトI L - 7の分析。精製されたグリコシル化された組換えヒトI L - 7の試料をP N G a s eにより消化した。2分から24時間までの動力学的試料をゲル上に負荷した。P N G a s e F + O - グリコシダーゼ/ β （1-4）ガラクトシダーゼ/ニューラミニダーゼ/N - アセチルグルコサミニダーゼを使用して、別の試料（O O / N）を24時間かけて消化した。コントロールとして、グリコシル化されたヒトI L - 7及びイー・コリヒトI L 7も前記ゲル上に負荷した。次に、3N+1O、2N+1O、1N+1O、1Oグリコフォーム及び脱グリコシル化されたヒトI L 7を、前記ゲル上で概算した分子量に従って、それぞれ33、27、24、18及び17 k D aで分離した。

40

【図8】図8：異なる精製されたr e c - h I L - 7グリコフォームの質量分析。- 23 k D a（23179 D a）：R e c - h I L - 7（C H O S、2N+3N）、- 25 k D a（25127 D a）：R e c - h I L - 7（C H O S、3N）

【図9】図9：精製された過剰グリコシル化された組換えヒトI L - 7ポリペプチドの2次元電気泳動分析。等電点電気泳動（p H範囲3から10）後、還元条件下でのS D S -

50

PAGE上でグリコフォームを分離した(クーマシーブルー染色)。

【図10】図10: 組換えhIL-7 N-グリカン複雑性の質量分析。精製されたグリコシル化されたhIL-7試料を、ペプチド-N-グリコシダーゼF(PNGase F、Roche)等のエンドグリコシダーゼにより酵素的に消化した。酵素消化により放出されたタンパク質試料である放出されたN結合型オリゴ糖を、ペプチド構造から分離し、MALDI-TOF質量分析により分析した。各ピークに対応するm/z値を国際データベースで検索し、hIL-7分子に関するN-グリカンのパネルを正確に同定できた。

【図11】図11: 特異的なレクチン(レクチンプロット)を使用する組換えhIL-7に関するO-グリカンの性質決定。タンパク質試料の分離及びメンブレンへのプロッティングの後、2つのレクチン(マキア・アムレンシス(Maackia amurensis)由来のMAA、アラキス・ハイポゲア(Arachis hypogaea)由来のPNA)のうちのいずれか1つにより評価した。レーン1: シアル化されたタンパク質である標準タンパク質フェチュイン、レーン2: シアリダーゼで処理したフェチュイン、レーン3: hIL-7、レーン4: シアリダーゼで処理したhIL-7。

【図12】図12: 過剰グリコシル化されたIL-7ポリペプチドのレクチン親和性(ELISAスクリーニング)。精製した組換えhIL-7調製物の同一量を結合させるため、レクチン(リコペルシコン・エスキュレントム(Lycopersicon esculentum)由来のLEA、トリチカム・バルガレ(Triticum vulgare)由来のWGA、ユーレックス・エウロペウス(Ulex europeus)由来のUEA-I、マキア・アムレンシス(Maackia amurensis)由来のMAA、アマランザス・コーダタス(Amaranthus caudatus)由来のACA、アルトカルパス・インテルグリフォリア(Artocarpus integrifolia)由来のAIA、アガリクス・ビスポラス(Agaricus bisporus)由来のABA、ファセオラス・バルガリスハビング(Phaseolus vulgaris having)由来のPHA-L)を被覆したプレートを使用した。ビオチンへ連結した特異的抗hIL-7抗体(Ab)によって、グリカン部分に対するレクチン特異性に依存する結合したIL-7の量を評価した。レクチン-IL-7-Abサンドイッチを、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートにより評価した。

【図13】図13: 組換えヒトIL-7活性のバイオアッセイ。(イー・コリ中で発現した)グリコシル化していないr-hIL-7又は(哺乳動物細胞中で産生した)高度にグリコシル化されたr-hIL-7により、PB-1細胞増殖の用量-反応動態を誘導した。

【図14】図14: 組換えヒトIL-7活性のバイオアッセイ。用量-反応動態データ及び曲線を、典型的なバイオアッセイにおいて通常の方法により得た。(イー・コリ中で発現した)グリコシル化していないr-hIL-7又は(哺乳動物細胞中で産生した)高度にグリコシル化されているか又は過剰グリコシル化されたr-hIL-7により、PB-1細胞増殖を誘導した。(データ地点は、三通りの測定の平均±標準偏差を表す。)

