



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0127185
(43) 공개일자 2015년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C07K 14/55 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
A61K 38/2013 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7027977
(22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년10월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/028913
(87) 국제공개번호 WO 2014/153063
국제공개일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
61/784,669 2013년03월14일 미국(US)

(71) 출원인
암젠 인크
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원
암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
카난, 구나세카란
미국 91320 캘리포니아주 뉴버리 파크 앰버튼 레
인 1056
(74) 대리인
양영준, 김영

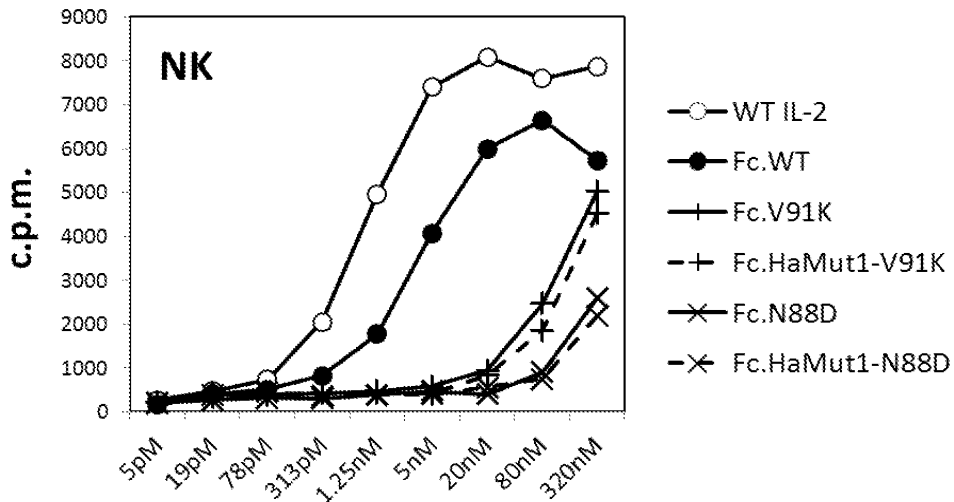
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 비글리코실화 Fc-함유 폴리펩티드

(57) 요약

N297에서 글리코실화 부재에도 불구하고 효과기 기능이 없거나 크게 감소되고 높은 안정성을 갖는 변이체 인간 IgG1 Fc 분자가 본원에 제공된다. 또한, 포유류 세포에서 발현되는 경우 글리코실화되는 링커 펩티드가 본원에 제공된다. IL-2는 세 막통과 수용체 서브유닛: IL-2의 결합 시 함께 세포내 신호전달 이벤트를 활성화하는 IL-2R- 및 IL-2Ry, 그리고 IL-2와 IL-2RBY 간 상호작용을 안정화하는 역할을 하는 CD25(IL-2Ra)에 결합한다. IL-2RBY에 의해 전달되는 신호에는 PI3-키나아제, Ras-MAP-키나아제 및 STAT5 경로의 것들이 포함된다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 47/48369 (2013.01)

C07K 14/55 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/524 (2013.01)

C07K 2317/71 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 IgG1 항체의 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 상기 Fc 영역이 N297G 돌연변이를 포함하고 인간 IgG1의 상기 Fc 영역이 서열 목록 번호 3에 나타난 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 IgG1의 상기 Fc 영역이 서열 목록 번호 3에 나타난 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 IgG1의 상기 Fc 영역이 서열 목록 번호 4에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 인간 IgG1의 상기 Fc 영역이 폴리펩티드를 안정화하기 위한 하나 이상의 돌연변이를 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열 목록 번호 3 또는 서열 목록 번호 4에 나타난 하나 이상의 아미노산이 시스테인으로 치환되는 폴리펩티드.

청구항 6

제5항에 있어서, 서열 목록 번호 3 또는 서열 목록 번호 4에 나타난 아미노산 서열의 V259, A287, R292, V302, L306, V323, 또는 I332가 시스테인으로 치환되는 폴리펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 Fc 영역이 서열 목록 번호 3 또는 서열 목록 번호 4에 나타난 아미노산 서열 내에 A287C 및 L306C 치환을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 Fc 영역이 서열 목록 번호 3 또는 서열 목록 번호 4에 나타난 아미노산 서열 내에 V259C 및 L306C 치환을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 Fc 영역이 서열 목록 번호 3 또는 서열 목록 번호 4에 나타난 아미노산 서열 내에 R292C 및 V302C 치환을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 Fc 영역이 서열 목록 번호 3 또는 서열 목록 번호 4에 나타난 아미노산 서열 내에 V323C 및 I332C 치환을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 Fc 영역을 포함하는 항체.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 Fc 영역을 포함하는 Fc-융합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산.

청구항 14

제13항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 15

제13항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

제14항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 숙주 세포가 포유류 숙주 세포인 숙주 세포.

청구항 18

링커를 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 링커가 GGNGT(서열 목록 번호 6) 또는 YGNGT(서열 목록 번호 7)인 폴리펩티드.

청구항 19

제18항에 있어서, 링커가 N-글리코실화를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 20

제18항에 있어서, 링커가 폴리펩티드 구조에서 루프 내에 삽입되거나 이를 대체하는 폴리펩티드.

청구항 21

비글리코실화 IgG1 Fc-함유 분자의 제조 방법에 있어서, 상기 방법이 하기 단계를 포함하는 방법:

- a) 포유류 세포 배양 중 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 발현하는 단계; 및
- b) 상기 배양으로부터 비글리코실화 IgG1 Fc-함유 분자를 수확하는 단계.

청구항 22

비글리코실화 IgG1 Fc-함유 분자의 제조 방법에 있어서, 포유류 세포에서 발현되는 경우 상기 방법이 Fc 영역의 N297에 대한 코돈을 글리신 코돈으로 돌연변이화하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2013. 3. 14.에 출원된 U.S. 가출원 일련 번호 61/784,669의 이익을 청구한다. 상기 확인된 출원은 본원에 참조로 도입된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2014. 3. 13.에 생성된 A-1892-WO-PCT_ST25.txt를 표제로 하는 텍스트 파일로 제공되며, 57,344 바이트 크기이다. 서열 목록의 전자 포맷 정보는

본원에 그 전문이 참조로 도입된다.

배경 기술

[0005] IL-2는 세 막통과 수용체 서브유닛: IL-2의 결합 시 함께 세포내 신호전달 이벤트를 활성화하는 IL-2Rβ 및 IL-2Rγ, 그리고 IL-2와 IL-2Rβ γ 간 상호작용을 안정화하는 역할을 하는 CD25(IL-2Ra)에 결합한다. IL-2Rβ γ에 의해 전달되는 신호에는 PI3-키나아제, Ras-MAP-키나아제 및 STAT5 경로의 것들이 포함된다.

[0006] T 세포는 전형적으로 조직에 존재하는 저농도 IL-2에 대응하는 CD25의 발현을 필요로 한다. CD25를 발현하는 T 세포에는 자가면역 염증을 억제하는데 필수적인 FOXP3+ 조절 T 세포(Treg 세포), 및 CD25를 발현하도록 활성화된 FOXP3- T 세포가 모두 포함된다. FOXP3- CD25+ T 효과기 세포(Teff)는 CD4+ 또는 CD8+ 세포일 수 있고, 둘 다 염증, 자가면역성, 기관 이식 거부, 또는 이식편대 숙주병에 기여할 수 있다. IL-2-자극 STAT5 신호전달은 정상적인 T-reg 세포 성장 및 생존을 위해 그리고 높은 FOXP3 발현을 위해 중추적이다.

[0007] 공동 출원한 WO 2010/085495에서, 본 출원인은 Treg 세포를 우선적으로 증식시키거나 자극하는 IL-2 뮤테인의 용도를 기재한다. 대상체에 투여되는 경우, Treg 세포 상의 효과는 염증 및 자가면역 질환을 치료하는데 유용하다. 본원에 기재된 IL-2 뮤테인은 생체내 Teff 세포에 비해 Treg를 증식시키는데 유용하지만, 인간 치료제에 대해 최적 속성을 가진 IL-2 뮤테인을 생성하는 것이 바람직하였다.

요약

[0009] 고수율 제조 가능성에 적합하고 최적화된 약리 활성을 갖는 IL-2 뮤테인이 본원에 기재된다. 예시적인 IL-2 뮤테인-기반 인간 치료제를 생산하기 위한 시도로, 여러 예상하지 못하고 예측하지 못한 관찰이 얻어졌다. 본원에 기재된 IL-2 뮤테인은 그 시도의 결과이다.

[0010] 본원에 기재된 IL-2 뮤테인은 IL-2에 대해 최소 수의 변경을 가짐으로써 IL-2 뮤테인 및/또는 내인성 IL-2에 대한 면역 반응의 생성 가능성을 감소시키지만 Treg에 우선적인 증식 및 활성화를 유지한다. 또한 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인은 대상체에 투여되는 경우, 혈청 반감기를 증가시키는 분자, 예로 항체 Fc에 융합된다. IL-2 뮤테인은 짧은 혈청 반감기(피하 주사에 대해 3 내지 5hr)를 갖는다. 본원에 기재된 예시적인 IL-2 뮤테인 Fc 융합물은 인간에서 적어도 1일, 적어도 3일, 적어도 5일, 적어도 10일, 적어도 15일, 적어도 20일, 또는 적어도 25일의 반감기를 갖는다. IL-2 뮤테인의 약동학에 대한 상기 효과는 IL-2 뮤테인 치료제의 감소되거나 덜 빈번한 투여를 허용한다.

[0011] 또한, 약학적으로 큰 분자를 생성하는 경우, 응집을 최소화하고 분자 안정성을 최대화하면서 큰 분자를 대량 생산하는 능력에 대해 고려해야 한다. IL-2 뮤테인 Fc-융합 분자는 이러한 속성을 나타낸다.

[0012] 따라서 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 IgG1 Fc 영역을 함유한다. IgG1의 효과기 기능(예, ADCC 활성)을 없애는 것이 바람직한 경우, 위치 297에서 아스파라긴의 글리신으로의 돌연변이(N297G; EU 번호 지정 방식)는 비글리코실화 IgG1 Fc로 이어지는 다른 돌연변이에 비해 크게 개선된 정제 효율 및 생물리적 특성을 제공하는 것으로 나타났다. 바람직한 구현예에서, 시스템이 Fc 내로 조작되어 디설피드 결합을 허용하며, 이는 비글리코실화 Fc-함유 분자의 안정성을 증가시킨다. 비글리코실화 Fc의 유용성은 IL-2 뮤테인 Fc-융합물 맥락을 넘어선다. 따라서 N297G 치환 및 선택적으로 하나 이상의 추가 잔기의 시스템인으로서의 치환을 포함하는 Fc-함유 분자, Fc-융합물 및 항체가 본원에 제공된다.

[0013] 본 발명의 다른 측면에는 글리코실화 펩티드 링커가 포함된다. N-글리코실화를 거치기 쉬운 바람직한 링커 펩티드에는 GGNGT(서열 목록 번호 6) 또는 YGNGT(서열 목록 번호 7)가 포함된다.

도면의 간략한 설명

[0015] 도 1 단기 자극 분석에서, IgG-Fc의 C-말단으로의 융합에 의한 단독이량체화는 감소된 역가 및 CD25에 대해 고친화도를 갖는 IL-2 뮤테인의 활성을 변경하지 않는다.

[0016] 도 2a 및 도 2b 나타낸 돌연변이를 가지며 Fc-이종이량체의 한 쪽 C-말단에 융합된 IL-2 뮤테인을 T 세포에서 STAT5 인산화를 자극하는 이들의 능력에 대해 평가하였다. 이들 뮤테인은 또한 CD25에 대해 고친화도를 부여하는 3 돌연변이(V69A, N71R, Q74P)를 함유하였다. 이들의 활성을 Fc 융합이 없는 세 형태의 IL-2(흰색 기호): WT IL-2, HaWT(CD25에 대한 고친화도)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P), 및 HaD(CD25에 대한 고친화도 및 감소된 신호전달 활성)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D)와 비교하였다. 포스포-STAT5 반응을 관문화된 FOXP3+CD4+ 및 FOXP3-CD4+ T 세포에 대해 나타낸다.

- [0017] 도 3 Fc-이종이량체에 융합된 IL-2 뮤테인 적정에 반응하는 T 세포 하위세트의 증식. 융합 단백질의 활성을 Fc 융합이 없는 세 형태의 IL-2(흰색 기호): WT IL-2, HaWT(CD25에 대한 고친화도)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P), 및 HaD(CD25에 대한 고친화도 및 감소된 신호전달 활성)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D)와 비교하였다.
- [0018] 도 4 Fc-이종이량체에 융합된 IL-2 뮤테인 적정에 반응하는 NK 세포의 증식. 융합 단백질의 활성을 Fc 융합이 없는 세 형태의 IL-2(흰색 기호): WT IL-2, HaWT(CD25에 대한 고친화도)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P), 및 HaD(CD25에 대한 고친화도 및 감소된 신호전달 활성)(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D)와 비교하였다.
- [0019] 도 5 Fc-동종이량체 N297G에 융합된 IL-2 뮤테인 적정에 반응하는 T 세포 하위세트의 증식. Fc.뮤테인의 활성을 WT IL-2(흰색 원) 및 Fc.WT(검은색 원)과 비교하였다. CD25에 대한 고친화도를 부여하는 돌연변이(HaMut 1)는 V69A 및 Q74P였다.
- [0020] 도 6 Fc-동종이량체 N297G에 융합된 IL-2 뮤테인 적정에 반응하는 NK 세포의 증식. Fc.뮤테인의 활성을 WT IL-2(흰색 원) 및 Fc.WT(검은색 원)과 비교하였다.
- [0021] 도 7a 및 도 7b CD25에 대한 고친화도를 부여하는 돌연변이가 없는 Fc.IL-2 뮤테인은 인간화된 마우스에서 Treg 증식 및 FOXP3 상향조절을 촉진한다.
- [0022] 도 8 낮은 주별 용량(동물 별로 0.5 μ g)의 Fc.IL-2 뮤테인은 인간화된 마우스에서 Treg 증식 및 FOXP3 상향조절을 촉진하며, Fc.N88D 및 Fc.WT에 비해 Fc.V91K에서 더 우수한 활성이 관찰되었다.
- [0023] 도 9 Fc.V91K 및 Fc.N88D는 CD25와의 연합을 통해 활성화된 T 세포 표면 상에 지속된다.
- [0024] 바람직한 구현예의 상세한 설명
- [0025] 본원에서 이용되는 색션 제목은 단지 구성의 목적을 위한 것이며, 기재되는 대상을 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 본 명세서 내에 언급되는 모든 참고문헌은 이들의 전문이 명시적으로 참조로 도입된다.
- [0026] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 조직 배양 및 형질전환, 단백질 정제 등을 위해 표준 기법이 이용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조업체 사양에 따라 또는 당분야에서 일반적으로 달성되는 대로 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 하기 절차 및 기법은 일반적으로 당분야에 널리 공지된 통상적 방법에 따라 그리고 명세서에 걸쳐 언급되고 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예로, 임의 목적에 대한 참조로 본원에 도입된 [Sambrook 등, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, N.Y.]를 참고하라. 구체적인 정의가 제공되지 않는 한, 본원에 기재된 분석 화학, 유기 화학 및 의학 그리고 약학 화학의 실험실 절차 및 기법과 일치하여 이용되는 명명법은 당분야에 널리 공지되어 있고 일반적으로 이용된다. 화학 합성, 화학 분석, 약학 제조, 제형화, 전달 및 환자 치료를 위한 표준 기법이 이용될 수 있다.
- [0027] IL-2
- [0028] 본원에 기재된 IL-2 뮤테인은 야생형 인간 IL-2의 변이체이다. 본원에서 이용되는 "야생형 인간 IL-2", "야생형 IL-2", 또는 "WT IL-2"는 하기 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 의미한다:
- APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR
PRDLISNINIVILELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSISTLT
- [0029]
- [0030] 여기서, X는 C, S, V, 또는 A이다(서열 목록 번호 2).
- [0031] 변이체는 야생형 IL-2 아미노산 서열 내에 하나 이상의 치환, 결실, 또는 삽입을 함유할 수 있다. 잔기는 한 글자 아미노산 코드에 이어 IL-2 아미노산 위치로 명명된다, 예로 K35는 서열 목록 번호 2의 위치 35에서의 라이신 잔기이다. 치환은 본원에서 한 글자 아미노산 코드, IL-2 아미노산 위치에 이어 치환하는 한 글자 아미노산 코드로 명명된다, 예로 K35A는 서열 목록 번호 2의 위치 35에서 라이신 잔기의 알라닌 잔기로의 치환이다.
- [0032] IL-2 뮤테인
- [0033] T 조절(Treg) 세포를 우선적으로 자극하는 인간 IL-2 뮤테인이 본원에 제공된다. 본원에서 이용되는 "우선적으로 T 조절 세포를 자극한다"란 뮤테인이 CD3+FoxP3- T 세포에 비해 CD3+FoxP3+ T 세포의 증식, 생존, 활성화 및 /또는 기능을 촉진함을 의미한다. Treg를 우선적으로 자극하는 능력을 측정하는 방법은 말초혈 백혈구의 유세

포 측정에 의해 측정될 수 있고, 여기서 총 CD4+ T 세포 중 FOXP3+CD4+ T 세포의 백분율 증가, 총 CD8+ T 세포 중 FOXP3+CD8+ T 세포의 백분율 증가, NK 세포 대비 FOXP3+ T 세포의 백분율 증가, 및/또는 다른 T 세포 상 CD25 발현의 증가 대비 FOXP3+ T 세포 표면 상 CD25 발현 수준의 더 큰 증가가 관찰된다. 또한 Treg 세포의 우선적 성장은 비설파이트-처리 게놈 DNA로부터 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR) 산물의 서열분석에 의해 검출되는 전혈로부터 추출된 DNA 중 탈메틸화된 CD3 유전자에 비해 탈메틸화된 FOXP3 프로모터 DNA(즉 Treg-특이적 탈메틸화 영역, 또는 TSDR)의 증가된 표시로서 검출될 수 있다(J. Sehouli, 등 2011. Epigenetics 6:2, 236-246).

[0034] Treg 세포를 우선적으로 자극하는 IL-2 뮤테인은 대상체 또는 말초혈 표본에서 CD3+FoxP3- T 세포 대비 CD3+FoxP3+ T 세포의 비를 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 150%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 적어도 600%, 적어도 700%, 적어도 800%, 적어도 900%, 또는 적어도 1000% 증가시킨다.

[0035] 바람직한 IL-2 뮤테인에는 비제한적으로 서열 목록 번호 2에 나타난 아미노산 서열에서 V91K 또는 N88D 치환을 포함하는 IL-2 뮤테인이 포함된다. 예시적인 IL-2 뮤테인을 서열 목록 번호 1에 나타낸다. C125A 치환을 포함하는 서열 목록 번호 1에 나타난 아미노산 서열이 특히 바람직하다. 야생형 IL-2 서열에 대한 추가 돌연변이의 수를 감소시키는 것이 바람직할 수 있지만, 본 발명에는 상기 뮤테인이 우선적으로 Treg를 자극하는 활성을 유지하는 한, V91K 또는 N88D 치환에 부가하여 절단 또는 추가 삽입, 결실, 또는 치환을 갖는 IL-2 뮤테인이 포함된다. 따라서 구현예에는 Treg 세포를 우선적으로 자극하고 V91K 또는 N88D를 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 서열 목록 번호 2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 IL-2 뮤테인이 포함된다. 특히 바람직한 구현예에서, 이러한 IL-2 뮤테인은 서열 목록 번호 2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 아미노산 서열에 있어서, 서열 동일성 및/또는 유사성은 비제한적으로 [Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482]의 국소 서열 동일성 알고리즘, [Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443]의 서열 동일성 정렬 알고리즘, [Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444]의 유사성 검색 방법, 이들 알고리즘의 전산화 구현(Wisconsin Genetics 소프트웨어 패키지, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA), [Devereux 등, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395]에 기재된 Best Fit 서열 프로그램을 포함하는 당분야에 공지된 표준 기법을 이용해서, 바람직하게는 기본 설정을 이용해서 또는 조사에 의해 결정된다. 바람직하게는, 동일성 백분율은 하기 파라미터: 미스매치 페널티 1; 갭 페널티 1; 갭 크기 페널티 0.33; 및 연결 페널티 30에 기반한 FastDB에 의해 계산된다 ["Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149(1988), Alan R. Liss, Inc.].

[0037] 유용한 알고리즘의 예는 PILEUP이다. PILEUP은 진보적인 페어식 정렬을 이용하여 관련 서열군으로부터의 다중 서열 정렬을 생성한다. 이는 정렬을 생성하기 위해 이용되는 클러스터링 관계를 나타내는 트리를 도식화할 수도 있다. PILEUP은 [Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360]의 진보적 정렬 방법의 단순화를 이용한다; 이 방법은 [Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153]에 기재된 것과 유사하다. 유용한 PILEUP 파라미터는 기본 갭 가중치 3.00, 기본 갭 길이 가중치 0.10, 및 가중 말단 갭을 포함한다.

[0038] 유용한 알고리즘의 또 다른 예는 [Altschul 등, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul 등, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; 및 Karin 등, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787]에 기재된 BLAST 알고리즘이다. 특히 유용한 BLAST 프로그램은 [Altschul 등, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480]에서 입수된 WU-BLAST-2 프로그램이다. WU-BLAST-2는 여러 검색 파라미터를 이용하며, 그 대부분은 기본 값으로 설정된다. 조정 가능한 파라미터는 하기 값으로 설정된다: 중복 범위=1, 중복 분율=0.125, 단어 역치 (T)=11. HSP S 및 HSP S2 파라미터는 동적인 값이며, 관심 서열이 검색되는 특정 데이터베이스의 조성 및 특정 서열의 조성에 따라 프로그램 자체에 의해 구축된다; 그러나 민감성을 증가시키기 위해 값들이 조정될 수 있다.

[0039] 추가로 유용한 알고리즘은 [Altschul 등, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402]에서 보고된 바와 같은 갭화 BLAST이다. 갭화 BLAST는 BLOSUM-62 치환 스코어; 9로 설정된 역치 T 파라미터; 갭화되지 않은 연장을 유도하는 2-히트 방법, 10+k의 코스트로 k의 갭 길이를 설정; 16으로 설정된 X_0 및 데이터베이스 검색 단계에 대해 40으로 설정되고 알고리즘 출력 단계에 대해 67로 설정된 X_g 를 이용한다. 갭화 정렬은 약 22 비트에 해당하는 스

코어에 의해 유도된다.

[0040] 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위 또는 영역이 미리 결정될 수 있지만, 돌연변이 자체가 미리 결정될 필요는 없다. 예를 들어 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 최적화하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 무작위 돌연변이화가 수행되고 원하는 활성의 최적 조합을 위해 스크리닝되는 IL-2 뮤테인이 발현될 수 있다. 공지 서열을 갖는 DNA의 미리 결정된 부위에서 치환 돌연변이를 제조하기 위한 기법, 예를 들어 M13 프라이머 돌연변이화 및 PCR 돌연변이화는 널리 공지되어 있다. 돌연변이체의 스크리닝은, 예를 들어 본원에 기재된 분석을 이용해서 수행될 수 있다.

[0041] 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기의 것이다; 상당히 더 큰 삽입도 관용될 수 있지만, 삽입은 보통 약 하나(1) 내지 약 스무 개(20) 아미노산 잔기 수준일 것이다. 일부 경우 결실은 훨씬 더 클 수 있지만, 결실은 약 하나(1) 내지 약 스무 개(20) 아미노산 잔기 범위이다.

[0042] 최종 유도체 또는 변이체에 도달하기 위해 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 임의 조합이 이용될 수 있다. 일반적으로 이들 변화는 분자, 특히 항원 결합 단백질의 면역원성 및 특이성의 변경을 최소화하기 위해 소수의 아미노산 상에서 수행된다. 그러나 특정 경우에는 더 큰 변화가 관용될 수 있다. 보존적 치환은 일반적으로 표 1에 도시된 하기 표에 따라 수행된다.

[0043] 표 1

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

[0044]

[0045] 기능 또는 면역학적 동일성의 실질적 변화는 표 1에 나타난 것보다 덜 보존적인 치환을 선택하여 수행된다. 예를 들어, 변경 영역 내 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들어 알파-나선 또는 베타-시트 구조; 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성; 또는 측쇄의 부피에 더 크게 영향을 미치는 치환이 수행될 수 있다. 일반적으로 폴리펩티드 특성에 가장 큰 변화를 일으키는 것으로 예상되는 치환은 (a) 친수성 잔기, 예로 세릴 또는 트레오닐이 소수성 잔기, 예로 류실, 이소류실, 페닐알라닌, 발릴 또는 알라닐에 대해(또는 이에 의해) 치환되는 것들; (b) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기에 대해(또는 이에 의해) 치환되는 것들; (c) 양전하 측쇄를 갖는 잔기, 예로 라이실, 아르기닐 또는 히스티딜이 음전하 잔기, 예로 글루탐산 또는 아스파르트산에 대해(또는 이에 의해) 치환되는 것들; 또는 (d) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예로 페닐알라닌이 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예로 글리신에 대해(또는 이에 의해) 치환되는 것들이다.

[0046] 또한 필요에 따라 변이체가 IL-2 뮤테인의 특징을 개질하도록 선택되지만, 변이체는 전형적으로 천연 생성 유사체와 동일한 정성적 생물학적 활성을 나타내고 동일한 면역 반응을 야기할 것이다. 대안적으로, 변이체는 IL-2 뮤테인의 생물학적 활성이 변경되도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 글리코실화 부위가 본원에서 논의되는 바와 같이 변경되거나 제거될 수 있다.

- [0047] 연장된 혈청 반감기를 갖는 IL-2 뮤테인
- [0048] 본원에 제공되는 IL-2 뮤테인은, 예를 들어 Teff 또는 NK 세포에 비해 Treg을 우선적으로 증식시키므로, 환자에게 투여되는 경우 안전성 프로파일의 야생형 IL-2 또는 PROLEUKIN의 프로파일과 다를 것으로 예상된다. 야생형 IL-2 또는 PROLEUKIN과 연관된 부작용에는 독감 유사 증상, 추위/오한, 관절통, 열, 발진, 가려움, 주사 부위 반응, 저혈압, 설사, 오심, 불안, 혼란 및 우울이 포함된다. 본원에 제공된 IL-2 뮤테인은 반감기 연장이 환자에서 부작용 또는 유해 사례의 가능성 또는 강도를 증가시킬 위험의 증가 없이 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 분자를 포함하거나 이에 융합되도록 변경될 수 있다. 이러한 혈청 반감기가 연장된 뮤테인의 피하 투여는 더 낮은 전신 최대 노출(C_{max})과 함께 연장된 표적 커버를 허용할 수 있다. 연장된 혈청 반감기는 뮤테인의 더 낮거나 덜 빈번한 투여 방식을 허용할 수 있다.
- [0049] 본원에 제공된 IL-2 뮤테인의 혈청 반감기는 본질적으로 당분야에 공지된 임의의 방법에 의해 연장될 수 있다. 이러한 방법에는 신생아 Fc γ 수용체에 결합하거나 연장된 혈청 반감기를 갖는 단백질, 예로 IgG 또는 인간 혈청 알부민에 결합하는 펩티드를 포함하기 위한 IL-2 뮤테인 서열의 변경이 포함된다. 다른 구현예에서, IL-2 뮤테인은 융합 분자 상에서 연장된 반감기를 부여하는 폴리펩티드에 융합된다. 이러한 폴리펩티드에는 신생아 Fc γ 수용체, 인간 혈청 알부민에 결합하는 IgG Fc 또는 다른 폴리펩티드, 또는 연장된 혈청 반감기를 갖는 단백질에 결합하는 폴리펩티드가 포함된다. 바람직한 구현예에서, IL-2 뮤테인은 IgG Fc 분자에 융합된다.
- [0050] IL-2 뮤테인은 IgG Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 실시예에서 나타난 바와 같이, IgG Fc 영역의 C-말단에 대한 융합은 IgG Fc의 N-말단에 융합되는 경우보다 훨씬 더 큰 정도로 IL-2 뮤테인 활성을 유지한다.
- [0051] 본 발명의 하나의 구현예는 IL-2 뮤테인을 항체의 Fc 영역에 융합하여 생성되는 두 Fc-융합 폴리펩티드를 포함하는 이량체에 대한 것이다. 이량체는, 예를 들어 융합 단백질을 인코딩하는 유전자 융합물을 적절한 발현 벡터 내로 삽입하고, 유전자 융합물을 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포에서 발현하고, 발현된 융합 단백질이 훨씬 더 항체 분자와 유사하게 조립될 수 있도록 하여 제조될 수 있고, 이 때 Fc 모이어터 간에 사슬간 결합을 형성하여 이량체를 생성한다.
- [0052] 본원에서 이용되는 용어 "Fc 폴리펩티드" 또는 "Fc 영역"에는 항체의 Fc 영역에서 유래되는 폴리펩티드의 천연 및 뮤테인 형태가 포함된다. 이량체화를 촉진하는 힌지 영역을 함유하는 이러한 폴리펩티드의 절단된 형태도 포함된다. 특정 구현예에서, Fc 영역은 항체 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 연장된 혈청 반감기와 더불어, Fc 모이어터를 포함하는 융합 단백질(및 이로부터 형성되는 올리고머)은 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼에 비해 친화도 크로마토그래피에 의한 용이한 정제의 장점을 제공한다. 바람직한 Fc 영역은 인간 IgG로부터 유래되며, 여기에는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4가 포함된다. 여기서, Fc 내의 특정 잔기는 위치에 의해 확인된다. 모든 Fc 위치는 EU 번호지정 방식에 기반한다.
- [0053] 항체의 Fc 부분의 하나의 기능은 항체가 그 표적에 결합하는 경우, 면역계와 커뮤니케이션하는 것이다. 이는 "효과기 기능"으로 간주된다. 커뮤니케이션은 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC), 항체-의존적 세포성 포식 작용(ADCP), 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)으로 이어진다. ADCC 및 ADCP는 Fc의 면역계의 세포 표면 상 Fc 수용체에 대한 결합을 통해 매개된다. CDC는 Fc와 보체 시스템의 단백질, 예로 C1q의 결합을 통해 매개된다.
- [0054] IgG 서브클래스는 효과기 기능을 매개하는데 있어 이들의 능력이 다양하다. 예를 들어, IgG1은 ADCC 및 CDC의 매개에 있어 IgG2 및 IgG4보다 훨씬 더 우수하다. 따라서 효과기 기능이 바람직하지 못한 구현예에서, IgG2 Fc가 바람직할 것이다. 그러나 IgG2 Fc-함유 분자는 제조하기 더 어렵고, 덜 선호되는 생물리학적 특성, 예컨대 IgG1 Fc-함유 분자에 비해 더 짧은 반감기를 갖는 것으로 알려져 있다.
- [0055] 항체의 효과기 기능은 하나 이상의 돌연변이를 Fc 내로 도입하여 증가되거나 감소될 수 있다. 본 발명의 구현예에는 효과기 기능을 증가시키도록 조작된 Fc를 갖는 IL-2 뮤테인 Fc 융합 단백질이 포함된다(U.S. 7,317,091 및 Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009; 둘 다 본원에 그 전문이 참조로 도입됨). 증가된 효과기 기능을 갖는 예시적인 IgG1 Fc 분자에는 하기 치환을 갖는 것들이 포함된다:
- [0056] S239D/I332E
- [0057] S239D/A330S/I332E

- [0058] S239D/A330L/I332E
- [0059] S298A/D333A/K334A
- [0060] P247I/A339D
- [0061] P247I/A339Q
- [0062] D280H/K290S
- [0063] D280H/K290S/S298D
- [0064] D280H/K290S/S298V
- [0065] F243L/R292P/Y300L
- [0066] F243L/R292P/Y300L/P396L
- [0067] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
- [0068] G236A/S239D/I332E
- [0069] K326A/E333A
- [0070] K326W/E333S
- [0071] K290E/S298G/T299A
- [0072] K290N/S298G/T299A
- [0073] K290E/S298G/T299A/K326E
- [0074] K290N/S298G/T299A/K326E
- [0075] IgG Fc-함유 단백질의 효과기 기능을 증가시키는 또 다른 방법은 Fc의 푸코실화 감소에 의한다. Fc에 부착된 2 축성 복합체 유형 올리고당류로부터의 코어 푸코오스의 제거는 항원 결합 또는 CDC 효과기 기능의 변경 없이 ADCC 효과기 기능을 크게 증가시켰다. Fc-함유 분자, 예로 항체의 푸코실화를 감소시키거나 없애기 위한 몇몇 방식이 공지되어 있다. 이들에에는 FUT8 녹아웃 세포주, 변이체 CHO 세포주 Lec13, 래트 하이브리도마 세포주 YB2/0, 특히 FUT8 유전자에 대한 소 방해 RNA를 포함하는 세포주 및 β -1,4-N-아세틸글루코오스아미닐전달효소 III 및 골지 α -만노시다아제 II를 공동 발현하는 세포주를 포함하는 특정 포유류 세포주에서의 재조합 발현이 포함된다. 대안적으로, Fc-함유 분자는 비포유류 세포, 예컨대 식물 세포, 효모 또는 원핵 세포, 예로 대장균에서 발현될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 바람직한 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 효과기 기능을 감소시키도록 조작된 Fc를 포함한다. 감소된 효과기 기능을 갖는 예시적인 Fc 분자에는 하기 치환을 갖는 것들이 포함된다:
- [0077] N297A 또는 N297Q(IgG1)
- [0078] L234A/L235A(IgG1)
- [0079] V234A/G237A(IgG2)
- [0080] L235A/G237A/E318A(IgG4)
- [0081] H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2)
- [0082] C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1)
- [0083] C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1)
- [0084] L234F/L235E/P331S(IgG1)
- [0085] S267E/L328F(IgG1)
- [0086] 인간 IgG1은 N297(EU 번호지정 시스템)에 글리코실화 부위를 가지며, 글리코실화가 IgG1 항체의 효과기 기능에 기여하는 것으로 알려져 있다. 예시적인 IgG1 서열이 서열 목록 번호 3에 제공된다. 비글리코실화 항체를 제조하기 위한 시도로 균들의 N297을 돌연변이시켰다. 돌연변이는 N297을 물리화학적 성질이 아스파라긴과 유사

한 아미노산, 예컨대 글루타민(N297Q)으로 또는 극성기가 없이 아스파라긴을 모사하는 알라닌(N297A)으로 치환하는데 초점을 맞췄다.

[0087] 본원에서 이용되는 "비글리코실화 항체" 또는 "비글리코실화 fc"란 Fc의 위치 297에서 잔기의 글리코실화 상태를 나타낸다. 항체 또는 다른 분자가 하나 이상의 다른 위치에서 글리코실화를 함유할 수 있지만, 여전히 비글리코실화 항체 또는 비글리코실화 Fc-융합 단백질로 간주될 수 있다.

[0088] 효과기 기능이 없는 IgG1 Fc를 제조하기 위한 본 출원인의 시도에서, 인간 IgG1의 아미노산 N297의 글리신으로의 돌연변이, 즉 N297G가 상기 잔기에서 다른 아미노산 치환에 비해 훨씬 더 우수한 정제 효율 및 생물리학적 특성을 제공함을 발견하였다. 실시예 8을 참고하라. 따라서 바람직한 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 N297G 치환을 갖는 인간 IgG1 Fc를 포함한다. N297G 치환을 포함하는 Fc는 분자가 인간 IgG1 Fc를 포함하는 모든 맥락에서 유용하며, IL-2 뮤테인 Fc-융합물 맥락에서의 이용에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 항체는 N297G 치환을 갖는 Fc를 포함한다.

[0089] N297G 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc를 포함하는 Fc는 또한 추가 삽입, 결실, 및 치환을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 IgG1 Fc는 N297G 치환을 포함하며, 서열 목록 번호 3에 나타난 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한, 적어도 91% 동일한, 적어도 92% 동일한, 적어도 93% 동일한, 적어도 94% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 96% 동일한, 적어도 97% 동일한, 적어도 98% 동일한, 또는 적어도 99% 동일한 것이다. 특히 바람직한 구현예에서, C-말단 라이신 잔기가 치환되거나 결실된다. N297G 치환 및 C-말단 라이신의 결실을 포함하는 인간 IgG1의 아미노산 서열을 서열 목록 번호 4에 나타낸다.

[0090] 비글리코실화 IgG1 Fc-함유 분자는 글리코실화 IgG1 Fc-함유 분자에 비해 덜 안정한 것으로 나타났다. Fc 영역이 비글리코실화 분자의 안정성을 증가시키기 위해 추가 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 아미노산이 이량체 상태에서 디설피드 결합을 형성하기 위해 시스테인으로 치환된다. 서열 목록 번호 3에 나타난 아미노산 서열의 잔기 V259, A287, R292, V302, L306, V323, 또는 I332가 시스테인으로 치환될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 구체적인 잔기 페어는 이들이 우선적으로 서로 디설피드 결합을 형성하여 디설피드 결합의 뒤섞임을 제한하거나 방지하도록 치환된다. 바람직한 페어에는 비제한적으로 A287C 및 L306C, V259C 및 L306C, R292C 및 V302C, 및 V323C 및 I332C가 포함된다.

[0091] 하나 이상의 잔기 V259, A287, R292, V302, L306, V323, 또는 I332가 시스테인으로 치환되는 Fc-함유 분자가 본원에 제공된다. 바람직한 Fc-함유 분자에는 A287C 및 L306C, V259C 및 L306C, R292C 및 V302C, 또는 V323C 및 I332C 치환을 포함하는 것들이 포함된다.

[0092] 예시적인 Fc-함유 분자는 하기를 포함한다:

[0093] N297G, A287C, L306C 치환 및 C-말단 K의 결실을 갖는 인간 IgG1 Fc

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGFEVHNCKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

[0094]

EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0095]

(서열 목록 번호 39)

[0096]

[0097] N297G, V259C, L306C 치환 및 C-말단 K의 결실을 갖는 인간 IgG1 Fc

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGFEVHNCKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

[0098]

EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0099]

(서열 목록 번호 40)

[0100]

[0101] N297G, R292C, V302C 치환 및 C-말단 K의 결실을 갖는 인간 IgG1 Fc

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGFEVHNCKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

[0102]

EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0103]

- [0104] (서열 목록 번호 41)
- [0105] N297G, A287C, L306C 치환을 갖는 인간 IgG1 Fc
- [0106] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
- [0107] EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0108] (서열 목록 번호 42)
- [0109] N297G, V259C, L306C 치환을 갖는 인간 IgG1 Fc
- [0110] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
- [0111] EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0112] (서열 목록 번호 43)
- [0113] N297G, R292C, V302C 치환을 갖는 인간 IgG1 Fc
- [0114] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPREEQYGST
YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
- [0115] EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0116] (서열 목록 번호 44)
- [0117] IgG1 Fc에 제조될 수 있는 추가 돌연변이에는 Fc-함유 폴리펩티드 가운데 이종이량체 형성을 촉진하는 것들이 포함된다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 세포에서 공동 발현되는 경우 두 상이한 Fc-함유 폴리펩티드쇄의 이종이량체 형성을 촉진하는 "마디" 및 "구멍"을 생성하도록 조작된다. U.S. 7,695,963. 다른 구현예에서, Fc 영역은 세포에서 공동 발현되는 경우 두 상이한 Fc-함유 폴리펩티드의 동종이량체 형성을 억제하면서 이종이량체 형성을 권장하는 정전기적 스티어링을 이용하도록 변경된다. WO 09/089,004는 본원에 그 전문이 참조로 도입된다. 바람직한 이종이량체 Fc에는 Fc의 하나의 사슬이 D399K 및 E356K 치환을 포함하고 Fc의 다른 사슬이 K409D 및 K392D 치환을 포함하는 것들이 포함된다. 다른 구현예에서, Fc의 하나의 사슬은 D399K, E356K, 및 E357K 치환을 포함하며 Fc의 다른 사슬은 K409D, K392D, 및 K370D 치환을 포함한다.
- [0118] 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 단량체성인 것이, 즉 단일 IL-2 뮤테인 분자만 함유하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 구현예에서, 융합 단백질의 Fc-영역은 이종이량체 형성을 촉진하는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 융합 단백질은 IL-2 뮤테인 Fc-융합 폴리펩티드에서 상호 돌연변이를 갖지만 IL-2 뮤테인이 없는 Fc-영역과 공동 발현된다. 두 Fc-함유 폴리펩티드의 이종이량체가 형성되는 경우, 생성 단백질은 단일 IL-2 뮤테인만을 포함한다.
- [0119] 단량체성 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 생성하는 또 다른 방법은 IL-2 뮤테인을 단량체성 Fc, 즉 이량체화하지 않는 Fc에 융합하는 것이다. 안정한 단량체성 Fc는 이량체화를 억제하고 분자를 단량체 형태로 안정화하는 돌연변이를 포함한다. 바람직한 단량체성 Fc가 WO 2011/063348에 개시되며, 그 전문이 본원에 참조로 도입된다. 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc 융합 단백질은 Y349, L351, L368, V397, L398, F405, 또는 Y407에서의 트레오닌 치환과 함께 위치 392 및 409에 음으로 하전된 아미노산을 포함하는 Fc를 포함한다.
- [0120] 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 Fc 및 IL-2 뮤테인 간에 링커를 포함한다. 여러 상이한 링커 폴리펩티드가 당분야에 공지되어 있으며, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 맥락에서 이용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 Fc 및 the IL-2 뮤테인 간에 GGGGS(서열 목록 번호 5), GGNGT(서열 목록 번호 6), 또는 YGNGT(서열 목록 번호 7)로 구성된 펩티드의 하나 이상의 사본을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역 및 IL-2 뮤테인 영역 간 폴리펩티드 영역은 GGGGS(서열 목록 번호 5), GGNGT(서열 목록 번호 6), 또는 YGNGT(서열 목록 번호 7)의 단일 사본을 포함한다. 본원에 나타낸 바와 같이, 링커 GGNGT(서열 목록 번호 6) 또는 YGNGT(서열 목록 번호 7)는 적절한 세포에서 발현되는 경우 글리코실화되며, 이러한 글리코실화는 용액 중에서 및/또는 생체내 투여되는 경우 단백질의 안정화를 도울 수 있다. 따라서 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 융합 단백질은 Fc 영역 및 IL-2 뮤테인 영역 간에 글리코실화 링커를 포함한다.