10

20

30

【図 1】

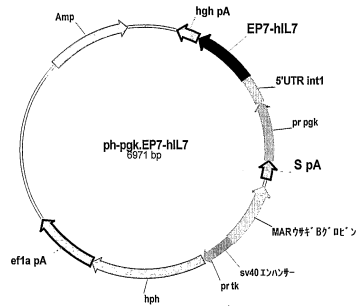


Figure 1

【図 2】

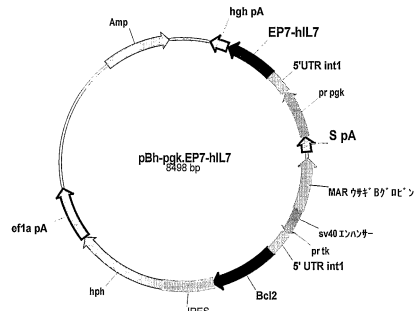


Figure 2

【図 3】

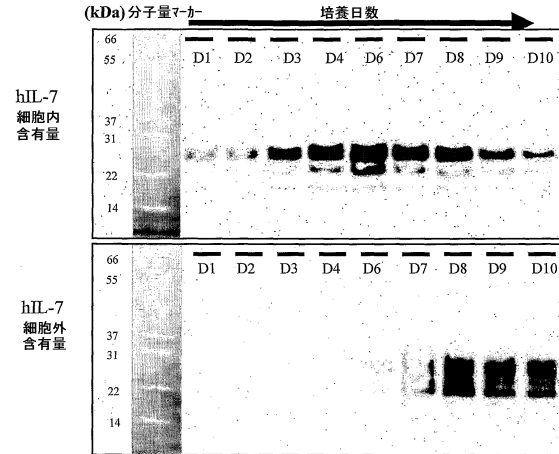


Figure 3

【図 4】

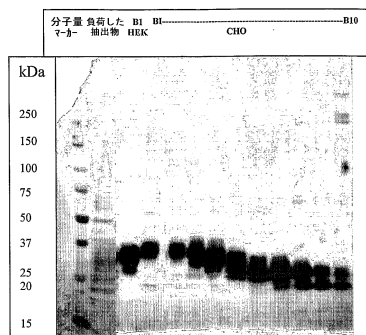


Figure 4

【図 6】

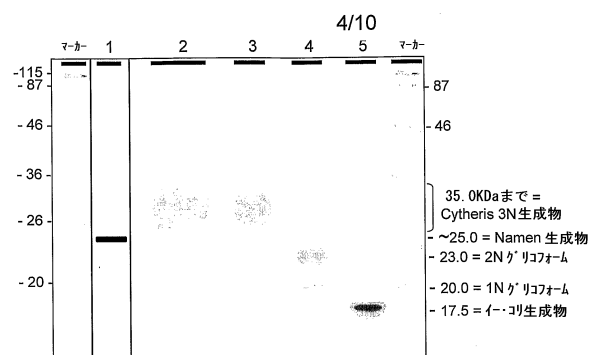


Figure 6

【図 5】

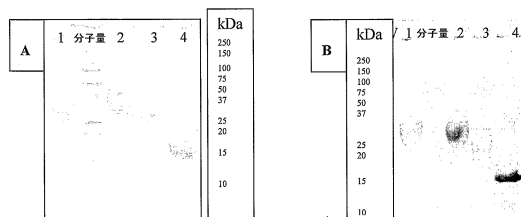


Figure 5

【図 7】

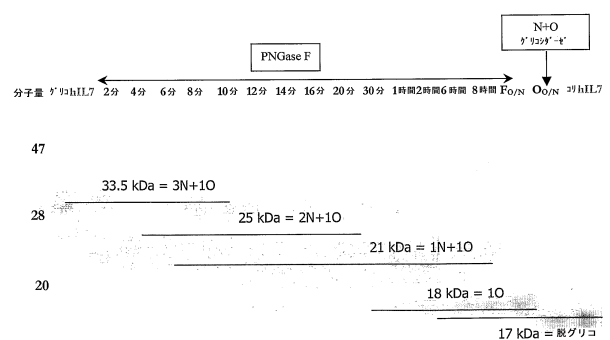


Figure 7

【図 8】

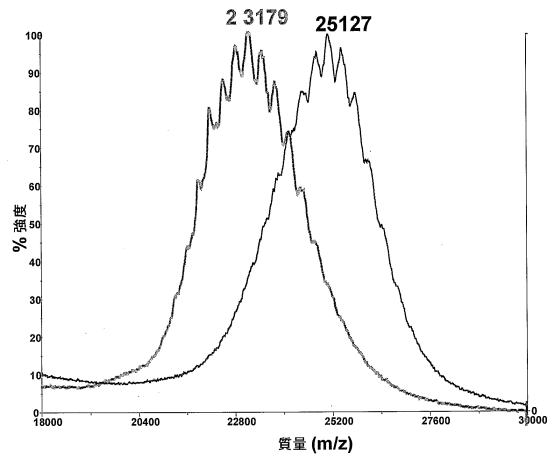


Figure 8

【図 9】

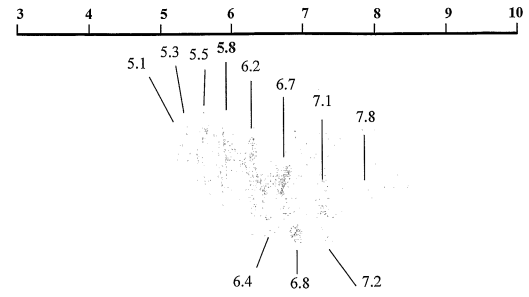


Figure 9

【図 10】

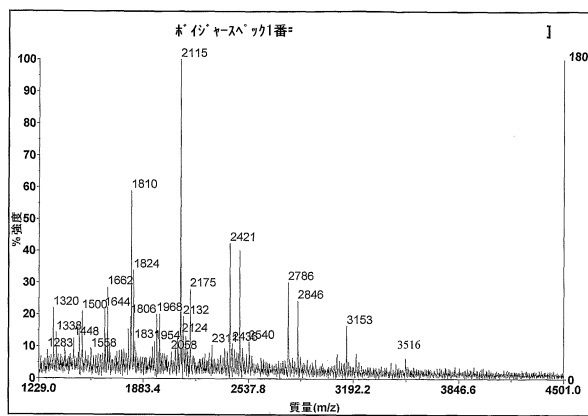


Figure 10

【図 11】

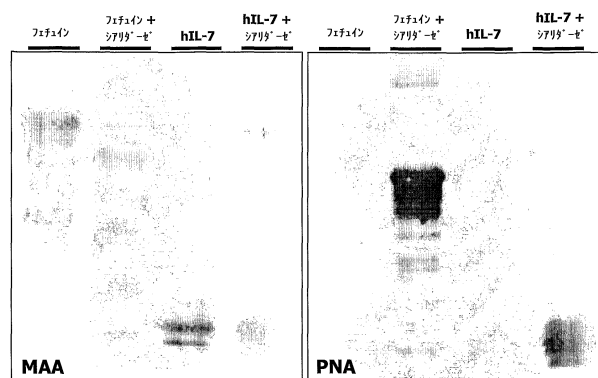


Figure 11

【図 12】

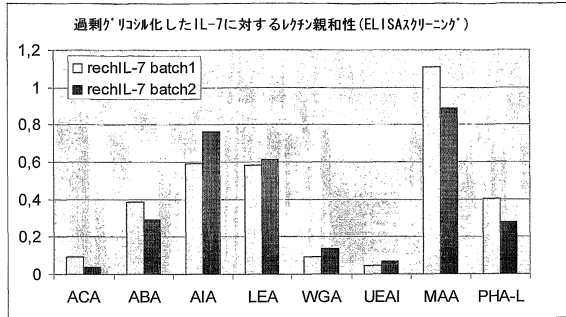


Figure 12

【図 13】

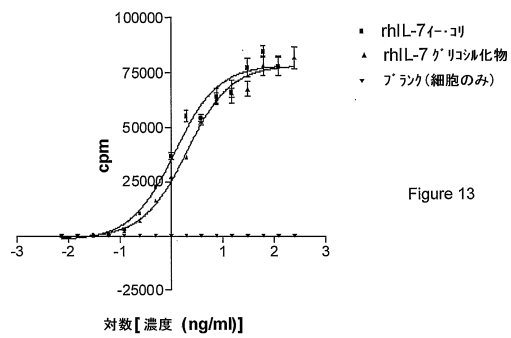
IL-7 α -糖リコシル化物のイソトピー分析

Figure 13

【図 14】

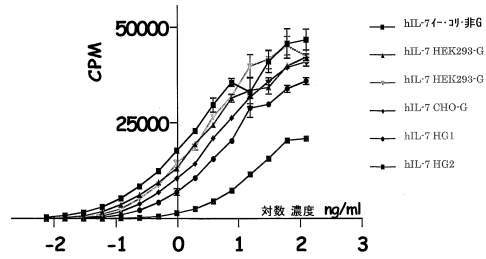


Figure 14

【配列表】

0005685363000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	K