- [0121] 글리코실화 링커가 폴리펩티드 맥락에 놓이는 경우 유용할 수 있음이 고려된다. 폴리펩티드의 아미노산 서열 내로 삽입된 GGNGT(서열 목록 번호 6) 또는 YNGGT(서열 목록 번호 7)를 포함하거나 폴리펩티드의 아미노산 서열 내에서 하나 이상의 아미노산을 대체하는 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 바람직한 구현예에서, GGNGT(서열 목록 번호 6) 또는 YNGGT(서열 목록 번호 7)는 폴리펩티드 3차 구조의 루프 내로 삽입된다. 다른 구현예에서, 루프의 하나 이상의 아미노산은 GGNGT(서열 목록 번호 6) 또는 YNGGT(서열 목록 번호 7)로 대체된다.
- [0122] Fc의 C-말단부 및/또는 IL-2 뮤테인의 아미노 말단부는 포유류 세포에서 발현되는 경우 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 글리코실화 프로필을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인은 T3 치환, 예로 T3N 또는 T3A를 추가로 포함한다. IL-2 뮤테인은 S5 치환, 예컨대 S5T를 추가로 포함할 수 있다.
- [0123] IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 공유 개질은 본 발명의 범위 내에 포함되며, 항상은 아니지만 일반적으로 번역 후 수행된다. 예를 들어, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 몇몇 유형의 공유 개질은 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 특정 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시켜 분자 내로 도입된다.
- [0124] 시스테인 잔기는 가장 일반적으로 α-할로아세이트(및 대응 아민), 예컨대 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 반응하여 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테인 잔기는 또한 브로모트리플루오로아세톤, α-브로모-β-(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설피드, 메틸 2-피리딜 디설피드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 유도체화된다.
- [0125] 히스티딜 잔기는 pH 5.5-7.0에서 디에틸피로카르보네이트와의 반응에 의해, 상기 제제가 히스티딜 측쇄에 대해 비교적 특이적이므로 유도체화된다. 파라-브로모펜아실 브로마이드도 유용하다; 반응은 바람직하게는 pH 6.0에서 0.1M 나트륨 카코딜레이트 중에 수행된다.
- [0126] 라이시닐 및 아미노 말단 잔기는 숙신산 또는 다른 카르복실산 무수물과 반응시킨다. 이들 제제를 이용한 유도체화는 라이시닐 잔기의 전하를 역전시키는 효과를 갖는다. 알파-아미노-함유 잔기의 유도체화를 위해 적합한 다른 시약에는 이미도에스테르, 예컨대 메틸 피콜린이미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로히드라이드; 트리니트로벤젠설포산; 0-메틸이소우레아; 2,4-펜탄디온; 및 글리옥살레이트와의 트랜스아미나아제-촉매 반응이 포함된다.
- [0127] 아르기닐 잔기는 하나 또는 몇몇 통상적 시약과의 반응에 의해 개질되며, 이들 중에는 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온 및 닌히드린이 있다. 아르기닐 잔기의 유도체화는 구아니딘 작용기의 높은 pKa로 인해 반응이 알칼리성 조건에서 수행될 것을 필요로 한다. 또한 이들 시약은 아르기닌 엡실론-아미노기뿐만 아니라 라이신의 기와도 반응할 수 있다.
- [0128] 티로실 잔기의 특이적 개질, 특히 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼 표지를 티로실 잔기 내로 도입하는데 관심을 가지고 제조될 수 있다. 가장 일반적으로, N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄을 이용하여 0-아세틸 티로실종 및 3-니트로 유도체를 각각 형성한다. 티로실 잔기는 방사선면역분석에서의 이용을 위한 표지 단백질을 제조하기 위해 ¹²⁵I 또는 ¹³¹I를 이용하여 요오드화되며, 상술된 클로라민 T 방법이 적합하다.
- [0129] 카르복실 측쇄기(아스파르트산 또는 글루탐산)는 카르보디이미드(R'-N=C=N-R')와의 반응에 의해 선택적으로 개질되며, 여기서 R 및 R'은 선택적으로 상이한 알킬기, 예컨대 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸)카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카르보디이미드이다. 또한, 아스파르트산 및 글루탐산 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.
- [0130] 이관능성 제제를 이용한 유도체화는 항원 결합 단백질을 다양한 방법에서 이용하기 위한 수불용성 지지체 기질 또는 표면으로 가교하는데 유용하다. 일반적으로 이용되는 가교제에는, 예로 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산과의 에스테르, 디숙신이미드 에스테르를 포함하는 동종이관능성 이미도에스테르, 예컨대 3,3'-디티오비스(숙신이미드)프로피오네이트 및 이관능성 말레이미드, 예컨대 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄이 포함된다. 유도체화제, 예컨대 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트는 빛의 존재 하에 가교를 형성할 수 있는 광활성화 가능한 중간체를 생성한다. 대안적으로 반응성 수불용성 기질, 예컨대 시아노겐 브로마이드-활성화 탄수화물 및 U.S. 특허 번호 3,969,287;

3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 및 4,330,440에 기재된 반응성 기질이 단백질 고정화를 위해 채용된다.

[0131] 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기는 빈번하게 대응하는 글루탐산 및 아스파르트산 잔기로 각각 탈아미드화된다. 대안적으로, 이들 잔기는 온화한 산성 조건 하에 탈아미드화된다. 이들 잔기의 어느 형태도 본 발명의 범위에 속한다.

[0132] 다른 개질에는 프롤린 및 라이신의 히드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 히드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 α -아미노기의 메틸화(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복실기의 아미드화가 포함된다.

[0133] 본 발명의 범위 내에 포함되는 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 또 다른 유형의 공유 개질은 단백질의 글리코실화 패턴의 변경을 포함한다. 당분야에 공지된 바와 같이, 글리코실화 패턴은 단백질의 서열(예로, 아래 논의되는 특정 글리코실화 아미노산 잔기의 존재 또는 부재), 또는 단백질이 생산되는 숙주 세포 또는 개체 모두에 의존할 수 있다. 구체적 발현 시스템이 아래에 논의된다.

[0134] 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연관되거나 O-연관된다. N-연관이란 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 나타낸다. 3-펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린 이외의 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서 폴리펩티드 내에 어느 한 이들 3-펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연관된 글리코실화란 당 N-아세틸갈락토스아민, 갈락토오스 또는 자일로오스 중 하나의 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 대한 부착을 나타내지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신의 도 이용될 수 있다.

[0135] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질에 대한 글리코실화 부위의 부가는 하나 이상의 상술된 3-펩티드 서열을 함유하도록(N-연관된 글리코실화 부위에 대해) 아미노산 서열을 변경하여 편리하게 달성될 수 있다. 변경은 또한 시작 서열에 대해 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해(O-연관된 글리코실화 부위에 대해) 제조될 수 있다. 용이성을 위해, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 아미노산 서열은 바람직하게는 DNA 수준의 변화를 통해, 특히 원하는 아미노산으로 번역될 코돈이 생성되도록 미리 선택된 염기에서 표적 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA의 돌연변이화에 의해 변경된다.

[0136] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 상에서 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 단백질에 대한 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 이들 절차는 N- 및 O-연관된 글리코실화에 대해 글리코실화능을 갖는 숙주 세포에서의 단백질 생산을 필요로 하지 않는다는 점에서 유리하다. 이용되는 커플링 방식에 따라, 당(들이) (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 자유 카르복실기, (c) 자유 설프히드릴기, 예컨대 시스테인의 자유 설프히드릴기, (d) 자유 히드록실기, 예컨대 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린의 자유 히드록실기, (e) 방향족 잔기, 예컨대 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 방향족 잔기, 또는 (f) 글루탐산의 아미드기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 [WO 87/05330, 1987. 9. 11. 공개, 및 Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306]에 기재되어 있다.

[0137] 시작 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 상에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 화합물 트리플루오로메탄설포산 또는 동등 화합물에 대한 단백질의 노출을 필요로 한다. 상기 처리는 폴리펩티드는 온전하게 놔두면서 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분의 또는 모든 당의 절단을 일으킨다. 화학적 탈글리코실화는 [Hakimuddin 등, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 및 Edge 등, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131]에 기재된다. 폴리펩티드 상 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 [Thotakura 등, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350]에 기재된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다아제의 이용에 의해 달성될 수 있다. 잠재적 글리코실화 부위에서의 글리코실화는 [Duskin 등, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105]에 기재된 바와 같이 화합물 투니카마이신의 이용에 의해 방지될 수 있다. 투니카마이신은 단백질-N-글리코시드 결합의 형성을 차단한다.

[0138] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 다른 유형의 공유 개질은 비제한적으로 U.S. 특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 나타난 방식으로 다양한 폴리올, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌을 포함하는 다양한 비단백질성 중합체에 대한 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 연결을 포함한다. 또한, 아미노산 치환은 중합체, 예컨대

대 PEG의 부가를 촉진하기 위해 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 내의 다양한 위치에서 수행될 수 있다. 따라서 본 발명의 구현예에는 PEG화 IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 포함된다. 이러한 PEG화 단백질은 비-PEG화 단백질에 비해 증가된 반감기 및/또는 감소된 면역원성을 가질 수 있다.

[0139] IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드

[0140] IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 핵산이 본 발명 내에 포함된다. 본 발명의 측면에는 본원에 기재된 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 변이체(예, 축퇴로 인해)가 포함된다. 바람직한 구현예에서, 단리된 핵산에 의해 인코딩되는 폴리펩티드는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 성분이다.

[0141] 핵산 서열의 단리를 위한 탐침 또는 프라이머로서 또는 데이터베이스 검색을 위한 쿼리 서열로서 이용될 본원에 기재된 아미노산 서열에 대응하는 뉴클레오티드 서열이 아미노산 서열로부터 "역-번역"에 의해 획득될 수 있다. 널리 공지된 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR) 절차가 IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 단리하고 증폭하기 위해 채용될 수 있다. DNA 단편 조합의 원하는 말단을 정의하는 올리고뉴클레오티드가 5' 및 3' 프라이머로 채용된다. 올리고뉴클레오티드는 발현 벡터 내로 DNA 단편의 증폭된 조합의 삽입을 촉진하기 위해 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 추가로 함유할 수 있다. PCR 기법은 [Saiki 등, *Science* 239:487(1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu 등, eds., Academic Press, Inc., San Diego(1989), pp. 189-196; 및 *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc.(1990)]에 기재되어 있다.

[0142] 본 발명의 핵산 분자에는 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. "단리된 핵산"은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오티드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산임이 이해된다. 단리된 핵산 분자는 별도 단편의 형태인 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 하나의 바람직한 구현예에서, 핵산에는 실질적으로 내인성 오염 물질이 없다. 핵산 분자는 바람직하게는 실질적으로 순수한 형태로 그리고 표준 생화학 방법(예컨대 Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1989)에 개요됨)에 의해 그 성분 뉴클레오티드 서열의 확인, 조작 및 회수를 가능케 하는 양 또는 농도로 적어도 1회 단리된 DNA 또는 RNA로부터 유도되었다. 이러한 서열은 바람직하게는 내부 비번역 서열 또는 전형적으로 진핵생물 유전자에 존재하는 인트론에 의해 단속되지 않는 개방 해독틀의 형태로 제공되고 및/또는 구축된다. 비번역 DNA 서열은 개방 해독틀로부터 5' 또는 3'에 존재할 수 있고, 코딩 영역의 조작 또는 발현을 방해하지 않는다.

[0143] 본 발명에 따른 변이체는 보통 당분야에 널리 공지된 카세트 또는 PCR 돌연변이화 또는 다른 기법을 이용하여 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 DNA에서 뉴클레오티드의 부위 특이적 돌연변이화에 의해 제조되어 변이체를 인코딩하는 DNA를 생산한 뒤 본원에 개요된 바와 같이 세포 배양 중 재조합 DNA를 발현한다. 그러나, IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합물은 구축된 기법을 이용하여 시험관내 합성에 의해 제조될 수 있다. 변이체는 전형적으로 천연 생성 유사체와 동일한 정성적 생물학적 활성, 예로 Treg 증식을 나타내지만, 아래에 보다 상세히 요약될 바와 같이 개질된 특징을 갖는 변이체도 선택될 수 있다.

[0144] 당업자에 의해 이해될 바와 같이, 유전 코드의 축퇴로 인해 매우 많은 수의 핵산이 제조될 수 있고, 이들 전부는 본 발명의 IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩한다. 따라서 특정 아미노산 서열을 확인하여, 당분야 숙련가는 인코딩된 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 방식으로 하나 이상의 코돈 서열을 단순 개질하여 임의의 수의 상이한 핵산을 제조할 수 있다.

[0145] 본 발명은 또한 상술된 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 발현 시스템 및 구축물을 제공한다. 또한, 본 발명은 이러한 발현 시스템 또는 구축물을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0146] 전형적으로, 임의의 숙주 세포에서 이용되는 발현 벡터는 플라스미드 유지를 위한 그리고 외인성 뉴클레오티드 서열의 클로닝 및 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 특정 구현예에서, 종합적으로 "인접 서열"로 불리는 이러한 서열에는 전형적으로 하나 이상의 하기 뉴클레오티드 서열이 포함될 것이다: 프로모터, 하나 이상의 인핸서 서열, 복제 기원, 전사 종료 서열, 공여체 및 수신체 슬라이스 부위를 함유하는 전체 인트론 서열, 폴리펩티드 분비를 위한 리더 서열을 인코딩하는 서열, 리보솜 결합 서열, 폴리아데닐화 서열, 발현될 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 영역, 및 선택 가능한 마커 요소. 각각의 이들 서열이 아래에서 논의

된다.

- [0147] 선택적으로, 벡터는 "태그"-인코딩 서열, 즉 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질 코딩 서열의 5' 또는 3' 말단에 배치된 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유할 수 있으며; 이 올리고뉴클레오타이드 서열은 폴리His(예컨대 hexaHis(서열 목록 번호 21)), 또는 상업적으로 이용 가능한 항체가 존재하는 또 다른 "태그", 예컨대 FLAG, HA(헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스), 또는 *myc*을 인코딩한다. 상기 태그는 전형적으로 폴리펩티드의 발현 시 폴리펩티드에 융합되며, 숙주 세포로부터 IL-2 뮤테인의 친화도 정제 또는 검출을 위한 수단으로 작용할 수 있다. 친화도 정제는, 예를 들어 친화도 기질과 같이 태그에 대한 항체를 이용하는 칼럼 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 선택적으로, 태그는 이후 다양한 수단, 예컨대 특정한 절단용 펩티다아제에 의해 정제된 IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질로부터 제거될 수 있다.
- [0148] 인접 서열은 상동성(즉, 숙주 세포와 동일한 종 및/또는 계통 유래), 이종성(즉, 숙주 세포와 다른 종 및/또는 계통 유래), 하이브리드(즉, 둘 이상의 원천으로부터의 인접 서열의 조합), 합성 또는 천연의 것일 수 있다. 이와 같이, 인접 서열이 숙주 세포 기전에서 기능적이며 이에 의해 활성화될 수 있는 한, 인접 서열의 원천은 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 개체, 임의의 척추동물 또는 무척추동물 개체, 또는 임의의 식물일 수 있다.
- [0149] 본 발명의 벡터에서 유용한 인접 서열은 당분야에 널리 공지된 임의의 몇몇 방법에 의해 수득될 수 있다. 전형적으로, 본원에서 유용한 인접 서열은 맵핑에 의해 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 이전에 확인되었을 것이며, 이에 따라 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 이용해서 적절한 조직 원천으로부터 단리될 수 있다. 일부 경우, 인접 서열의 전체 뉴클레오타이드 서열이 공지되어 있을 수 있다. 여기서, 인접 서열은 핵산 합성 또는 클로닝을 위해 본원에 기재된 방법을 이용하여 합성될 수 있다.
- [0150] 인접 서열의 전부 또는 일부가 공지된 경우, 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)을 이용해서 및/또는 적합한 탐침, 예컨대 동일하거나 다른 종으로부터의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 인접 서열 단편을 이용한 게놈 라이브러리의 스크리닝에 의해 수득될 수 있다. 인접 서열이 알려져 있지 않은 경우, 인접 서열을 함유하는 DNA 단편은, 예를 들어 코딩 서열 또는 심지어 다른 유전자 또는 유전자들을 함유할 수 있는 더 큰 DNA 조각으로부터 단리될 수 있다. 단리는 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 달성되어 적절한 DNA 단편을 생산한 뒤 아가로오스 겔 정제, Qiagen[®] 칼럼 크로마토그래피(Chatsworth, CA), 또는 다른 당분야 숙련자에게 공지된 다른 방법을 이용해 단리될 수 있다. 상기 목적을 달성하기 위한 적합한 효소의 선택은 당업자에게 쉽게 자명할 것이다.
- [0151] 복제 기원은 전형적으로 상업적으로 구매되는 원핵생물 발현 벡터의 일부이며, 이 기원은 숙주 세포 내 벡터의 증폭을 보조한다. 선택 벡터가 복제 기원 부위를 함유하지 않는 경우, 공지된 서열에 기반하여 화학적으로 합성되고 벡터 내로 결합될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 pBR322(New England Biolabs, Beverly, MA)로부터의 복제 기원은 대부분의 그램 음성 박테리아에 대해 적합하며 다양한 바이러스 기원(예, SV40, 폴리오마, 아테노바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 또는 파필로마바이러스, 예컨대 HPV 또는 BPV)이 포유류 세포에서 클로닝 벡터에 대해 유용하다. 일반적으로, 복제 기원 성분은 포유류 발현 벡터에 있어서는 필요하지 않다(예를 들어, SV40 기원은 단지 이것이 바이러스 초기 프로모터도 함유하기 때문에 종종 이용된다).
- [0152] 전사 종료 서열은 전형적으로 폴리펩티드 코딩 영역의 말단에 대해 3'에 위치하며 전사를 종료시키는 작용을 한다. 보통, 원핵생물 세포에서의 전사 종료 서열은 G-C 풍부 단편에 폴리-T 서열이 뒤따른다. 서열이 라이브러리로부터 쉽게 클로닝되거나 심지어 벡터의 일부로 상업적으로 구매되지만, 또한 핵산 합성을 위한 방법, 예컨대 본원에 기재된 것들을 이용해서 쉽게 합성될 수 있다.
- [0153] 선택 가능한 마커 유전자는 선택 배양 배지에서 키운 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 인코딩한다. 전형적인 선택 마커 유전자는 (a) 원핵생물 숙주 세포에 대해 항생제 또는 다른 독소, 예로 앰피실린, 테트라사이클린 또는 카나마이신에 대한 내성을 부여하는; (b) 세포의 영양요구 결핍을 보완하는; 또는 (c) 복합 또는 한정된 배지에서 이용 불가능한 필수 영양소를 공급하는 단백질을 인코딩한다. 구체적인 선택 가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 앰피실린 내성 유전자 및 테트라사이클린 내성 유전자이다. 유리하게는, 네오마이신 내성 유전자가 또한 원핵생물 및 진핵생물 숙주 세포 모두에서 선택을 위해 이용될 수 있다.
- [0154] 다른 선택 가능한 유전자가 발현될 유전자를 증폭하기 위해 이용될 수 있다. 증폭은 성장 또는 세포 생존에 중추적인 단백질의 생산을 위해 필요한 유전자가 재조합 세포의 후속 세대 염색체 내에서 일렬로 반복되는 절차이다. 포유류 세포에 대해 적합한 선택 가능한 마커의 예에는 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR) 및 프로모터가 없는 티미딘 키나아제 유전자가 포함된다. 포유류 세포 형질전환체는 형질전환체만 벡터에 존재하는 선택 가능한 유전자 덕에 유일하게 생존하기 적합한 선택 압력 하에 놓인다. 배지 중 선택 제제의 농도가 연속적으로 증

가되어 선택 가능한 유전자 및 또 다른 유전자, 예컨대 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 DNA 모두의 증폭으로 이어지는 조건 하에 형질전환된 세포를 배양하여 선택 압력이 부과된다. 그 결과, 증가된 양의 폴리펩티드, 예컨대 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 증폭된 DNA로부터 합성된다.

[0155] 리보솜 결합 부위는 보통 mRNA의 전사 개시를 위해 필요하며, 샤인 달가노 서열(원핵생물) 또는 코작 서열(진핵생물)을 특징으로 한다. 이 요소는 전형적으로 프로모터의 3' 및 발현될 폴리펩티드의 코딩 서열의 5'에 배치된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 코딩 영역은 내부 리보솜 결합 부위(IRES)에 작동 가능하게 연결되어 단일 RNA 전사체로부터 두 개방 해독틀의 번역을 허용할 수 있다.

[0156] 일부 경우에서, 예컨대 글리코실화가 진핵생물 숙주 세포 발현 시스템에서 바람직한 경우, 글리코실화 또는 수율을 개선하기 위해 다양한 프리- 또는 프로-서열을 조작할 수 있다. 예를 들어, 특정 신호 펩티드의 펩티다아제 절단 부위를 변경하거나 프로서열을 부가할 수 있고, 이는 또한 글리코실화에 영향을 미칠 수 있다. 최종 단백질 산물은 -1 위치(성숙 단백질의 제1 아미노산에 대해)에서 발현에 뒤따르는 하나 이상의 추가 아미노산을 가질 수 있고, 이는 완전히 제거되지 않을 수 있다. 예를 들어, 최종 단백질 산물은 아미노-말단에 부착된 펩티다아제 절단 부위에서 발견되는 1 또는 2 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 대안적으로, 일부 효소 절단 부위의 이용은 효소가 성숙 펩티드 내에서 상기 부위를 절단하는 경우, 원하는 폴리펩티드의 약간 절단된 형태를 생성할 수 있다.

[0157] 본 발명의 발현 및 클로닝 벡터는 전형적으로 숙주 개체에 의해 인식되고 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 분자에 작동 가능하게 연결되는 프로모터를 함유할 것이다. 프로모터는 구조 유전자의 전사를 조절하는 구조 유전자의 출발 코돈에 대해 상류(즉 5')에 위치한(일반적으로 약 100 내지 1000bp 이내) 미전사 서열이다. 프로모터는 편리하게는 하기 두 클래스: 유도성 프로모터 및 항상성 프로모터 중 하나로 구분된다. 유도성 프로모터는 배양 조건에서 일부 변화, 예컨대 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도 변화에 반응하여 이들의 조절 하 DNA로부터의 증가된 수준의 전사를 개시한다. 반면, 항상성 프로모터는 작동 가능하게 연결된 유전자를 일관되게 전사시킨다, 즉 유전자 발현에 대한 조절이 거의 또는 전혀 없다. 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 널리 공지되어 있다.

[0158] 효모 숙주와 이용하기 적합한 프로모터도 당분야에 널리 공지되어 있다. 효모 인핸서는 유리하게는 효모 프로모터와 함께 이용된다. 포유류 숙주 세포와 이용하기 적합한 프로모터는 널리 공지되어 있고, 비제한적으로 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스, 아데노바이러스(예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 가장 바람직하게는 시미안 바이러스 40(SV40)의 게놈에서 수득된 것들이 포함된다. 다른 적합한 포유류 프로모터에는 이중성 포유류 프로모터, 예를 들어 열 충격 프로모터 및 액틴 프로모터가 포함된다.

[0159] 관심 대상이 될 수 있는 추가 프로모터에는 비제한적으로 하기가 포함된다: SV40 조기 프로모터(Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); CMV 프로모터(Thornsen 등, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); 라우스 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복체에 함유된 프로모터(Yamamoto 등, 1980, *Cell* 22:787-797); 헤르페스 티미딘 키나아제 프로모터(Wagner 등, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); 메탈로티오나인 유전자로부터의 프로모터 및 조절 서열(Printer 등, 1982, *Nature* 296:39-42); 및 원핵생물 프로모터, 예컨대 베타-락타마아제 프로모터(Villa-Kamaroff 등, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); 또는 tac 프로모터(DeBoer 등, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). 또한 관심의 대상이 되는 것은 하기 동물 전사 조절 영역으로, 이는 조직 특이성을 나타내며 트랜스제닉 동물에서 이용되었다: 췌장 세엽 세포에서 활성이 있는 엘라스타아제 I 유전자 조절 영역(Swift 등, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz 등, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); 췌장 베타 세포에서 활성이 있는 인슐린 유전자 조절 영역(Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); 림프구 세포에서 활성이 있는 면역글로불린 유전자 조절 영역(Grosschedl 등, 1984, *Cell* 38:647-658; Adames 등, 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander 등, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); 정소, 유방, 림프구 및 비만 세포에서 활성이 있는 마우스 유방암 바이러스 조절 영역(Leder 등, 1986, *Cell* 45:485-495); 간에서 활성이 있는 알부민 유전자 조절 영역(Pinkert 등, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); 간에서 활성이 있는 알파-페토-단백질 유전자 조절 영역(Krumlauf 등, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer 등, 1987, *Science* 253:53-58); 간에서 활성이 있는 알파 1-안티트립신 유전자 조절 영역(Kelsey 등, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); 골수종 세포에서 활성이 있는 베타-글로빈 유전자 조절 영역(Mogram 등, 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias 등, 1986, *Cell* 46:89-94); 뇌의 희소돌기 아교세포에서 활성이 있는 미엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역(Readhead 등, 1987, *Cell* 48:703-712); 골격근에서 활성이 있는 미오신 경계-2 유전자 조절 영역

(Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); 및 시상하부에서 활성이 있는 성선자극 분비 호르몬 유전자 조절 영역 (Mason 등, 1986, *Science* 234:1372-1378).

[0160] 인헨서 서열은 고급 진핵생물에 의해 전사를 증가시키기 위해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 인헨서는 전사를 증가시키기 위해 프로모터 상에 작용하는 약 10-300bp 길이의 DNA 시스 작용 요소이다. 인헨서는 상대적으로 배향 및 위치에 의존하지 않으며, 전사 단위의 5' 및 3' 위치 모두에서 확인되었다. 포유류 유전자에서 이용 가능한 몇몇 인헨서 서열이 공지되어 있다(예, 글로빈, 엘라스타아제, 알부민, 알파-페토-단백질 및 인슐린). 그러나 전형적으로, 바이러스로부터의 인헨서가 이용된다. 당분야에 공지된 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서가 진핵생물 프로모터의 활성화를 위한 예시적 인헨싱 요소이다. 인헨서는 벡터 내에서 코딩 서열의 5' 또는 3'에 배치될 수 있지만, 전형적으로 프로모터로부터 5' 부위에 배치된다. 적절한 천연 또는 이종성 신호 서열(리더 서열 또는 신호 펩티드)을 인코딩하는 서열은 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 세포외 분비를 촉진하기 위해 발현 벡터 내로 도입될 수 있다. 신호 펩티드 또는 리더의 선택은 단백질이 생산될 숙주 세포의 유형에 의존하며, 이종성 신호 서열이 천연 신호 서열을 대체할 수 있다. 포유류 숙주 세포에서 기능적인 신호 펩티드의 예에는 하기가 포함된다: US 특허 번호 4,965,195에 기재된 인터류킨-7(IL-7)에 대한 신호 서열; [Cosman 등, 1984, *Nature* 312:768]에 기재된 인터류킨-2 수용체에 대한 신호 서열; EP 특허 번호 0367 566에 기재된 인터류킨-4 수용체 신호 펩티드; U.S. 특허 번호 4,968,607에 기재된 I형 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드; EP 특허 번호 0 460 846에 기재된 II형 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드.

[0161] 벡터는 벡터가 숙주 세포 계층 내로 통합되는 경우 발현을 촉진하는 하나 이상의 성분을 함유할 수 있다. 예에는 EASE 요소(Aldrich 등 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) 및 기질 부착 영역(MAR)이 포함된다. MAR은 염색질의 구조적 구성을 매개하며, 통합된 벡터를 "위치" 효과로부터 분리할 수 있다. 따라서 MAR은 벡터가 안정한 형질전환체를 생성하기 위해 이용되는 경우 특히 유용하다. 여러 천연 및 합성 MAR-함유 핵산이 당분야에, 예로 U.S. 특허 번호 6,239,328; 7,326,567; 6,177,612; 6,388,066; 6,245,974; 7,259,010; 6,037,525; 7,422,874; 7,129,062에 공지되어 있다.

[0162] 본 발명의 발현 벡터는 출발 벡터, 예컨대 시판 벡터로부터 구축될 수 있다. 이러한 벡터는 원하는 모든 인접 서열을 함유할 수도 함유하지 않을 수도 있다. 본원에 기재된 하나 이상의 인접 서열이 벡터에 이미 존재하지 않는 경우, 이들은 개별적으로 수득되어 벡터 내로 결합될 수 있다. 각 인접 서열을 수득하기 위해 이용되는 방법은 당분야 숙련가에게 널리 공지되어 있다.

[0163] 벡터가 구축되고 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자가 벡터의 적절한 부위 내로 삽입된 후, 완성된 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩티드 발현을 위해 적합한 숙주 세포 내로 삽입될 수 있다. 발현 벡터의 선택된 숙주 세포 내로의 형질전환은 전달감염, 감염, 인산칼슘 공침전, 전기천공, 마이크로주입, 리포펙션, DEAE-덱스트란 매개 전달감염 또는 다른 공지된 기법을 포함하는 널리 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로는 이용될 숙주 세포 유형의 함수일 것이다. 이들 방법 및 다른 적합한 방법은 당분야 숙련가에게 널리 공지되어 있고, 예를 들어 [Sambrook 등, 2001, 상기 문헌]에 나타나 있다.

[0164] 숙주 세포는 적절한 조건 하에 배양되는 경우 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 합성하고, 이후 배양 배지로부터(숙주 세포가 이를 배지 내로 분비하는 경우) 또는 이를 생산하는 숙주 세포로부터 직접(분비하지 않는 경우) 수집될 수 있다. 적절한 숙주 세포의 선택은 다양한 요인, 예컨대 원하는 발현 수준, 활성을 위해 바람직하거나 필요한 폴리펩티드 개질(예컨대 글리코실화 또는 인산화) 및 생물학적 활성 분자로서의 폴딩 용이성에 의존할 것이다. 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물일 수 있다.

[0165] 발현 숙주로 이용 가능한 포유류 세포주는 당분야에 널리 공지되어 있고 비제한적으로 ATCC(American Type Culture Collection)에서 입수 가능한 불멸화 세포주가 포함되며 당분야에 공지된 발현 시스템에서 이용되는 임의의 세포주가 본 발명의 제조할 폴리펩티드를 제조하기 위해 이용될 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포는 원하는 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합물을 인코딩하는 DNA를 포함하는 제조할 발현 벡터로 형질전환된다. 채용될 수 있는 숙주 세포에는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포가 있다. 원핵생물에는 그램 음성 또는 그램 양성 개체, 예컨대 대장균 또는 간균이 포함된다. 고등 진핵생물 세포에는 곤충 세포 및 포유류 기원의 확립된 세포주가 포함된다. 적합한 포유류 숙주 세포주의 예에는 COS-7 원숭이 신장 세포주(ATCC CRL 1651)(Gluzman 등, 1981, *Cell* 23:175), L 세포, 293 세포, C127 세포, 3T3 세포(ATCC CCL 163), 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 이들의 유도체, 예컨대 Veggie CHO 및 무혈청 배지에서 자라는 관련 세포주(Rasmussen 등, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), HeLa 세포, BHK(ATCC CRL 10) 세포주, 및 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포

에서 유래된 CVI/EBNA 세포주(ATCC CCL 70)[McMahan 등, 1991, EMBO J. 10: 2821에 기재됨], 인간 배아 신장 세포, 예컨대 293, 293 EBNA 또는 MSR 293, 인간 표피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 다른 형질전환된 영장류 세포주, 정상 이배체 세포, 일차 조직의 시험관내 배양에서 유래된 세포 계통, 일차 추출물, HL-60, U937, HaK 또는 Jurkat 세포가 포함된다. 선택적으로, 다양한 신호 전달 또는 리포터 분석에서 폴리펩티드를 이용하는 것이 바람직한 경우, 포유류 세포주, 예컨대 HepG2/3B, KB, NIH 3T3 또는 S49가 폴리펩티드의 발현을 위해 이용될 수 있다.

[0166] 대안적으로, 하등 진핵생물, 예컨대 효모 또는 원핵생물, 예컨대 박테리아에서 폴리펩티드를 생산할 수 있다. 적합한 효모에는 사카로마이세스 세레비시애(Saccharomyces cerevisiae), 스킴조사카로마이세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 클루이베로마이세스 계통(Kluyveromyces strain), 칸디다(Candida), 또는 이중성 폴리펩티드를 발현할 수 있는 임의의 효모 계통이 포함된다. 적합한 박테리아 계통에는 대장균, 고초균, 살모넬라 타이피무리움(Salmonella typhimurium), 또는 이중성 폴리펩티드를 발현할 수 있는 임의의 박테리아 계통이 포함된다. 폴리펩티드가 효모 또는 박테리아에서 제조되는 경우, 내부에서 생산되는 폴리펩티드를, 예를 들어 기능적 폴리펩티드를 수득하기 위해 적절한 부위의 인산화 또는 글리코실화에 의해 개질하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 공유 부착은 공지된 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 달성될 수 있다.

[0167] 폴리펩티드는 또한 본 발명의 단리된 핵산을 하나 이상의 곤충 발현 벡터에서 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결하고, 곤충 발현 시스템을 채용하여 생산될 수 있다. 배콜로바이러스/곤충 세포 발현 시스템을 위한 재료 및 방법은, 예로 Invitrogen(San Diego, Calif., U.S.A.)에서 키트 형태(MaxBac® 키트)로 시판되며, 이러한 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다[Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987), 및 Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47(1988)에 기재됨]. 무세포 번역 시스템도 본원에 개시된 핵산 구축물에서 유래된 RNA를 이용해서 폴리펩티드를 생산하기 위해 채용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유류 세포 숙주와 이용하기 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 [Pouwels 등(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985)]에 기재되어 있다. 바람직하게는 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포는 "재조합 숙주 세포"이다.

[0168] 특정 측면에서, 본 발명에는 T 조절 세포를 우선적으로 자극하고 V91K 치환 및 서열 목록 번호 1에 나타난 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 인간 IL-2 뮤테인을 인코딩하는 단리된 핵산이 포함된다. 단리된 핵산은 본원에 제공된 임의의 예시적 IL-2 뮤테인을 인코딩할 수 있다.

[0169] 본원에 기재된 임의의 예시적 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 단리된 핵산이 또한 포함된다. 바람직한 구현예에서, 항체의 Fc 부분 및 인간 IL-2 뮤테인은 선택적으로 Fc 영역 및 IL-2 뮤테인 간에 인코딩되는 링커를 포함하는, 단일 개방 해독틀 내에서 인코딩된다.

[0170] 다른 측면에서, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 IL-2 뮤테인- 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 발현 벡터가 본원에 제공된다.

[0171] 다른 측면에서, 상기 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포가 본원에 제공된다. 숙주 세포는 원핵생물 세포, 예컨대 대장균일 수도 있고, 진핵생물 세포, 예컨대 포유류 세포일 수도 있다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주이다.

[0172] 다른 측면에서, 인간 IL-2 뮤테인의 제조 방법이 본원에 제공된다. 이 방법은 인간 IL-2 뮤테인에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 발현되는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 이어서, 인간 IL-2 뮤테인이 상기 배양으로부터 수확된다. IL-2 뮤테인은 배양 배지 및/또는 숙주 세포 용해물로부터 수확될 수 있다.

[0173] 다른 측면에서, 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 제조 방법이 본원에 제공된다. 이 방법은 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 발현되는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 이어서, 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 상기 배양으로부터 수확된다. 인간 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 배양 배지 및/또는 숙주 세포 용해물로부터 수확될 수 있다.

[0174] 약학 조성물

[0175] 일부 구현예에서, 본 발명은 약학적으로 유효한 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 보존제, 및/또는 보강제와 함께 치료적 유효량의 IL-2 뮤테인을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인은 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질의 맥락 내에 있다. 본 발명의 약학 조성물에는 비제한적으로 액체, 냉동 및 동결건조

조성물이 포함된다.

[0176] 바람직하게는 제형물 재료는 채용되는 투여량 및 농도에서 수신자에게 비독성이다. 특정 구현예에서, 치료 분자를 함유하는 치료적 유효량의 IL-2 뮤테인, 예로 IL-2 뮤테인 Fc-융합물을 포함하는 약학 조성물이 제공된다.

[0177] 특정 구현예에서, 약학 조성물은, 예를 들어 조성물의 pH, 삼투성, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 향취, 멸균성, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 흡수 또는 침투를 개질하거나 유지하거나 보존하기 위한 제형 재료를 함유할 수 있다. 이러한 구현예에서, 적합한 제형 재료에는 비제한적으로 아미노산(예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 프롤린, 또는 라이신); 항균제; 항산화제(예컨대 아스코르브산, 황산나트륨 또는 황산수소나트륨); 완충제(예컨대 보레이트, 비카르보네이트, Tris-HCl, 시트레이트, 포스페이트 또는 다른 유기산); 벌크화제(예컨대 만니톨 또는 글리신); 킬레이트화제(예컨대 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)); 착화제(예컨대 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-시클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린); 충전제; 단당류; 이당류; 및 다른 탄수화물(예컨대 글루코오스, 만노오스 또는 텍스트린); 단백질(예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제, 풍미제 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체(예컨대 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩티드; 염 형성 짝이온(예컨대 나트륨); 보존제(예컨대 벤잘코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로산, 페닐 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소); 용매(예컨대 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당 알코올(예컨대 만니톨 또는 소르비톨); 현탁화제; 계면활성제 또는 수화제(예컨대 플루로닉, PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 티록사팔); 안정성 증강제(예컨대 수크로오스 또는 소르비톨); 긴장성 증강제(예컨대 알칼리 금속 할라이드, 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨 소르비톨); 전달 운반체; 희석제; 부형제 및/또는 약학 보강제가 포함된다. [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18" Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company]를 참고하라.

[0178] 특정 구현예에서, 최적 약학 조성물은, 예를 들어 목적 투여 경로, 전달 형식 및 원하는 투여형에 따라 당분야 숙련가에 의해 결정될 것이다. 예를 들어 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 상기 문헌]을 참고하라. 특정 구현예에서, 이러한 조성물은 본 발명의 항원 결합 단백질의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 제거 속도에 영향을 미칠 수 있다. 특정 구현예에서, 약학 조성물 중 일차 운반체 또는 담체는 수성 또는 비수성 성질일 수 있다. 예를 들어, 적합한 운반체 또는 담체는 비경구 투여를 위해 조성물에 일반적인 다른 재료가 보강될 수 있는 주사용수, 생리 식염수 용액 또는 인공 뇌척수액일 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수가 추가적인 예시적 운반체이다. 특정 구현예에서, 약학 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 Tris 완충액 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세테이트 완충액을 포함하며, 추가로 소르비톨 또는 이를 위해 적합한 대체제가 추가로 포함될 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 조성물은 원하는 순도를 갖는 선택된 조성물을 동결건조된 케이크 또는 수용액 형태의 선택적 제형화제(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 상기 문헌)와 혼합하여 보관을 위해 제조될 수 있다. 또한 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 산물은 적절한 부형제, 예컨대 수크로오스를 이용한 동결건조물로 제형화될 수 있다.

[0179] 본 발명의 약학 조성물은 비경구 투여를 위해 선택될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 흡입을 위해 또는 소화관을 통한, 예컨대 경구 전달을 위해 선택될 수 있다. 이러한 약학적으로 허용 가능한 조성물의 제조는 당분야의 기술 범위 내에 있다. 제형 성분은 바람직하게는 투여 부위에 허용 가능한 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, 생리적 pH 또는 약간 더 낮은 pH에서, 전형적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에서 조성물을 유지하기 위해 완충액이 이용된다.

[0180] 비경구 투여가 고려되는 경우, 본 발명에서 사용하기 위한 치료 조성물은 약학적으로 허용 가능한 운반체 중에 원하는 IL-2 뮤테인 조성물을 포함하는 발열원이 없는 비경구적으로 허용 가능한 수용액 형태로 제공될 수 있다. 비경구 주사를 위해 특히 적합한 운반체는 IL-2 뮤테인 조성물이 적절하게 보존된 멸균 등장성 용액으로 제형화되는 멸균 증류수이다. 특정 구현예에서, 제조에는 데팻 주사를 통해 전달될 수 있는 산물의 조절되거나 지속되는 방출을 제공할 수 있는 제제, 예컨대 주사용 마이크로스피어, 생체-식용 입자, 중합체성 화합물(예컨대 폴리락트산 또는 폴리글리콜산), 비드 또는 리포솜을 이용한 원하는 분자의 제형화가 관여될 수 있다. 특정 구현예에서, 순환 중 지속 기간을 촉진하는 효과를 갖는 히알루론산이 또한 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 이식 가능한 약물 전달 장치가 IL-2 뮤테인 조성물을 도입하기 위해 이용될 수 있다.

[0181] 지속- 또는 조절-전달 제형에서 IL-2 뮤테인 조성물이 관여되는 제형물을 포함하는 추가 약학 조성물은 당분야 숙련가에게 자명할 것이다. 다양한 다른 지속- 또는 조절-전달 수단, 예컨대 리포솜 담체, 생체-식용 마이크로 입자 또는 다공성 비드 및 데팻 주사를 제형화하기 위한 기법도 당분야 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어,

참조로 도입되며 약학 조성물의 전달을 위한 다공성 중합체성 마이크로입자의 조절 방출을 기재하는 국제 특허 출원 번호 PCT/US93/00829를 참고하라. 지속-방출 제조물에는 형상화된 물품, 예로 필름 또는 마이크로캡슐 형태의 반투과성 중합체 기질이 포함될 수 있다. 지속 방출 기질에는 폴리에스테르, 히드로겔, 폴리락티드(각각 참조로 도입되는 U.S. 특허 번호. 3,773,919 및 유럽 특허 출원 공개 번호 EP 058481에 개시됨), L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman 등, 1983, Biopolymers 2:547-556), 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트)(Langer 등, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 및 Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), 에틸렌 비닐 아세테이트(Langer 등, 1981, 상기 문헌) 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산(유럽 특허 출원 공개 번호 EP 133,988)이 포함될 수 있다. 지속 방출 조성물에는 또한 당분야에 공지된 임의의 몇몇 방법에 의해 제조될 수 있는 리포솜이 포함될 수 있다. 예로 참조로 도입되는 [Eppstein 등, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; 유럽 특허 출원 공개 번호 EP 036,676; EP 088,046 및 EP 143,949]를 참고하라.

[0182] 생체내 투여를 위해 이용되는 약학 조성물은 전형적으로 멸균 제조물로 제공된다. 멸균화는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조되는 경우, 상기 방법을 이용한 멸균화는 동결건조 및 재구성 이전에 또는 이후에 수행될 수 있다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조된 형태로 또는 용액 중에 보관될 수 있다. 비경구 조성물은 일반적으로 멸균 액세스 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알 내에 배치된다.

[0183] 본 발명의 측면에는 그 전문이 본원에 참조로 도입되는 국제 특허 출원 WO 06138181A2(PCT/US2006/022599)에 기재되는 약학 조성물로 이용될 수 있는 자가-완충 IL-2 뮤테인 제형물이 포함된다.

[0184] 상기 논의된 바와 같이, 특정 구현에는 IL-2 뮤테인 조성물에 부가하여 하나 이상의 부형제, 예컨대 본 섹션 및 본원의 다른 곳에 예시적으로 기재된 것을 포함하는 IL-2 뮤테인 조성물, 특히 약학적 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질질을 제공한다. 이에 관해 본 발명에서 다양한 목적, 예컨대 제형물의 물리적, 화학적 또는 생물학적 특성 조정, 예컨대 점도 조정을 위해 및 또는 유효성을 개선하고/하거나 이러한 제형물을 안정화하기 위한 본 발명의 공정 및 예를 들어 제작, 운송, 보관, 사용 전 제조, 투여 동안 및 이후에 일어나는 스트레스로 인한 분해 및 부패에 대항하는 공정에서 부형제가 이용될 수 있다.

[0185] 이에 관해 유용한 단백질 안정화 및 제형 재료와 방법에 대해 다양한 설명, 예컨대 각각 그 전문, 특히 본 발명에 따른 자가 완충 단백질 제형물에 대한 부형제 및 그 공정에 대한, 특히 수의학 및/또는 인간 의학 용도를 위한 단백질 약학 제품 및 공정에 대한 부분이 참조로 도입된 [Arakawa 등, "Solvent interactions in 제형물s," Pharm Res. 8(3): 285-91(1991); Kendrick 등, "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84(2002), 및 Randolph 등, "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75(2002)]을 이용할 수 있다.

[0186] 예를 들어 제형물의 이온 강도 및/또는 등장성을 조정하고/하거나 본 발명에 따른 조성물의 단백질 또는 다른 성분의 용해도 및/또는 물리적 안정성을 개선하기 위해 본 발명의 특정 구현에 따라 염이 이용될 수 있다.

[0187] 널리 공지된 바와 같이, 이온은 단백질 표면 상의 하전된 잔기에 결합하여 단백질에서 하전된 극성기를 차폐하고 이들의 정전기적 상호작용, 인력 및 척력 상호작용의 강도를 감소시켜 단백질의 천연 상태를 안정화할 수 있다. 이온은, 특히 단백질의 변성된 펩티드 결합(--CONH)에 결합하여 단백질의 변성된 상태를 안정화할 수도 있다. 또한, 단백질에서 하전된 극성기와 이온성 상호작용은 분자간 정전기적 상호작용을 또한 감소시키고, 이에 따라 단백질 응집 및 불용성을 방지하거나 감소시킬 수 있다.

[0188] 이온종은 단백질 상의 이들의 효과가 매우 상이하다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 제형화에 이용될 수 있는 이온의 여러 분류 순위 및 단백질 상의 이들의 효과가 개발되었다. 하나의 예는 Hofmeister 시리즈로, 이는 이온 및 극성 비이온성 용질을 용액 중 단백질의 입체형태 안정성에 대한 이들의 효과에 따라 순위를 매긴다. 안정화 용질은 "코스모트로픽"으로 불린다. 탈안정화 용질은 "카오트로픽"으로 불린다. 코스모트로픽은 일반적으로 용액으로부터 단백질을 침전시키기 위해("염석") 농도(예로 황산암모늄 1몰농도 초과)로 이용된다. 카오트로픽은 일반적으로 단백질을 변성시키고/시키거나 가용화하기 위해("염장") 이용된다. 이온의 "염장" 및 "염석"에 대한 상대적 유효성이 Hofmeister 시리즈에서 이들의 위치를 정의한다.