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	37/66	F
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	

- (72)発明者 ランス, イアン
フランス国、エフ - 9 2 3 1 0 ・セーブル、グランド・リュ・ 1 8
- (72)発明者 グルゴワール, アンヌ
フランス国、エフ - 5 5 8 0 0 ・オゼコール、グランド・リュ・ 1 7
- (72)発明者 ブルク, コリーヌ
フランス国、エフ - 9 2 1 7 0 ・バンブ、リュ・ドイツシー・ 3 3

審査官 西村 亜希子

- (56)参考文献 特開平05 - 2 6 8 9 7 1 (J P , A)
国際公開第2 0 0 4 / 0 1 8 6 8 1 (WO , A 1)
特表平04 - 5 0 3 6 0 4 (J P , A)
特表2 0 0 4 - 5 0 4 0 1 6 (J P , A)
Nat. Biotechnol. , 2 0 0 3 年, Vol.21, No.4, p.414-421

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- | | |
|---------|-----------|
| C 1 2 N | 1 5 / 0 9 |
| A 6 1 K | 3 8 / 2 1 |
| A 6 1 P | 3 1 / 1 2 |
| A 6 1 P | 3 1 / 1 4 |
| A 6 1 P | 3 1 / 1 8 |
| A 6 1 P | 3 7 / 0 4 |
| C 0 7 K | 1 4 / 5 4 |
| C 1 2 N | 1 / 1 5 |
| C 1 2 N | 1 / 1 9 |
| C 1 2 N | 1 / 2 1 |
| C 1 2 N | 5 / 1 0 |
| C 1 2 P | 2 1 / 0 2 |
- C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)