[0189] 자유 아미노산은 벌크화제, 안정화제 및 항산화제뿐만 아니라 다른 표준 용도로서의 본 발명의 다양한 구현에 따라 IL-2 뮤테인 제형물에서 이용될 수 있다. 라이신, 프롤린, 세린, 및 알라닌은 제형물 중 단백질의 안정화를 위해 이용될 수 있다. 글리신은 정확한 케이크 구조 및 특성을 보장하기 위해 동결건조에서 유용하다. 아

르기닌은 액체 및 동결건조된 제형물 모두에서 단백질 응집을 저해하기 위해 유용할 수 있다. 메티오닌은 항산화제로 유용하다.

- [0190] 폴리올에는 당, 예로 만니톨, 수크로오스 및 소르비톨 그리고 다가 알코올, 예컨대 글리세롤 및 프로필렌 글리콜이, 그리고 본원의 논의의 목적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 관련 물질이 포함된다. 폴리올은 코스모트로픽이다. 이들은 액체 및 동결건조된 제형물 모두에서 단백질을 물리적 및 화학적 분해 공정으로부터 보호하기 위해 유용한 안정화제이다. 폴리올은 또한 제형물의 긴장성을 조정하는데 유용하다.
- [0191] 본 발명의 선택 구현예에서 유용한 폴리올 중에는 일반적으로 동결건조된 제형물에서 케이크의 구조적 안정성을 보장하기 위해 이용되는 만니톨이 있다. 이는 케이크의 구조적 안정성을 보장한다. 이는 일반적으로 동결보호제, 예로 수크로오스와 함께 이용된다. 소르비톨 및 수크로오스는 긴장성을 조정하기 위한 그리고 수송 동안 또는 제조 공정 동안의 벌크 제조의 냉동-해동 스트레스에 대해 보호하기 위한 안정화제로서 바람직한 제제이다. 환원당(자유 알데히드 또는 케톤기를 함유함), 예컨대 글루코오스 및 락토오스는 표면 라이신 및 아르기닌 잔기를 당화할 수 있다. 따라서 이들은 일반적으로 본 발명에 따른 이용을 위해 바람직한 폴리올이 아니다. 또한, 이러한 반응종을 형성하는 당, 예컨대 수크로오스는 산성 조건 하에 프룩토오스 및 글루코오스로 가수분해된 후 당화를 방해하여, 역시 이에 관해 본 발명의 바람직한 폴리올이 아니다. PEG는 단백질을 안정화하기 위해 그리고 동결방지제로서 유용하며, 이에 관해 본 발명에서 이용될 수 있다.
- [0192] IL-2 뮤테인 제형물의 구현예는 계면활성제를 추가로 포함한다. 단백질 분자는 표면 상에 흡착되기 쉽고 변성되기 쉬워서 공기-액체, 고체-액체 및 액체-액체 계면에서의 응집이 일어나기 쉬울 수 있다. 이러한 효과는 일반적으로 단백질 농도와 역으로 비례한다. 이러한 해로운 상호작용은 일반적으로 단백질 농도와 역으로 비례하며, 전형적으로 산물 운송 및 취급 동안 생성되는 것과 같은 물리적 진탕에 의해 악화된다.
- [0193] 계면활성제는 일상적으로 표면 흡착을 방지하거나 최소화하거나 감소시키기 위해 이용된다. 이에 관해 본 발명에서 유용한 계면활성제에는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 소르비탄 폴리옥실레이트의 다른 지방산 에스테르, 및 폴록사머 188이 포함된다.
- [0194] 계면활성제는 또한 단백질 입체형태 안정성을 조절하기 위해 일반적으로 이용된다. 이에 관해 계면활성제의 이용은 임의의 주어진 계면활성제가 전형적으로 일부 단백질을 안정화하고 다른 것을 탈안정화할 것이므로 단백질 특이적이다.
- [0195] 폴리소르베이트는 산화적 분해에 민감하며, 종종 공급되는 상태에서 단백질 잔기 측쇄, 특히 메티오닌의 산화를 유도하기 충분한 양의 과산화물을 함유한다. 따라서 폴리소르베이트는 주의하여 이용되어야 하며, 이용되는 경우 이들의 최저 유효 농도로 채용되어야 한다. 이에 관해, 폴리소르베이트는 부형제가 이들의 최저 유효 농도로 이용되어야 한다는 일반 규칙을 예시한다.
- [0196] IL-2 뮤테인 제형물의 구현예는 하나 이상의 항산화제를 추가로 포함한다. 단백질의 해로운 산화는 어느 정도 주변 산소 및 온도를 적절한 수준으로 유지하고 빛에 대한 노출을 배제함으로써 약학 제형물에서 방지될 수 있다. 항산화제 부형제는 단백질의 산화적 분해를 방지하기 위해서도 이용될 수 있다. 이에 관해 유용한 항산화제에는 환원제, 산소/자유 라디칼 포획제 및 킬레이트화제가 있다. 본 발명에 따라 치료 단백질 제형물에서 이용하기 위한 항산화제는 바람직하게는 수용성이고, 제품 수명에 걸쳐 이들의 활성을 유지한다. EDTA는 이에 관해 본 발명에 따라 바람직한 항산화제이다.
- [0197] 항산화제는 단백질을 손상시킬 수 있다. 예를 들어 환원제, 예컨대 글루타치온은 특히 분자내 디설피드 결합을 손상시킬 수 있다. 따라서 본 발명에서 이용하기 위한 항산화제는 다른 것 중에서 이들 자체가 제형물 중 단백질을 손상시키는 가능성을 제거하거나 충분히 감소시키기 위해 선택된다.
- [0198] 본 발명에 따른 제형물에는 단백질 보조인자이고 단백질 배위 복합체를 형성하기 위해 필요한 금속 이온, 예컨대 특정한 인슐린 현탁액을 형성하는데 필요한 아연이 포함될 수 있다. 금속 이온은 또한 단백질을 분해하는 일부 공정을 저해할 수 있다. 그러나 금속 이온은 또한 단백질을 분해하는 물리적 및 화학적 공정을 촉매한다.
- [0199] 마그네슘 이온(10-120mM)은 아스파르트산의 이소아스파르트산으로의 이성화를 저해하기 위해 이용될 수 있다. Ca⁺² 이온(최대 100mM)은 인간 데옥시리보뉴클레아제의 안정성을 증가시킬 수 있다. 그러나 Mg⁺², Mn⁺², 및 Zn⁺²은 rhDNase를 탈안정화할 수 있다. 유사하게, Ca⁺² 및 Sr⁺²은 Mg⁺², Mn⁺², 및 Zn⁺², Cu⁺² 및 Fe⁺²에 의해 탈안정화될 수 있고 그 응집은 Al⁺³ 이온에 의해 증가될 수 있다.

- [0200] IL-2 뮤테인 제형물의 구현에는 하나 이상의 보존제를 추가로 포함한다. 보존제는 동일 용기로부터 2회 이상의 추출이 관여되는 다용량 비경구 제형물을 개발하는 경우 필요하다. 이들의 일차적 기능은 미생물 성장을 저해하고 수명 또는 완제 의약품의 이용 기간에 걸쳐 제품 멸균성을 보장하기 위한 것이다. 일반적으로 이용되는 보존제에는 벤질 알코올, 페놀 및 m-크레졸이 포함된다. 보존제는 비경구 소분자와 더불어 긴 사용 이력을 갖지만, 보존제를 포함하는 단백질 제형물의 개발은 어려울 수 있다. 보존제는 거의 항상 단백질에 대해 탈안정화 효과(응집)를 가지며 이는 다용량 단백질 제형물에서 이들의 이용을 제한하는 주요 요인이 되었다. 현재까지, 대부분의 단백질 약물은 1회용으로만 제형화되었다. 그러나 다용량 제형물이 가능한 경우, 이들은 환자 편의성 및 증가된 시장성을 구현하는 추가된 장점을 갖는다. 우수한 예는 보존된 제형물의 개발이 보다 편리한 다용량 주사 펜 제조물의 상업화로 이어진 인간 성장 호르몬(hGH)이다. hGH의 보존된 제형물을 함유하는 적어도 4 펜 장치가 현재 시장에서 이용 가능하다. 노르디트로핀(액체, Novo Nordisk), 뉴트로핀 AQ(액체, Genentech) & 제노트로핀(동결건조됨--이중 챔버 카트리지, Pharmacia & Upjohn)은 페놀을 함유하는 반면, 소마트로프(Eli Lilly)는 m-크레졸과 함께 제형화된다.
- [0201] 보존된 투여형의 제형화 및 개발 동안 몇몇 측면이 고려되어야 한다. 완제 의약품 내 유효 보존제 농도가 최적화되어야 한다. 이는 단백질 안정성을 손상시키지 않고 평균 유효성을 부여하는 농도 범위로 투여형에서 주어진 보존제를 평가하는 것을 필요로 한다.
- [0202] 예상될 바와 같이, 보존제를 함유하는 액체 제형물의 개발은 동결건조된 제형물에 비해 더 어렵다. 냉동 건조된 제품은 보존제 없이 동결건조되고 사용 시 보존제를 함유하는 희석제로 재구성될 수 있다. 이는 보존제가 단백질과 접촉하는 시간을 단축하여 연관된 안전성 위험을 크게 최소화한다. 액체 제형물에 있어서, 보존제 유효성 및 안정성이 전체 제품 수명(약 18 내지 24개월)에 걸쳐 유지되어야 한다. 중요한 주의 사항은 보존제 유효성이 활성 약물 및 모든 부형제 성분을 함유하는 최종 제형물에서 나타나야 한다는 것이다.
- [0203] IL-2 뮤테인 제형물은 일반적으로 다른 것들 중에서도 특정한 투여 경로 및 방법을 위해, 특정한 투여 투여형 및 투여 빈도를 위해, 특정한 질환의 특정 치료를 위해, 생체적합성 및 지속성 범위로 설계될 것이다. 따라서 제형물은 비제한적으로 경구, 청각, 안과, 직장 및 질 그리고 정맥내 및 동맥내 주사, 근육내 주사 및 피하 주사를 포함하는 비경구 경로를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의한 전달을 위해 본 발명에 따라 설계될 수 있다.
- [0204] 약학 조성물이 제형화되면, 이는 용액, 현탁액, 겔, 에멀전, 고체, 결정으로 또는 탈수되거나 동결건조된 분말로 멸균 바이알에 보관될 수 있다. 이러한 제형물은 즉시 사용 가능한 형태로 또는 투여 전에 재구성되는(예로, 동결건조된) 형태로 보관될 수 있다. 본 발명은 또한 단일 용량 투여 단위를 생산하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 각각 건조된 단백질을 갖는 제1 용기 및 수성 제형물을 갖는 제2 용기 모두를 함유할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 단일 및 다중-챔버 사전 충전 주사기(예로, 액체 주사기 및 동결건조주사기)를 함유하는 키트가 제공된다.
- [0205] 채용될 IL-2 뮤테인-함유 약학 조성물의 치료 유효량은, 예를 들어 치료 맥락 및 목표에 의존할 것이다. 당분야 숙련가는 치료를 위해 적절한 투여 수준이 부분적으로는 전달될 분자, IL-2 뮤테인이 이용되는 적응증, 투여 경로, 및 환자의 체격(체중, 체표면적 또는 기관 크기) 및/또는 상태(연령 및 일반 건강)에 의존하여 변할 것임을 이해할 것이다. 특정 구현예에서, 임상적은 최적 치료 효과를 수득하기 위한 투여량을 적정하고 투여 경로를 개질할 수 있다. 전형적인 투여량은 상기 언급된 요인에 따라 약 0.1 μ g/kg 내지 최대 약 1mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 특정 구현예에서, 투여량은 0.5 μ g/kg 내지 최대 약 100 μ g/kg, 선택적으로 2.5 μ g/kg 내지 최대 약 50 μ g/kg 범위일 수 있다.
- [0206] 치료 유효량의 IL-2 뮤테인은 바람직하게는 질환 증상의 중증도 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 또는 기간 증가, 또는 질환 고통으로 인한 장애 또는 불능의 방지로 이어진다.
- [0207] 약학 조성물은 의료 장치를 이용해서 투여될 수 있다. 약학 조성물을 투여하기 위한 의료 장치의 예는 모두 본원에 참조로 도입된 U.S. 특허 번호 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; 및 5,399,163에 기재되어 있다.
- [0208] 자가면역 또는 염증 장애의 치료 방법
- [0209] 특정 구현예에서, 본 발명의 IL-2 뮤테인은 자가면역 또는 염증 장애를 치료하기 위해 이용된다. 바람직한 구현예에서, IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 이용된다.

- [0210] 특히 본원에 개시된 IL-2 뮤테인을 이용한 치료에 민감한 장애에는 비제한적으로 염증, 자가면역 질환, 아토피성 질환, 신생물발립 자가면역 질환, 연골 염증, 관절염, 류마티스성 관절염, 소아 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 소수관절 소아 류마티스성 관절염, 다관절 소아 류마티스성 관절염, 전신 개시 소아 류마티스성 관절염, 소아 강직 척추염, 소아 장병원성 관절염, 소아 반응성 관절염, 소아 라이터 증후군, SEA 증후군(혈청반응 음성, 부착부병, 관절병 증후군), 소아 피부근염, 소아 건선 관절염, 소아 피부경화증, 소아 전신 홍반성 루푸스, 소아 혈관염, 소수관절 류마티스성 관절염, 다관절 류마티스성 관절염, 전신 개시 류마티스성 관절염, 강직 척추염, 장병원성 관절염, 반응성 관절염, 라이터 증후군, SEA 증후군(혈청반응 음성, 부착부병, 관절병 증후군), 피부근염, 건선 관절염, 피부경화증, 혈관염, 골수염, 다중골수염, 피부골수염, 결절 다발동맥염, 베게너 육아종증, 동맥염, 류마티스성 다발성 근육통, 사르코이드증, 경화증, 원발 쓸개관 경화증, 경화 쓸개관염, 쇼그렌 증후군, 건선, 판 건선, 방울 건선, 역위 건선, 농포 건선, 홍색피부 건선, 피부부염, 아토피성 피부염, 죽상경화증, 루푸스, 스틸 병, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 중증 근무력증, 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 케양성 대장염, 복강 질환, 다발성 경화증(MS), 천식, COPD, 코골염, 폴립을 갖는 코골염, 호산구성 식도염, 호산구성 기관지염, 길랭-바레 질환, I형 당뇨병, 갑상샘염(예로, 그레이브스 질환), 애디슨 질환, 레이노 현상, 자가면역 간염, GVHD, 이식 거부, 신장 손상, C형 간염-유도 혈관염, 자연 유산 등이 포함된다.
- [0211] 바람직한 구현예에서, 자가면역 또는 염증 장애는 루푸스, 이식편대 숙주병, C형 간염-유도 혈관염, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 자연 유산, 아토피성 질환, 및 염증성 장 질환이다.
- [0212] Treg 세포의 증식 방법
- [0213] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질은 대상체 또는 표본 내에서 Treg 세포를 증식시키기 위해 이용될 수 있다. Treg 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법이 본원에 제공된다. 이 방법은 T 세포 모집단을 유효량의 인간 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 이 비는 T 세포 모집단 내에서 CD3+FOXP3+ 세포 대 CD3+FOXP3- 세포의 비를 결정하여 측정될 수 있다. 인간 혈액에서 전형적인 Treg 빈도는 총 CD4+CD3+ T 세포의 5-10%이지만, 상기 기재된 질환에서 이 백분율은 더 높거나 더 낮을 수 있다. 바람직한 구현예에서, Treg의 백분율은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 적어도 600%, 적어도 700%, 적어도 800%, 적어도 900% 또는 적어도 1000% 증가한다. Treg의 최대 배율 증가는 특정 질환에 있어 변할 수 있다; 그러나 IL-2 뮤테인 치료를 통해 수득될 수 있는 최대 Treg 빈도는 총 CD4+CD3+ T 세포의 50% 또는 60%이다. 특정 구현예에서, IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 대상체에 투여되며, 대상체의 말초혈 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비가 증가한다.
- [0214] IL-2 뮤테인 및 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 다른 세포 유형에 비해 Treg를 우선적으로 증식시키므로, 이들은 또한 대상체의 말초혈 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 천연 킬러(NK) 세포의 비를 증가시키는데 유용하다. 이 비는 CD19- 및 CD3-인 CD16+ 및/또는 CD56+ 림프구에 대한 CD3+FOXP3+ 세포의 비를 결정하여 측정될 수 있다.
- [0215] IL-2 뮤테인 또는 IL-2 뮤테인 Fc-융합 단백질이 환자의 말초혈 내에서 Treg 대 비-조절 T 세포 또는 NK 세포의 비를 크게 증식시키지 않고 환자 내에서 질환 또는 장애에 대한 치료 효과를 가질 수 있음이 고려된다. 치료 효과는 염증 또는 자가면역 부위에서 IL-2 뮤테인 또는 IL-2 Fc-융합 단백질의 편재된 활성에 기인할 수 있다.
- [0216] 실시예
- [0217] 실제적이면서 예언적인 하기 실시예는 본 발명의 구체적 구현예 또는 특징을 예시하기 위한 목적으로 제공되며 그 범위를 제한하려는 것은 아니다.
- [0218] 실시예 1 -- CD25에 대한 고친화도를 부여하는 돌연변이의 수 감소
- [0219] CD25에 대해 친화도가 상승하고 IL-2Rβ γ를 통한 신호전달 강도가 감소된 IL-2 뮤테인은 Treg 성장 및 기능을 우선적으로 촉진한다. 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위해, CD25에 대한 고친화도를 달성하기 위해 필요한 돌연변이의 최소 수를 찾았다. 그 세 수용체와 복합체화된 IL-2의 결정 구조(PDB 코드 - 2B51)는 V69A 및 Q74P가 CD25와 상호작용하는 나선 구조에 배치됨을 나타낸다. 이는 V69A 및 Q74P가 왜 높은 CD25 결합 친화도를 위한 두 독립적 IL-2 돌연변이화 스크리닝에서 빈번하게 단리되었는지를 설명할 수 있다(Rao 등 2005; Thanos 등 2006). 본 실시예는 Rao 등의 스크리닝에서 확인된 IL-2 뮤테인 "2-4"에서 다른 돌연변이 중 어느 것이 V69A 및 Q74P만으로 관찰되는 상기 친화도를 증가시키기 위해 가장 중요한지를 탐색한다. 하기 단백질은 활성화된 T 세포의 표면 상에서 CD25로의 결합에 대해 유세포 측정에 의해 스크리닝되었다. 모든 구조물에는 또한 정제 및 검출을 위한 C-말단 FLAG 및 폴리-His 태그가 포함되었다. 구체적 돌연변이를 괄호 내에 제공한

다.

- [0220] HaMut 1D(V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 8)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0221]
- [0222] HaMut 2D(N30S, V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 9)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNSYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0223]
- [0224] HaMut 3D(K35R, V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 10)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFK FYPMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0225]
- [0226] HaMut 4D(T37A, V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 11)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLARM LTFK FYPMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0227]
- [0228] HaMut 5D(K48E, V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 12)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0229]
- [0230] HaMut 6D(E68D, V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 13)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKHLQCLEEELKPLEDALNLAPSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0231]
- [0232] HaMut 7D(N71R, V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 14)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0233]
- [0234] HaMut 8D(K35R, K48E, E68D, N88D, C125A)(서열 목록 번호 15)
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFK FYPMPKATELKHLQCLEEELKPLEDVNLQAQSKN
 FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI ISTLT
- [0235]
- [0236] HaMut 7D는 원래 단리물 "2-4"와 거의 같은 친화도(~200pM)로 CD25에 결합하여, 돌연변이 N71R이 V69A, Q74P만
 으로 관찰된 상기 친화도(HaMut 1D, ~2nM)를 크게 증가시킬 수 있음을 시사하였다. 다른 구축물은 그 친화도가
 WT IL-2에 비해 약간만 더 높던 HaMut 8D를 제외하고는 HaMut 1D와 유사하거나 약간 더 높은 친화도를
 보유하였다.
- [0237] 실시예 2 -- 개선된 반감기를 위해 IgG1-Fc 도메인에 융합된 IL-2 뮤테인
- [0238] IL-2 뮤테인을 이용한 Treg 농축을 달성하기 위해 필요한 투여 빈도를 감소시키기 위해, IL-2 및 IgG1-Fc 도메
 인 간 다양한 융합물을 평가하였다. Fc 도메인은 IgG1에 의해 매개되는 효과기 기능, 예컨대 표적 세포 용해를
 제거하는 점 돌연변이를 함유하였다. 본 연구에서 이용된 Fc 효과기 기능 돌연변이는 A327Q, Ala Ala(
 L234A+L235A) 또는 N297G였다. Treg-선택적인 IL-2 뮤테인이 IL-2 역가의 부분 감소를 가지므로, IL-2R 신호
 전달에 크게 영향을 미치지 않는 방식으로 IL-2를 Fc에 융합하는 것이 중요하였다. 따라서 IL-2 뮤테인을 Fc
 융합을 포함하고 및 포함하지 않고 IL-2R 활성화에 대해 평가하였다.
- [0239] Fc 융합에 의한 IL-2 이량체화가 IL-2R에 대한 증가된 결합력으로 인해 IL-2R 신호전달 강도를 증가시킬 것인
 지를 결정하기 위해, 더 약한 IL-2 뮤테인(haD5)(US20110274650)을 GGGGS(서열 목록 번호 5) 링커 서열로 분리된
 Fc의 아미노 말단에 융합하였다. 상기 뮤테인은 IL-2R 신호전달에 영향을 미치는 3 돌연변이(E15Q, H16N,
 N88D), CD25에 대한 고친화도를 부여하는 8 돌연변이(N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P)(Rao
 등 2005), 및 시스테인 페어링 오류 및 응집을 방지하는 C125S를 보유하였다. 상기 방식의 Fc에 대한 융합은
 이량체화로 인해 증가된 결합력에 기인할 수 있는 세포 표면 CD25에 대한 그 고친화도 결합이 증강된 반면 haD5
 의 생물학적 활성을 완전히 제거하였다.
- [0240] IL-2 뮤테인은 또한 Fc 이량체의 한 사슬만 IL-2 도메인을 보유하도록 Fc 이종이량체의 N- 또는 C-말단에 융합

되었다. 두 비대칭 Fc 사슬 간의 이중이량체성 페어링은 하나의 Fc 사슬 상에 도입된 라이신 및 다른 Fc 사슬 상의 도입된 아스파르트산 간의 정전기적 상호작용에 의해 촉진되었다. IL-2 뮤테인 haD6은 하나의 구성이 바람직한 경우 하나의 Fc 사슬 또는 다른 사슬의 N-말단에 융합되어 haD6.FcDD 및 haD6.FcKK로 명명된 두 단백질 구조물을 생성하였다. 본 출원인은 또한 뮤테인 haMut7D를 하나 또는 두 GGGGS(서열 목록 번호 5) 링커 (FcKK(G4S)haMut7D, FcKK(G4S)2haMut7D)와 함께 Fc 이중이량체의 C-말단에 융합하였다. IL-2 뮤테인 haD6의 Fc 이중이량체의 N-말단으로의 융합은 pSTAT5 및 T 세포 증식 실험에서 모두 자유 haD6에 비해 부분적인 활성 손실을 일으켰다. 대조적으로, 하나 또는 두 GGGGS(서열 목록 번호 5) 링커와 함께 Fc 이중이량체의 C-말단에 대한 haMut7D의 융합은 haMut7D의 역할을 변경시키지 않았다.

[0241] Fc 동중이량체의 C-말단에 대한 IL-2 뮤테인의 융합도 조사하였다. 총 PBMC를 100ng/ml 항-CD3(OKT3)을 포함하여 100ml 당 3억 개 세포씩 T75 조직 배양 플라스크에서 활성화하였다. 배양 3일 후에 세포를 3회 세척하고, 3일 동안 신선 배지 중에 휴지시켰다. 이어서 세포를 최종 부피 50 μ l로 1pM 내지 10nM 범위의 10x용량 적정으로 IL-2 변이체로 자극하였다. STAT5 인산화 수준을 BD phosflow 완충액 키트를 이용해서 측정하였다. 간략하게, 1ml의 BD 용해/고정 phosflow 완충액을 첨가하여 자극을 중지시켰다. 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 고정하고, 얼음 상에서 1xBD phosflow perm 완충액으로 투과화한 뒤 CD4, CD25, FOXP3 및 pSTAT5에 대해 염색하였다.

[0242] 도 1에서 알 수 있듯이, 뮤테인 haMut1D 및 haMut7D의 생체활성은 Fc 동중이량체의 C-말단에 대한 융합에 의해 변경되지 않았다. 따라서 IL-2의 N-말단 및 Fc의 C-말단 간 융합은 Fc-IL-2 동중이량체의 맥락에서도 IL-2 뮤테인의 작동제 활성을 손상시키지 않았다. 이들 구조물에서, C125A 돌연변이가 개선된 제조를 위해 C125S 대신 이용되었다.

[0243] 실시예 3 -- 우선적 Treg 성장을 달성하기 위한 IL-2 뮤테인 역가 조정

[0244] IL-2 뮤테인의 최초 패널은 N88D만 또는 IL-2R 신호전달에 영향을 미치는 1 또는 2 추가 돌연변이를 함께 함유하였다. 모두 단일 점 돌연변이를 가지는 두 번째 뮤테인 패널을 N88D 시리즈와 유사하거나 이보다 약간 더 강력한 작동성을 갖는 뮤테인을 확인하려는 목적으로 설계하였다. 24 신호전달 돌연변이 패널이 예측된 IL-2R β -상호작용 아미노산(결합 구조, PDB 코드 - 2B5I)에 기반하여 확인되었다. 뮤테인 및 IL-2R β 간 결합 자유 에너지의 예측된 감소에 기반하여 특정 치환이 선택되었다. 결합 자유 에너지를 EGAD 전산화 알고리즘(Handel's Laboratory, University of California at San Diego, USA)을 이용하여 계산하였다. 돌연변이체의 결합 자유 에너지는 $\Delta \Delta G_{mut} = \mu (\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$ 로 정의된다. 여기서, μ (일반적으로 0.1)는 실험 에너지와 비교하는 경우 1의 경사도를 갖는 결합 친화도의 예측 변화를 정상화하기 위해 이용되는 환산 계수이다(Pokala and Handel 2005). 해리 자유 에너지(ΔG)는 복합체(ΔG_{bound}) 및 자유 상태(ΔG_{free}) 간 에너지 차이로 정의되었다. 해리 에너지 ΔG_{mut} 이 각 치환에 대해 계산되었다.

[0245] 하기 치환을 갖는 IL-2 뮤테인 패널(H16E, H16Q, L19K, D20R, D20K, D20H, D20Y, M23H, D84K, D84H, S87Y, N88D, N88K, N88I, N88H, N88Y, V91N, V91K, V91H, V91R, I92H, E95K, E95R, 또는 E95I)이 Fc 이중이량체에 대한 C-말단 융합물로 발현되었다. 이들 구조물은 또한 높은 CD25 결합 친화도를 위한 haMut7 돌연변이(V69A, N71R, Q74P) 및 효율적 폴딩을 위한 C125A를 함유하였다.

[0246] 패널을 실시예 2의 T 세포 STAT5 인산화 분석에서의 역가에 대해 스크리닝하였고, H16E, D84K, V91N, V91K, 및 V91R은 야생형 IL-2보다 작고 N88D보다 큰 활성을 보유하는 것으로 확인되었다(도 2).

[0247] H16E, D84K, V91N, V91K, 및 V91R은 야생형 IL-2보다 작고 N88D보다 큰 활성을 보유하였다.

[0248] 선택된 뮤테인을 또한 T 세포 및 NK 성장 분석에서 평가하였다.

[0249] T-세포 분석에 있어서, 총 PBMC를 100ng OKT3으로 3백만 개/ml로 활성화하였다. 2일째에 세포를 3회 세척하고, 5일 동안 신선 배지 중에 휴지시켰다. 이어서 세포를 CFSE로 표지하고, 7일 동안 IL-2 함유 배지 중 5십만 개/웰로 24웰 플레이트에서 배양한 뒤 FACS 분석하였다. T 세포 하위세트의 증식을 CFSE 희석도(중앙값 CFSE 형광)로 도 3에 나타낸다.

[0250] NK-세포 분석에 있어서, MACS 정렬된 CD16+ NK 세포를 96웰 플레이트에서 10만 개/웰로 3일 동안 IL-2 함유 배지 중에 배양하였다. 0.5 μ Ci 3 H-티미딘을 인큐베이션의 최종 18시간 동안 각 웰에 첨가하였다. 결과를 도 4에 나타낸다.

[0251] 돌연변이체 H16E, D84K, V91N, V91K, 및 V91R 돌연변이체는 WT IL-2와 유사한 Treg 성장을 자극할 수

있었지만, 다른 T 세포 상에서는 대략 10x 덜 강력했고(도 3) NK 세포 상에서는 대략 100x 덜 강력했다(도 4).

[0252] Fc 이중이량체 및 뮤테인 haMut7(V69A, N71R, Q74P, C125A) 간 거리가 일련의 개별 아미노산 절단에 의해 감소된 Fc.IL-2 융합 단백질의 별도 패널을 설계하였다.

[0253] Fc.haMut7 **Fc...TQKSLSLSPGKGGGGS**APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0254] (서열 목록 번호 22)

[0255] Trunc1 **Fc...TQKSLSLSS**STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0256] (서열 목록 번호 23)

[0257] Trunc2 **Fc...TQKSLSL**S-STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0258] (서열 목록 번호 24)

[0259] Trunc3 **Fc...TQKSLSL**S--TKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0260] (서열 목록 번호 25)

[0261] Trunc4 **Fc...TQKSLSL**S---KKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0262] (서열 목록 번호 26)

[0263] Trunc5 **Fc...TQKSLSL**S----KTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0264] (서열 목록 번호 27)

[0265] Trunc6 **Fc...TQKSLSL**S-----TQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0266] (서열 목록 번호 28)

[0267] Trunc7 **Fc...TQKSLSL**S-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0268] (서열 목록 번호 29)

[0269] Trunc8 **Fc...TQKSL**SL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7

[0270] (서열 목록 번호 30)

[0271] Trunc1-Trunc4는 도 2, 3 및 4에 대해 기재된 바와 같이 STAT5 인산화에 의해 그리고 T 세포 및 NK 세포 증식에 의해 측정되는 전장 부모 구조물 Fc.haMut7과 동일한 역할을 보유했다. Trunc5 및 Trunc6은 더 약한 반응을 자극하였지만 N88D 돌연변이(haD 및 haMut7D)에 의해 자극된 것보다 강했고, V91K에 의해 자극된 것과 매우 유사하였다. Trunc7은 N88D 뮤테인보다 약했고, Trunc8은 거의 활성을 갖지 않았다. 그러나 NK 세포 상에서 평가되는 경우, Trunc5 및 Trunc6은 V91K보다 강한 작동제여서, Treg 선택성이 인접 Fc 도메인에 의한 입체 장애에 비해 신호전달 돌연변이로 더 쉽게 달성되었다.

[0272] 실시예 4 -- Fc 동중이량체 맥락에서 높은 CD25 친화도 돌연변이

[0273] 높은 CD25 결합 친화도를 부여한 돌연변이는 이들이 CD25-고 T 세포에 대해 친화성을 증가시키고 장기 CD25::IL-2뮤테인 연합을 촉진하고 신호전달을 연장시킴으로 유리한 것으로 간주되었다. 그러나 돌연변이 수의 감소는 번역원성 능력을 감소시킬 수 있다. haMut1 고친화도 돌연변이 V69A 및 Q74P를 포함하는 및 포함하지 않는 N88D 또는 V91K 뮤테인이 Fc 동중이량체의 C-말단에 대한 융합물로 발현되고 생체활성에 대해 비교되었다. pSTAT5 자극 분석에서, 동중이량체화는 단량체성 뮤테인에 비해 신호 강도에 대해 효과를 갖지 않았다. 고친화도 돌연변이 V69A 및 Q74P의 역전도 pSTAT5 신호전달에 영향을 미치지 않았다. T 세포 성장 분석에서, 고친화도 돌연변이는 통상적 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 상 활성을 감소시켰으나 조절 T 세포 상에서는 감소시키지 않았다(도 5). 고친화도 돌연변이는 또한 NK 세포에서 증식 반응을 변경시키지 않았다(도 6).

[0274] 고친화도 돌연변이가 생체내 T 세포 반응에 영향을 미쳤는지를 결정하기 위해, 인간화된 마우스(인간 CD34⁺ 조혈 줄기 세포로 재구성된 NOD.SCID.I12rg-null 마우스)에 Fc.IL-2 뮤테인 융합 단백질을 투여하고 Treg 증식을 모니터링하였다. 7주령 NOD.SCID.I12rg-null(NSG) 마우스(Jackson Labs, Bar Harbor, ME)를 조사하고(180rad) 94,000 인간 태아 간 CD34⁺ 조혈 줄기 세포로 재구성하였다. 21주째에 마우스를 키메라증 백분율(PBL의 유세포 측정에 의해 결정됨)의 동일 배분에 기반하여 6군으로 나누고 0일 및 7일에 나타낸 Fc.뮤테인 융합 단백질 또는 PBS를 1 μ g 피하 주사하였다. 11일째에 혈중 T 세포 하위세트 빈도를 유세포 측정에 의해 결정하였다. 동물 별로 저용량의 1 μ g에서는 고친화도 돌연변이가 N88D 또는 V91K 돌연변이만으로 관찰된 것을 넘어서서 Treg 증식을 개선하지 못했다(도 7).

[0275] FOXP3⁻CD4⁺ T 세포가 인간 B 및 T 세포 그리고 마우스 골수종 세포의 혼합물을 포함하는 총 말초혈 백혈구(PBL)에 비해 풍부성이 증가하지 않았다는 점에서 Treg 증식은 선택적이었다. 또한 더 고용량에서는 고친화도 돌연변이가 CD25⁺FOXP3⁻ T 세포 증가를 촉진하여, Treg 선택성을 감소시켰다. 따라서 Fc 동종이량체의 맥락에서, 고친화도 돌연변이는 우선적 Treg 성장을 촉진하기 위해 필요한 것으로 간주되지 않았다.

[0276] **Fc.WT** IgG1Fc(N297G_de1K)::G4S::huIL-2(C125A) (서열 목록 번호 16)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
```

GGGGS

```
APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIIISTLT
```

[0277]

[0278] **Fc.haMut1V91K** IgG1Fc(N297G_de1K)::G4S::huIL-2(V69A, Q74P, V91K, C125A)(서열 목록 번호 17)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
```

GGGGS

```
APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIIISTLT
```

[0279]

[0280] **Fc.V91K** IgG1Fc(N297G_de1K)::G4S::huIL-2(V91K, C125A)(서열 목록 번호 18)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
```

GGGGS

```
APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIIISTLT
```

[0281]

[0282] **Fc.haMut1N88D** IgG1Fc(N297G_de1K)::G4S::huIL-2(V69A, Q74P, N88D, C125A)(서열 목록 번호 19)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG
```

GGGGS

```
APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRLMTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLI
SDINIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIIISTLT
```

[0283]

[0284] **Fc.N88D** IgG1Fc(N297G_de1K)::G4S::huIL-2(N88D, C125A)(서열 목록 번호 20)

DKTHTCPPCPAPELLGGFVSFLFPKPKDTLMI SRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVQLQDWLNKQKEYCKVKVSNKALPAPEIKETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTFKFKYMPKATELKHLLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SDINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0285]
[0286] 실시예 5 -- Fc.IL-2 뮤테인의 연장된 세포 표면 CD25 연합

[0287] 인간화된 마우스 연구로부터 예상하지 못한 결과는, 이들의 감소된 신호전달능에도 불구하고 뮤테인이 Fc.WT IL-2에 비해 더 강력한 Treg 농축을 유도했다는 것이었다. Fc.WT로 나타난 것에 비해 더 큰 Treg 농축 및 FOXP3 상향조절이 1µg/마우스 용량(도 7) 및 0.5µg/마우스의 더 낮은 용량(도 8)에서 관찰되었다. 이러한 증가된 생체내 역가는 T 세포에 의한 감소된 소비로 야기되어 더 많은 Fc.IL-2 뮤테인을 연장된 신호전달을 위해 이용할 수 있도록 할 수 있다.

[0288] 그러나 시험관내 및 생체내 PK 연구는 활성화된 T 세포 배양으로부터의 상청액 또는 투여된 마우스로부터의 혈청 중 Fc.WT에 비해 Fc.V91K 또는 Fc.N88D의 크게 증가된 지속을 나타내지 못했다. 본 출원인은 Fc 융합물이 두 IL-2 뮤테인 도메인을 보유하므로, 증가된 엔도솜 재생이 CD25에 대해 증가된 결합력으로 인해 연장된 세포 표면 연합을 일으킬 수 있는 것으로 보았다. 실제로, 본 출원인은 융합 단백질에 대한 짧은 노출 후 이전에 활성화된 T 세포 표면 상에서 Fc.WT에 비해 Fc.V91K 및 Fc.N88D가 더 효율적으로 지속되었음을 확인하였다(도 9).

[0289] 일차 PBMC를 100ng/ml OKT3으로 2일 동안 사전 자극하였다. 세포를 수확하고, 4회 세척하고, 배지 중 하룻밤 동안 휴지시켰다. 그 뒤 세포를 37°C에서 30분 동안 400pM Fc.IL-2로 펄스화하였다. 펄스화 후, 세포를 1회 세척 후 T0에 수확하거나 또는 12ml의 가온 배지 중 추가 3회 세척하고 4시간 동안 배양하였다. 세포-연합된 Fc.IL-2를 검출하기 위해, 세포를 항-인간 IgG-FITC(Jackson Immunoresearch) 및 항-CD25-APC로 염색하였다.

[0290] 실시예 6 -- 융합물 서열 최적화

[0291] 마우스에서의 전임상 연구에서, 본 출원인의 Fc.IL-2 뮤테인은 온전한 분자의 혈청 농도가 인간 Fc 부분만에서와 비교되는 경우 차별적 노출을 나타내어 순환하는 인간 Fc 분해대사산물을 시사하였다. 본 출원인의 Fc.IL-2 뮤테인의 생체내 안정성 및 약동학을 최적화하기 위해, 전신 순환에서 그리고 망상내피 시스템을 통한 재생 동안 Fc.IL-2 뮤테인의 단백질단성 분해에 대한 이들의 영향에 대해 융합 서열 개질을 분석하였다. 하기 구축물을 시험관내 및 생체내 단백질단성 분해에 대해 평가하였다.

[0292] **(Ala_Ala)_G4S** ...~~TQKSLSLSPGKGGGGS~~APTSSSTKKTQLQ... ha7N88D

[0293] (서열 목록 번호 31)

[0294] **(N297G_de1K)_G4S** ...~~TQKSLSLSPG~~ GGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ha1V91K

[0295] (서열 목록 번호 32)

[0296] **(N297G_KtoA)_AAPT** ...~~TQKSLSLSPGA~~_____APTSSSTKKTQLQ... ha1V91K

[0297] (서열 목록 번호 33)

[0298] **(N297G_KtoA)_AAPA** ...~~TQKSLSLSPGA~~_____APASSSTKKTQLQ... ha1V91K

[0299] (서열 목록 번호 34)

[0300] 안정성을 총 인간 Fc 대 온전한 Fc.IL-2 뮤테인의 경시적 농도를 비교하는 정량적 면역분석에 의해 측정하였다. Fc.IL-2 뮤테인의 단백질분해를 항-IL-2 및 항-인간 Fc 항체를 이용하는 웨스턴 블롯 분석에 이어 분해대사산물의 면역포획 및 질량 분광측정에 의한 분석으로 확인하였다. 시험관내 및 생체내 표본으로부터 (Ala_Ala)_G4S의 분해대사산물의 질량 분광측정에 의한 분석은 Fc 도메인의 C-말단 Lys를 단백질분해 절단 부위로 확인하였다. Fc 도메인 C-말단 라이신의 결실 또는 돌연변이((N297G_de1K)_G4S 및 (N297G_KtoA)_AAPT)는 C-말단 라이신을 갖는 Fc 구축물((Ala_Ala)_G4S)에 비해 37°C에서 마우스 혈청 중 연장된 시험관내 안정성을 야기하였다. 이러한 연

장된 시험관내 혈청 안정성은 Fc.IL-2 뮤테인 혈청 농도 하 면적 대 시간 곡선(AUC)에 의해 측정되는 마우스에서의 더 큰 노출로 반영되었다. C-말단 Fc 라이신이 없는 Fc.IL-2 뮤테인의 이러한 연장된 안정성은 게잡이 원숭이 및 인간의 혈청 중 시험관내에서도 관찰되었다. IL-2의 Thr-3의 Ala으로의 돌연변이((N297G_KtoA)_AAPA)는 마우스 혈청 중에 그리고 재조합 인간 카텡신 D 및 L을 이용한 별도 인큐베이션에서 37°C에서 감소된 시험관내 안정성을 야기하였다((N297G_KtoA)_AAPT에 비해). 이러한 감소된 시험관내 혈청 안정성은 (N297G_KtoA)_AAPT에 비해 (N297G_KtoA)_AAPA에 있어서 생체내 마우스에서 더 적은 노출(AUC)로 반영되었다. 질량 분광측정에 의한 시험관내 및 생체내 표본으로부터 (N297G_KtoA)_AAPA의 분해대사산물의 특징분석은 IL-2 뮤테인 도메인의 Lys 8 및 Lys 9를 (N297G_KtoA)_AAPT의 동등 표본에 대해서 관찰되지 않은 단백분해에 대해 감수성이 있는 잔기로 확인하였다. (N297G_KtoA)_AAPT에 비해 (N297G_KtoA)_AAPA의 37°C에서의 감소된 안정성도 게잡이 원숭이 및 인간으로부터의 혈청 중 시험관내에서 관찰되었다.

[0301] 상기 영역에서 글리코실화의 중요성 및 융합 단백질의 제조 시 잠재적인 개선을 위해, 융합 서열을 다음과 같이 0-연관된 글리코실화보다 N-연관된 글리코실화를 촉진하도록 변경하였다.

[0302] 원래

[0303] IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ

[0304] (서열 목록 번호 32)

[0305] 변경된

[0306] IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPN~~S~~SSSTKKTQLQ

[0307] (서열 목록 번호 35)

[0308] IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,S5T,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPN~~S~~STKKTQLQ

[0309] (서열 목록 번호 36)

[0310] IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGNGTAP~~S~~SSSTKKTQLQ

[0311] (서열 목록 번호 37)

[0312] IgG1Fc(N297G_delK)::YGGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGYGNGTAP~~S~~SSSTKKTQLQ

[0313] (서열 목록 번호 38)

[0314] 실시예 7 - 게잡이 원숭이 PK/PD 결정

[0315] 표준 IL-2 면역 자극 치료법은 바람직하지 못한 부작용을 배제하기 위해 투여 주기 간 무약물 휴일(비노출)을 필요로 한다. 대조적으로, Treg 증식 또는 자극 치료법은 Treg 자극을 위해 충분한 지속되는 안정기 약물 수준 (혈청 C_{min})을 갖지만 면역 활성화로 이어지는 약물 수준 미만의 최대 노출(혈청 C_{max})을 갖는 연장된 노출을 필요로 할 수 있다. 본 실시예는 친염증성 면역 활성화에 필요한 것으로 고려되는 약물 수준 미만의 최대 노출 (혈청 C_{max})을 유지하면서 연장된 표적 커버를 위한(혈청 C_{min}) 게잡이 원숭이에서의 반감기가 연장된 뮤테인의 투여 전략을 나타낸다.

[0316] 4 군(A-D)의 게잡이 원숭이에 Fc.V91K(IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A))를 투여하고, 3 군(A-C)에는 피하 투여하고 1 군(D)에는 정맥내 투여하였다. 각 군에 대해, 아래 요약된 투여 전략에 따라 4마리의 생물학적 미처리(naive) 웅성 게잡이 원숭이에 투여하였다. 반감기가 연장된 뮤테인의 피하 투여는 더 큰 림프 흡수를 허용하여 더 낮은 최대 노출(혈청 C_{max}) 및/또는 더 강력한 약리적 반응(Treg 증식)을 야기할 수 있다. A군에 대한 투여 전략은 주기 1의 0, 2 및 4일에 3 연속 10µg/kg 용량 및 14일에 10µg/kg으로 구성되어 더 낮은 최대 노출(C_{max})을 유지하면서 50µg/kg의 더 높은 초기 용량과 유사한 연장된 표적 커버를 허용한다. B군에 대한 투여 전략에서는 A군에 비해 0 및 14일에 50µg/kg이 투여된다. C군에 대한 투여 전략에는 0 및 28일에 50µg/kg이 투여된다. 안정기 커버가 지속되는 Treg 농축을 위해 필요한지 또는 무약물 휴일이 투여 주기 간에 유익한지의 결정을 허용한다. 정맥내 투여군 D에 대한 투여 전략은 0일에 50µg/kg을 투여하여 피하 투여에서와 최대 노출(C_{max}) 및 Treg 농축의 차이 비교를 허용한다.

- [0317] 약동학(온전한 분자 및 총 인간 Fc에 대한 정량적 면역분석), 항-약물 항체, 박리 가용성 CD25, 및 혈청 시토카인(IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-4, 및 IL-13)을 특정된 각 투여군에 대해 하기 시점에 측정한다:
- [0318] A군: 투여 전(제1 주기; 용량 1), 48(투여 전 제1 주기; 용량 2), 96(투여 전 제1 주기; 용량 3), 100, 104, 120, 168, 216, 264, 336(투여 전 제2 주기), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840, 및 1008시간.
- [0319] B군: 투여 전(제1 주기), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336(투여 전 제2 주기), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840, 및 1008시간.
- [0320] C군: 투여 전(제1 주기), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 672(투여 전 제2 주기), 676, 680, 696, 744, 792, 840, 912, 1008, 1080, 및 1176시간.
- [0321] D군: 투여 전(제1 주기), 0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 및 672시간.
- [0322] 약리학(말초혈 Treg, 비-조절 CD4 및 CD8 T 세포, 및 NK 세포의 면역표현형 분석 및 산출)을 특정된 각 투여군에 대해 하기 시점에 측정한다:
- [0323] A군: 투여 전(제1 주기; 용량 1), 96(투여 전 제1 주기; 용량 3), 168, 336(투여 전 제2 주기), 456, 및 576시간.
- [0324] B군: 투여 전(제1 주기), 120, 240, 336(투여 전 제2 주기), 456, 및 576시간.
- [0325] C군: 투여 전(제1 주기), 120, 240, 672(투여 전 제2 주기), 792, 및 912시간.
- [0326] D군: 투여 전(제1 주기), 120 및 240시간.
- [0327] 혈액학 및 임상 화학을 투여군 별로 투여 전 및 최초 투여 후 24시간에 모든 동물 및 투여군에 대해 평가한다. 하기 파라미터가 평가된다.
- [0328] 혈액학:
- [0329] ● 백혈구수(총 수 및 절대 수 차이)
- [0330] ● 적혈구수
- [0331] ● 헤모글로빈
- [0332] ● 적혈구용적률
- [0333] ● 평균 혈구 헤모글로빈, 평균 혈구 용적, 평균 혈구 헤모글로빈 농도(산출치)
- [0334] ● 절대 망상적혈구
- [0335] ● 혈소판수
- [0336] ● 혈액 세포 형태
- [0337] ● 적혈구 분포 폭
- [0338] ● 평균 혈소판 용적
- [0339] 임상 화학:
- [0340] ● 알칼리 포스파타아제
- [0341] ● 총 빌리루빈(총 빌리루빈이 1mg/dL를 초과하는 경우, 직접적 빌리루빈)
- [0342] ● 아스파르테이트 아미노전달효소
- [0343] ● 알라닌 아미노전달효소
- [0344] ● 감마 글루타밀 전달효소
- [0345] ● 요소 질소
- [0346] ● 크레아티닌

- [0347] ● 총 단백질
- [0348] ● 알부민
- [0349] ● 글로불린 및 A/G(알부민/글로불린)비(산출치)
- [0350] ● 글루코오스
- [0351] ● 총 콜레스테롤
- [0352] ● 트리글리세리드
- [0353] ● 전해질(나트륨, 칼륨, 클로라이드)
- [0354] ● 칼슘
- [0355] ● 인

[0356] 실시예 8 - 비글리코실화 IgG1 Fc

[0357] 천연 생성 IgG 항체는 중쇄의 불면 도메인 2(CH2)에 글리코실화 부위를 보유한다. 예를 들어, 인간 IgG1 항체는 위치 Asn297(EU 번호지정)에 위치한 글리코실화 부위를 갖는다. 현재까지, 비글리코실화 항체의 제조 전략에는 Asn 잔기를 물리-화학적 특성의 관점에서 Asn과 유사한 아미노산(예, Gln)으로 또는 극성기를 갖지 않는 Asn 측쇄를 모사하는 Ala 잔기로 대체하는 것이 관여된다. 본 실시예는 Asn의 글리신(N297G)으로의 대체의 이점을 나타낸다. N297G Fc는 더 우수한 생물리적 특성 및 제조가능 속성(예로, 정제 동안의 회수)을 갖는 비글리코실화 분자이다.

[0358] Fc 단편 및 IgG 항체의 여러 공지된 결정 구조의 조사는 글리코실화 루프 절편 주위, 특히 글리코실화 위치 Asn297에서 상당한 입체형태 유연성을 드러내었다. 여러 공지된 결정 구조에서, Asn297은 양의 골격 이면각을 채택하였다. Gly은 측쇄 원자의 부재로 인해 양의 골격 이면각을 채택하는 경향성이 높다. 따라서, 상기 입체형태 및 구조적 이유에 기반하여, Gly은 N297Q 또는 N297A보다 Asn에 대해 더 우수한 대체일 수 있다.

[0359] Asn297의 Gly으로의 돌연변이는 정제 공정에서 훨씬 개선된 회수(또는 효율) 및 생물리적 특성을 갖는 비글리코실화 분자로 이어진다. 예를 들어, 단백질 A로부터의 회수 백분율(최종 수율)은 N297Q에 대한 45.6% 및 N297A에 대한 39.6%에 비해 N297G 돌연변이에 있어서 82.6%였다. SPHP 칼럼 분석은 N297Q 및 N297A 돌연변이체에 대한 더 낮은 회수 백분율이 테일링 피크에 기인할 수 있음을 드러내었고, 이는 고분자량 응집 및/또는 폴딩이 잘못된 종을 시사한다. 상기 결과는 더 큰 2L 수준 분석에서도 다시 확인되었다.

[0360] 생물약학 산업에서, 대규모 생산에 대한 잠재적 필요성, 예로 약물로 판매될 가능성을 갖는 분자는 이 분자가 대규모 생산 및 정제에 적합하지 않을 위험을 완화시키기 위해 여러 속성에 대해 평가된다. 제조 가능성 평가에서, N297G는 pH 변화에 대한 강건성을 드러내었다. N297G는 응집 문제를 갖지 않았다; 반면 N297Q 및 N297A는 각각 20% 및 10% 응집이 증가하였다. N297G는 더 우수한 제조 가능 속성을 가졌지만, 이것이 평가되는 모든 기능 분석에서 N297Q 및 N297A와 유사하였다. 예를 들어, ADCC 분석에서, N297G는 N297Q 및 N297A와 유사하게 세포독성이 없었다.

[0361] 실시예 9 - 안정화된 비글리코실화 IgG1 Fc

[0362] 본 실시예는 조작된 디설피드 결합(들)을 도입하여 IgG 항체 골격의 안정성을 개선하는 방법을 설명한다. 천연 생성 IgG 항체는 안정한 분자이다. 그러나 일부 치료적 적용에서, 돌연변이를 제조하거나 비글리코실화 분자를 생성하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 비글리코실화 IgG 분자는 ADCC 및 Fc감마 수용체에 대한 결합을 배제하기 위한 필요성이 존재하는 치료적 적용증에서 이용될 수 있다. 그러나 비글리코실화 IgG1은 글리코실화 IgG1에 비해 훨씬 더 낮은 용점을 갖는다(CH2 도메인 용점이 약 10°C 감소함; 70°C에서 60°C로). 관찰되는 더 낮은 용점은 비글리코실화 IgG1의 다양한 생물리적 특성에 부정적인 영향을 미친다. 예를 들어, 비글리코실화 IgG1은 글리코실화 IgG1에 비해 낮은 pH에서 증가된 응집 수준을 갖는다.

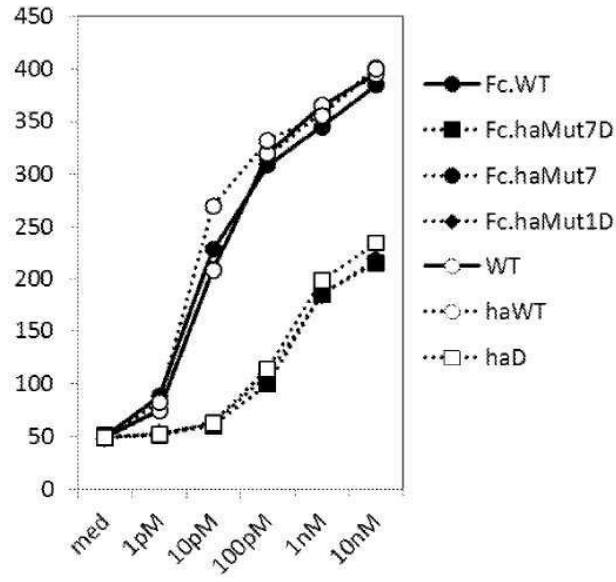
[0363] 디설피드 결합을 조작하기 위해, Cys에 대한 돌연변이를 위해 Fc 영역 내 54 잔기 페어를 확인하기 위해 C-알파 원자 간 거리 계산이 관여되는 구조 기반 방법을 처음에 이용하였다. 이들 54 부위는 이후 4 잔기 페어로 좁혀졌다(V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C, 및 V323C-I332C). 이용된 기준에는 (i) CH2 도메인 내 위치, (ii) 루프, 회전 및 탄수화물로부터 멀어짐, (iii) Fc감마 수용체 및 FcRn 상호작용 부위로부터 멀어짐, (iv) 용매 접근 가능성(바람직한 매물 위치) 등이 포함되었다.

- [0364] 페어를 형성한 시스템인 치환이 비글리코실화 N297G Fc의 맥락에서 생성되었다. 비-환원 펩티드 맵핑 분석은 4 조각 부위 중 3 부위가 예상되고 그 맥락에서 설계된 바와 같은 디설피드 결합을 형성하였음을 드러내었다. V259C-L306C 돌연변이는 디설피드 결합을 정확히 형성하지 않았고, CH2 도메인에 이미 존재하는 천연 디설피드와의 페어링 오류로 이어졌다. 다른 3 설계 R292C-V302C, A287C-L306C, 및 V323C-I332C는 예측되고 설계된 바와 같이 디설피드 결합을 정확히 형성하였다. N297G 돌연변이에 대한 디설피드 결합의 부가는 N297G 돌연변이만에 비해 열 안정성의 약 15°C 개선으로 이어졌다. R292C-V302C, A287C-L306C, 및 V323C-I332C 디설피드 변이체 중, R292C-V302C 및 A287C-L306C는 래트에 투여되는 경우 우수한 약동학을 가졌다($t_{1/2}$ 이 각각 11일 및 9일임). 이는 본 출원인이 $t_{1/2}$ 이 5일인 이전에 공개된 CH2 도메인 디설피드 결합 L247C-K339C에 대해 래트에서 관찰한 약동학 프로파일과 대조된다(Gong 등, *J. Biol. Chem.* 2009 284: 14203-14210).
- [0365] CH2 도메인에서의 디설피드 결합의 조작용 글리코실화 IgG1 분자에 비해 비글리코실화 분자의 안정성을 개선한다(시차 주사 열량측정으로 결정되는 용점의 10 내지 15°C 개선). 본원에 기재된 조각된 부위는 디설피드 뒤섞임으로 이어지지 않으며 디설피드는 모집단의 약 100%에서 예측되는 대로 형성된다. 보다 중요하게는, CH2 도메인에서 공개된 디설피드 결합 부위와는 달리, 본원에 기재된 디설피드 결합은 래트 PK에 영향을 미치지 않는다.
- [0366] 안정화된 비글리코실화 항체의 약동학(PK) 프로필이 게잡이 원숭이에서 결정되었다. N297G, A287C, 및 L306C 치환을 갖는 IgG1 항체(Ab2-1) 및 N297G, R292C, 및 V302C 치환을 갖는 IgG1 항체(Ab2-2)를 게잡이 원숭이(N=2) 내로 5mg/kg 이하 주사하였다. 혈청 표본을 투여 전, 투여 후 0.5, 2, 8, 24, 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 및 1680시간에 수집하였다. 표본을 항-hu IgG 샌드위치 ELISA를 이용하여 Ab2-1 및 Ab2-2 항체 수준에 대해 분석하였다. PK 연구 표본에서 혈청 hu IgG 수준을 측정하기 위해, 하기 방법이 이용되었다: 1/2 면적의 블랙 플레이트(Corning 3694)에 2µg/ml의 PBS 중 항-hu Fc, 항체 1.35.1을 코팅한 뒤 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 이어서 플레이트를 세척하고 4°C에서 하룻밤 동안 I-Block™ (Applied Biosystems)으로 차단하였다. 표본을 희석해야 하는 경우, 게잡이 원숭이 혈청 중에 희석하였다. 이어서 표준물질 및 표본을 1X PBS+1M NaCl+0.5% Tween 20 및 1% BSA 완충액(5% 혈청) 중에 1:20으로 희석하였다. 플레이트를 세척하고 희석된 표준물질 및 표본의 50µl 표본을 항체 1.35.1이 코팅된 플레이트로 옮기고 실온에서 1.5h 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 뒤 100ng/ml의 I-Block™+5% BSA 중 항-hu Fc 항체 21.1-HRP 콘주게이트 50µl를 첨가하고 1.5h 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 뒤 50µl의 Pico 기질을 첨가하고 그 후 플레이트를 발광측정계로 즉시 분석하였다. 경시적 농도 데이터를 WinNonLin®(회사용 버전 5.1.1, 2006, Pharsight® Corp. Mountain View, CA)으로 비구획 방법을 이용해서 분석하였다.
- [0367] 게잡이 원숭이에서 Ab2-1 및 Ab2-2 항체의 PK 노출을 N297G 치환만 포함하는 IgG1 항체 및 N297G, L247C, 및 K339C를 포함하는 IgG1 항체와 비교하였다. 게잡이 원숭이에서 Ab2-1 및 Ab2-2 항체의 PK 노출은 N297G 치환만 포함하는 IgG1 항체 및 N297G, L247C, 및 K339C를 포함하는 IgG1 항체 둘 다에 비해 더 높았다. 또한, Ab2-2는 부모 IgG 항체에 필적하는 노출 및 제거를 가졌다.

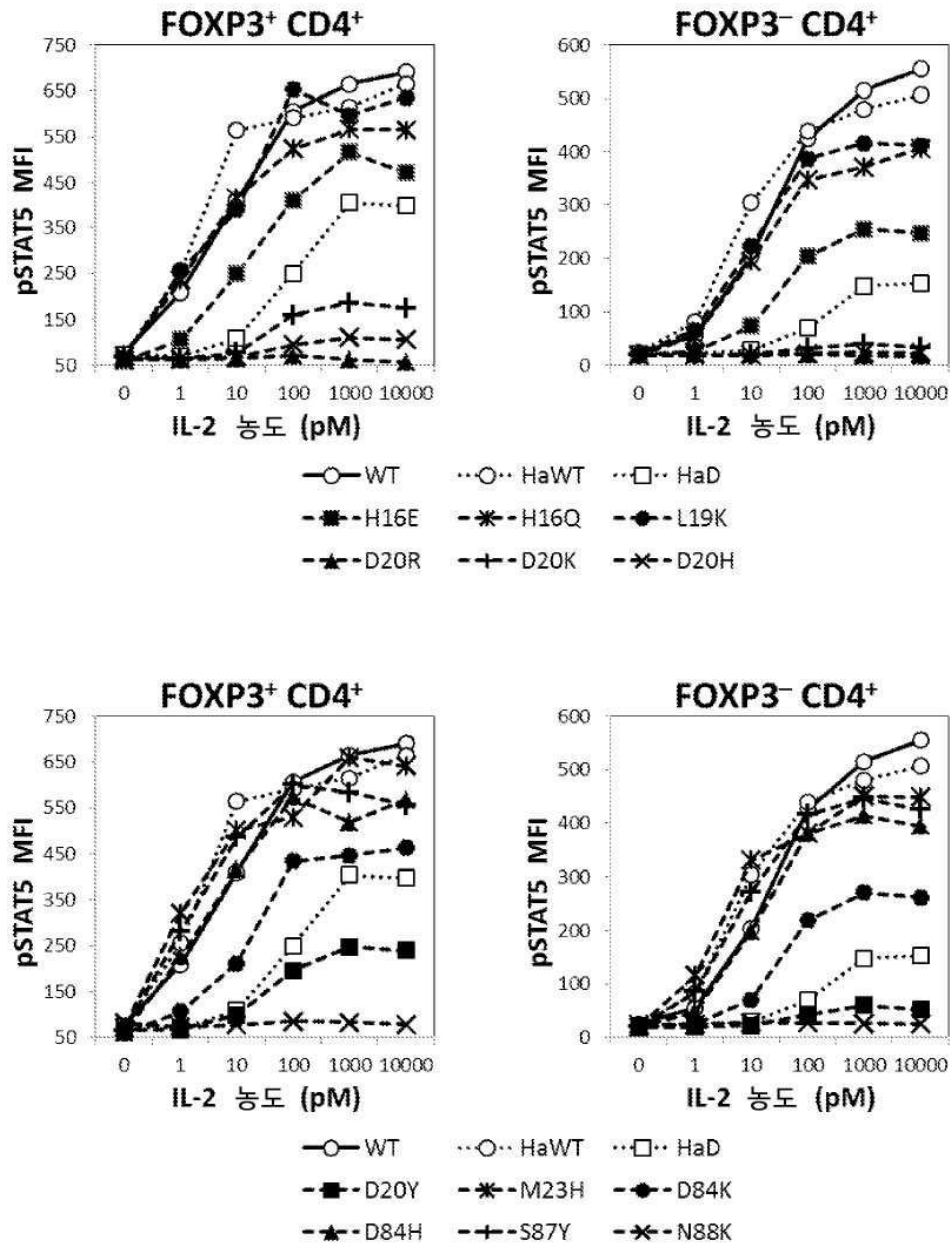
도면

도면1

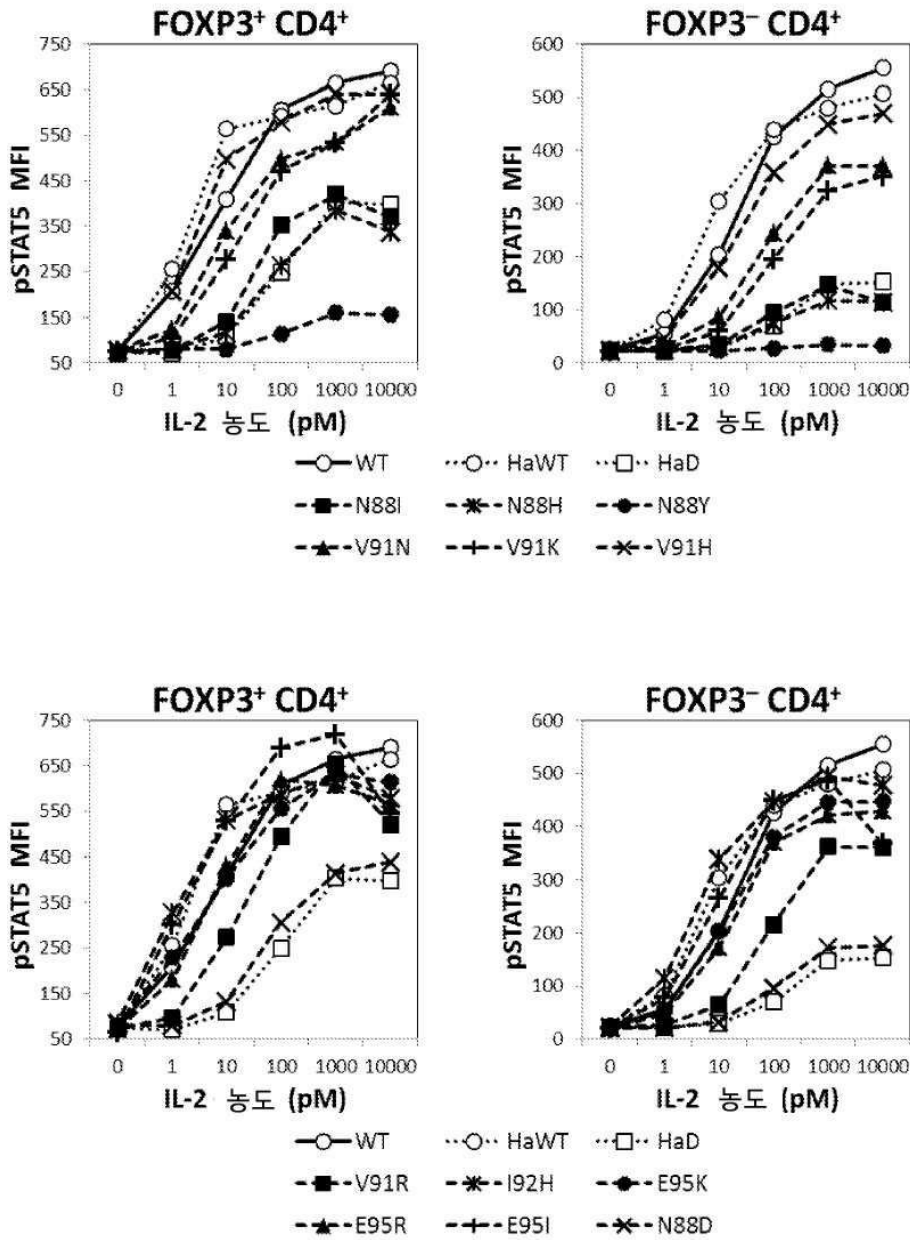
포스포-STAT5
(MFI)



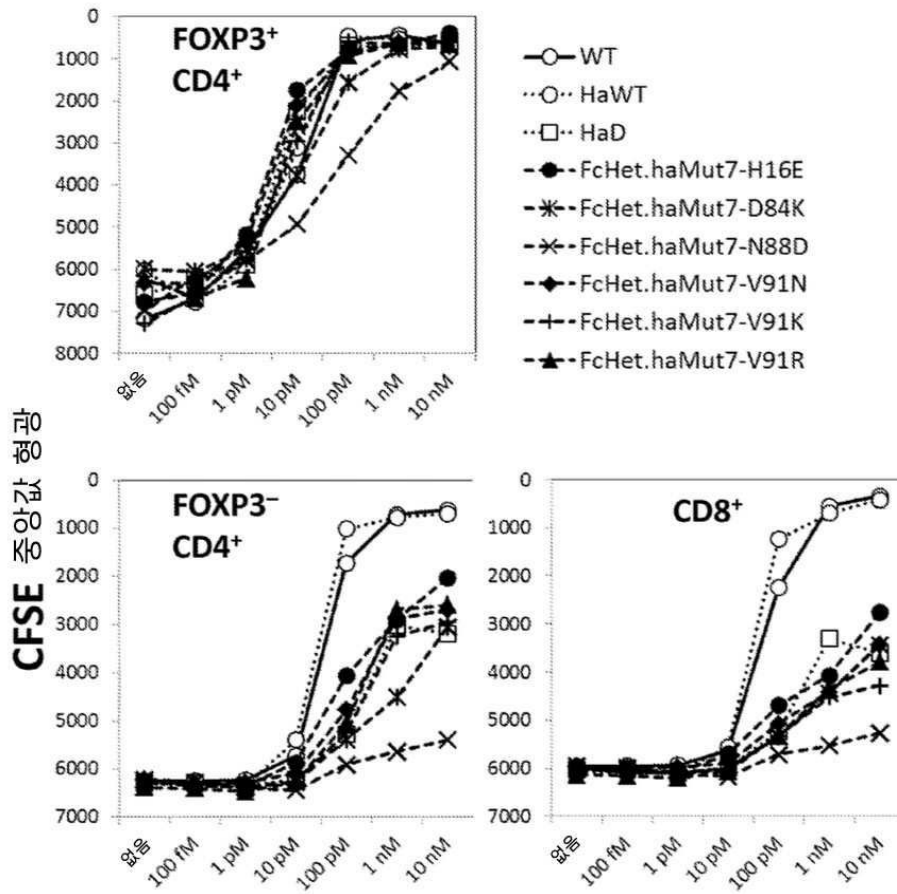
도면2a



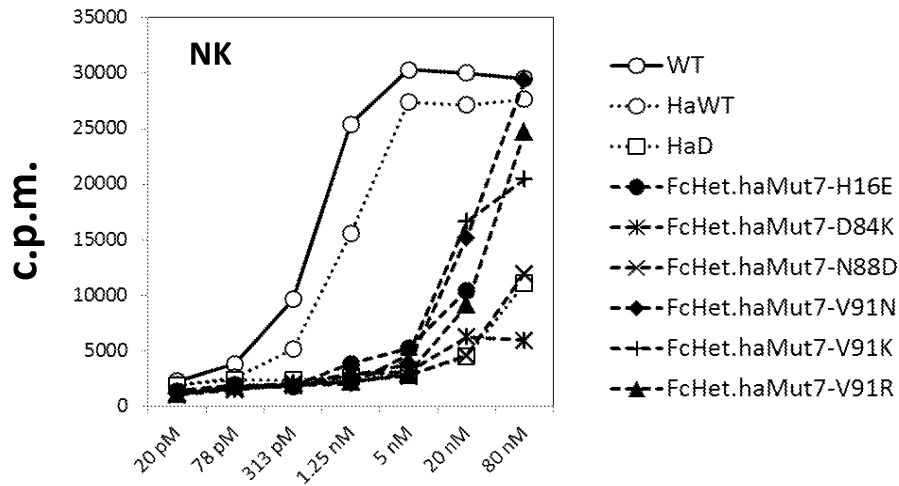
도면2b



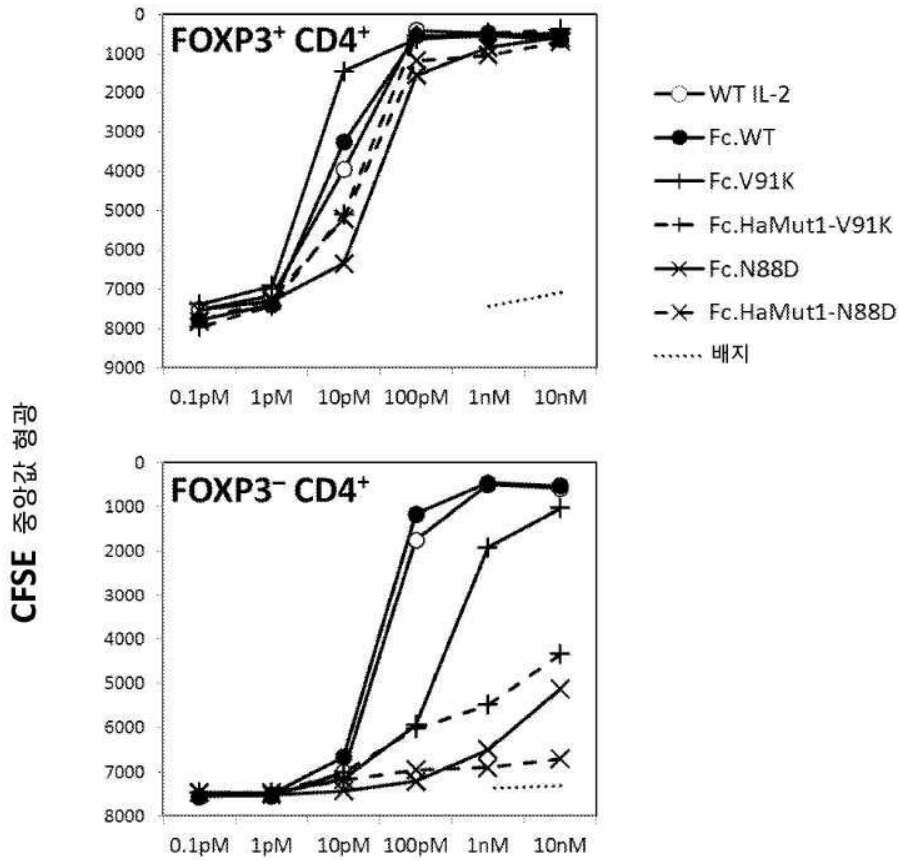
도면3



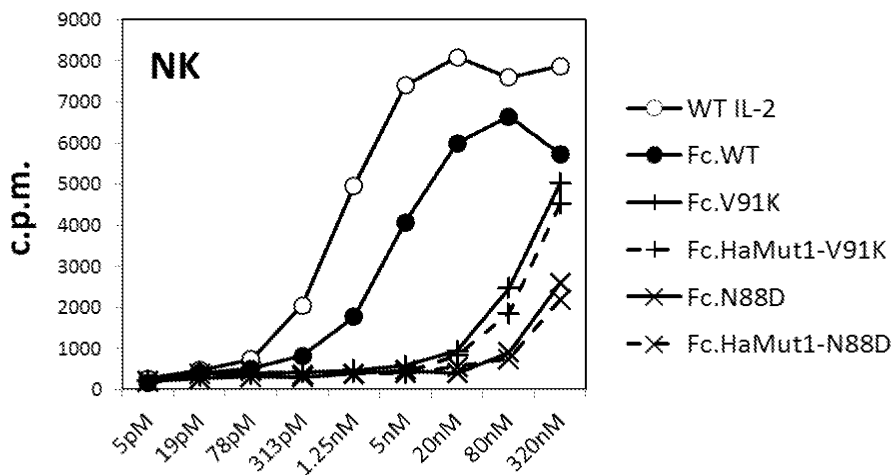
도면4



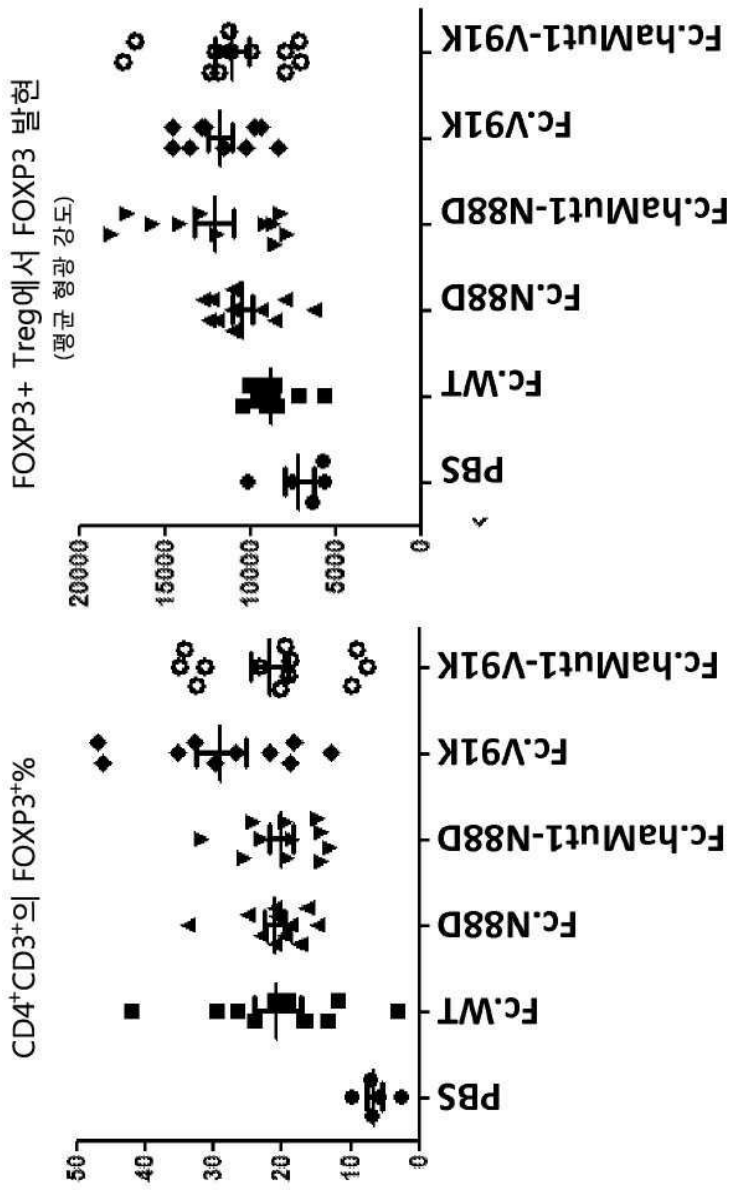
도면5



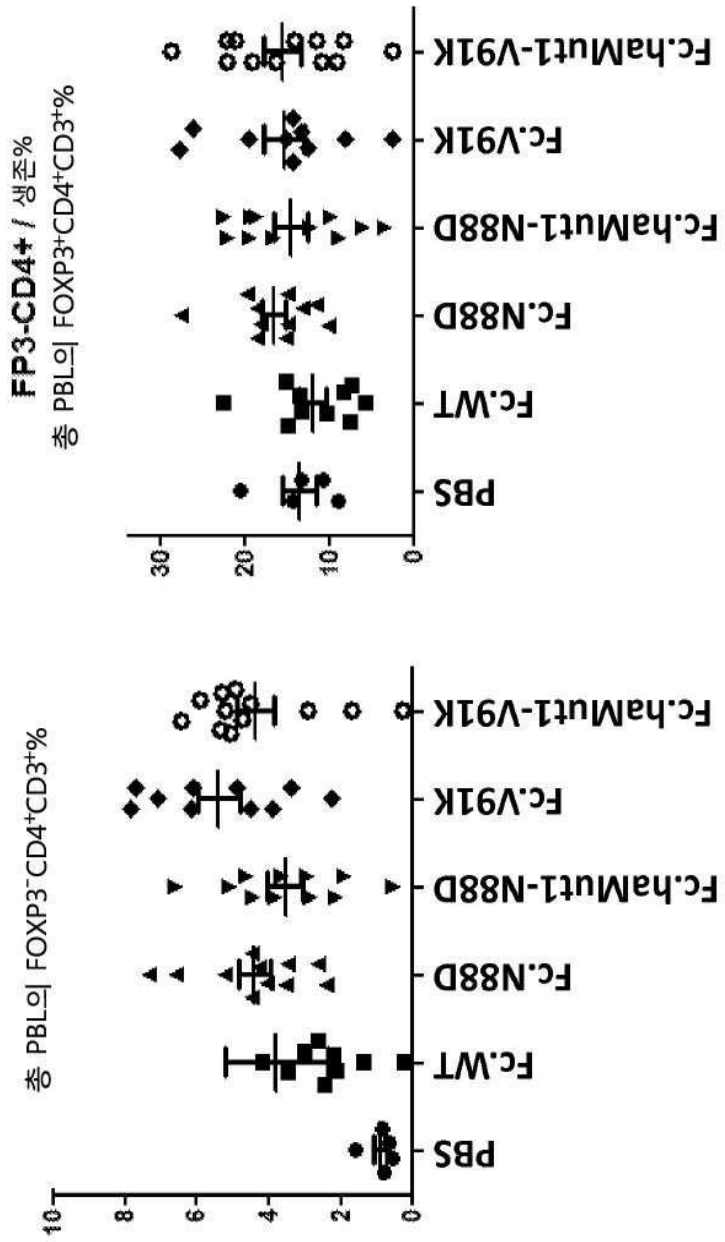
도면6



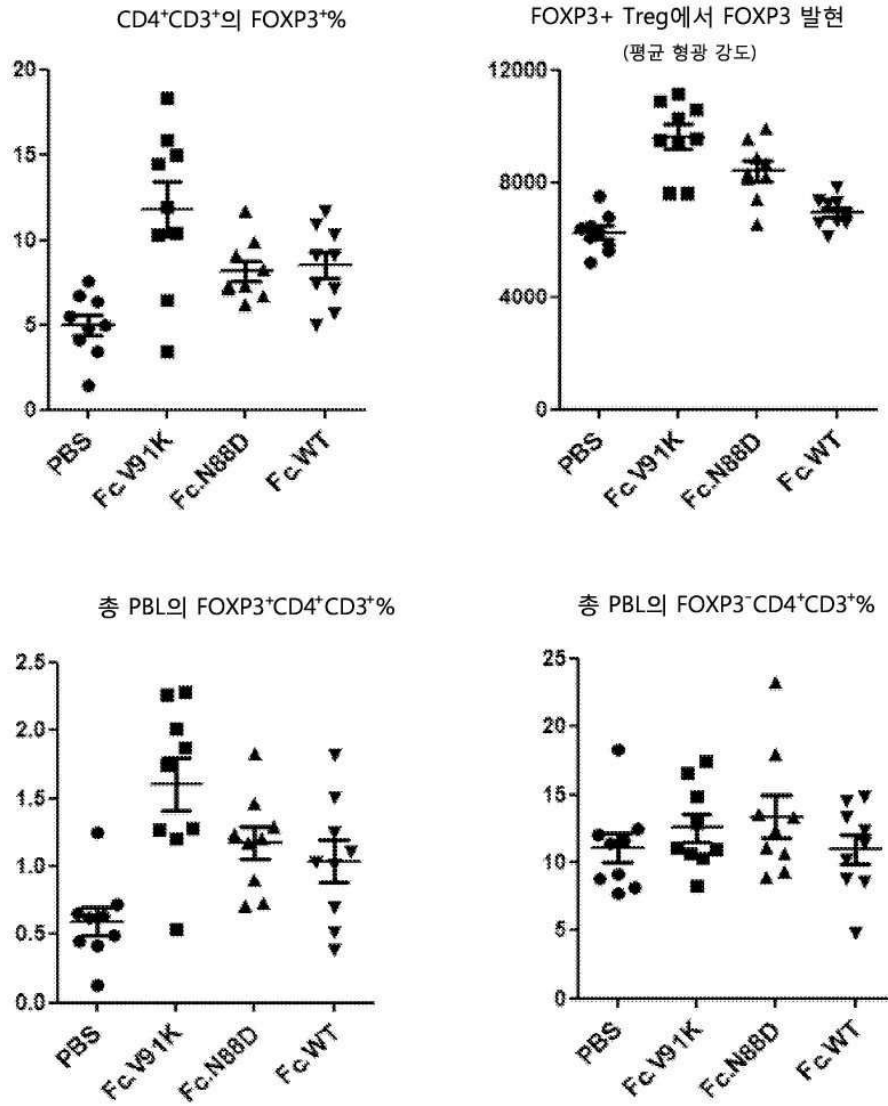
도면7a



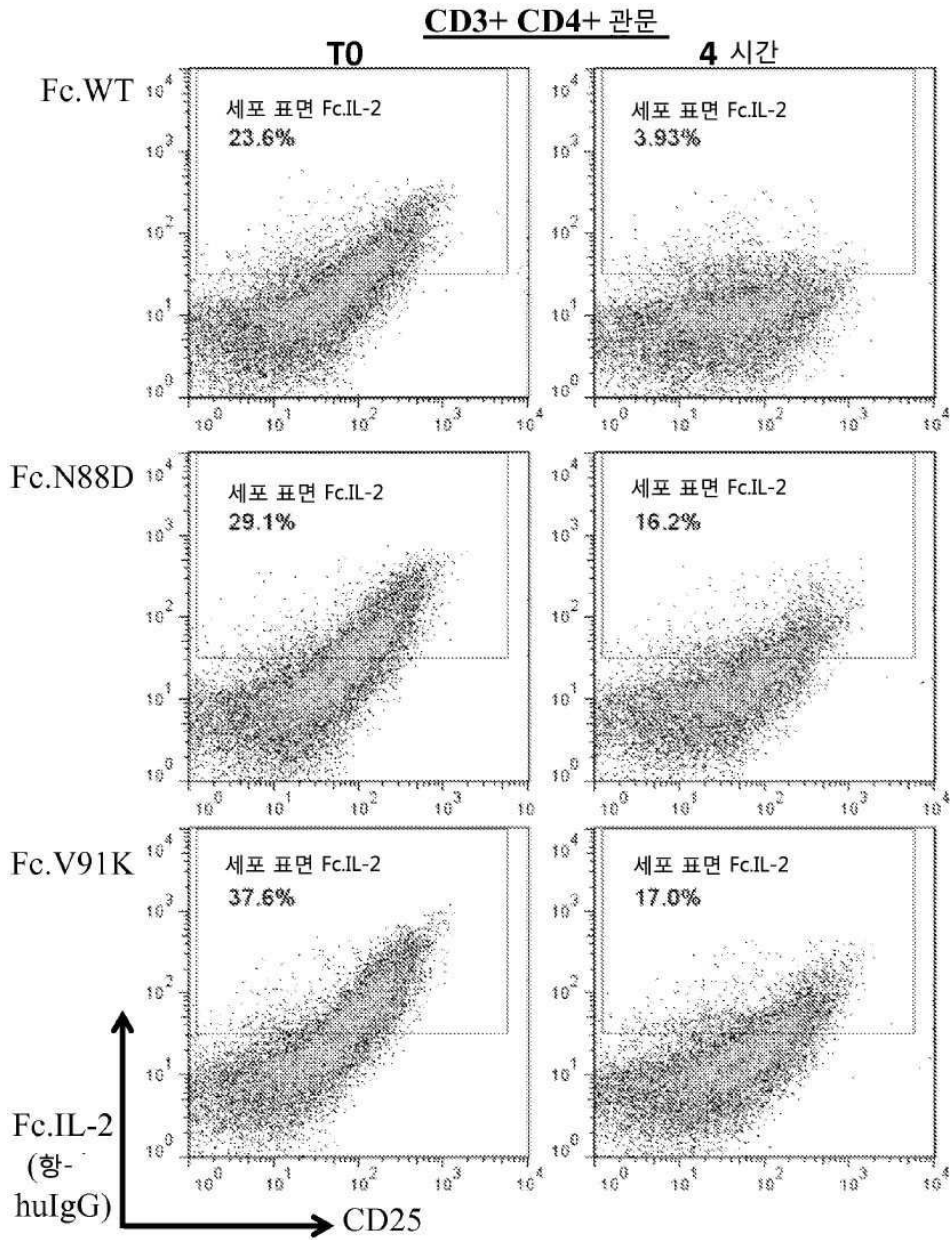
도면7b



도면8



도면9



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN INC.

<120> AGLYCOSYLATED Fc-CONTAINING POLYPEPTIDES

<130> A-1892-WO-PCT

<150> 61/784,669

<151> 2013-03-14

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val or Ala

<400> 1

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

1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu

 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

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

 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210

> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val or Ala

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225
 <210> 4
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 4
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

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

 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly
 225
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

Gly Gly Asn Gly Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

Tyr Gly Asn Gly Thr

1 5

<210> 8

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 9

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Ser Tyr Lys
 20 25 30

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

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

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

100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 10
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 10
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

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

 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 11
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

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

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

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

```

                100                105                110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
                115                120                125
Ile Ser Thr Leu Thr
                130
<210>
> 14
<211> 133
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 14
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1                5                10                15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
                20                25                30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
                35                40                45

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

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
                115                120                125
Ile Ser Thr Leu Thr
                130
<210> 15
<211> 133
<212> PRT

```

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 16

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

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

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

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

 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270
 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

115	120	125		
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser				
130	135	140		
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu				
145	150	155	160	
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro				
	165	170	175	
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val				
180	185	190		
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met				
195	200	205		
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser				
210	215	220		
Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys				
225	230	235	240	
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu				
	245	250	255	
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr				
260	265	270		
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln				
275	280	285		
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala				
290	295	300		
Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile				
305	310	315	320	
Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys				
325	330	335		
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp				
340	345	350		
Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr				
355	360			

<210> 18
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 18

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

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

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

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

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

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

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

 <210> 19
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 19

 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

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

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

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

 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270
 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

115	120	125	
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
130	135	140	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
165	170	175	
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
180	185	190	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
195	200	205	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
210	215	220	
Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys			
225	230	235	240
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu			
245	250	255	
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr			
260	265	270	
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln			
275	280	285	
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala			
290	295	300	
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile			
305	310	315	320
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys			
325	330	335	
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp			
340	345	350	
Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
355	360		

<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag
 <400> 21

His His His His His His

1 5

<210> 22

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

 35 40

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 24

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 26

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 1 5 10 15
 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

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

<400> 27

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

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

 20 25

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

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

1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

 20 25

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 29

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

1 5 10 15

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

 20

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 30

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

1 5 10 15

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20

<210> 35

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 36

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 37

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Thr Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 39

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Cys Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly

225

<210> 40

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Cys Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly
 225
 <210> 41
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

 <400> 41

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

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

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

 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly
 225
 <210> 42
 <211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 42

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 43
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
 <400> 43
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 44

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 44

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225