(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0035049
(43) 공개일자 2025년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/55 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/715* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/55 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7000196
(22) 출원일자(국제) 2023년06월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년01월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/067844
(87) 국제공개번호 WO 2023/235848
국제공개일자 2023년12월07일
(30) 우선권주장
63/349,079 2022년06월04일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
우, 지아시
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
파텔, 수프리야
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

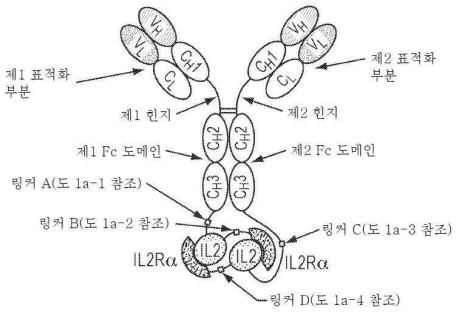
전체 청구항 수 : 총 56 항

(54) 발명의 명칭 **인터루킨-2 프로프로테인 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 IL2Rα 부분으로 차폐된 IL2 부분 및 프로테아제-절단성 링커를 포함하고, 예를 들어 종양 부위에서 프로테아제의 작용으로 IL2Rα 부분이 IL2 부분으로부터 방출되도록 구성된 IL2 전구단백질을 제공한다. IL2 전구단백질은 선택적으로 표적화 부분, 예를 들어 종양 관련 항원을 인식하고 전구단백질을 종양 부위로 보내는 표적화 부분을 추가로 포함한다. 본 개시내용은 IL2 전구단백질을 포함하는 약학적 조성물, 치료에서 IL2 전구단백질을 사용하는 방법, IL2 전구단백질을 인코딩하는 핵산, IL2 전구단백질을 발현하는 재조합 세포 및 IL2 전구단백질을 생산하는 방법을 추가로 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7155 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)

(72) 발명자
장, 통
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
블로치, 니콜린
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
스미스, 에릭
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
린, 치아-양
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
가르그, 비두르
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
울만, 에리카
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

(30) 우선권주장
63/355,382 2022년06월24일 미국(US)
63/387,006 2022년12월12일 미국(US)
63/481,096 2023년01월23일 미국(US)
63/493,551 2023년03월31일 미국(US)
63/500,997 2023년05월09일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

1. IL2 전구단백질로서:

(a) N-말단에서 C-말단 순서로 다음을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬:

(i) 제1 표적화 부분 또는 이의 성분;

(ii) 제1 Fc 도메인;

(iii) 프로테아제-절단성 링커(PCL) 또는 비절단성 링커("NCL")인 제1 링커;

(iv) 제1 IL2 부분;

(v) 프로테아제-절단성 링커(PCL)인 제2 링커; 및

(vi) 제1 IL2Rα 부분; 및

(b) N-말단에서 C-말단 순서로 다음을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬:

(i) 제2 표적화 부분 또는 이의 성분;

(ii) 상기 제1 Fc 도메인과 결합하여 Fc 영역을 형성할 수 있는 제2 Fc 도메인;

(iii) 프로테아제-절단성 링커(PCL) 또는 비절단성 링커("NCL")인 제3 링커;

(iv) 제2 IL2 부분;

(v) 프로테아제-절단성 링커(PCL)인 제4 링커; 및

(vi) 제2 IL2Rα 부분, 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 IL2 부분이 성숙한 인간 IL2와 적어도 약 90% 또는 약 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IL2 부분이 성숙한 인간 IL2와 비교하여 N-말단 알라닌 결실을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 있어서, 상기 IL2 부분이 야생형 IL2와 비교하여 N88 위치에 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 선택적으로 상기 아미노산 치환이 N88D이고/이거나 (b) 야생형 IL2와 비교하여 아미노산 치환 C125S, C125A 또는 C125V을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한항에 있어서, 상기 IL2Rα 부분이 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 IL2 전구단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 IL2Rα 부분이 (a) IL2Rα의 아미노산 22-186, (b) IL2Rα의 아미노산 22-240, 및/또는 (c) 인간 IL2Rα의 아미노산 22-272와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적

어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 링커, 상기 제4 링커, 선택적으로 상기 제1 링커, 선택적으로 상기 제3 링커, 또는 전술한 것 중 두개 이상 또는 모두의 임의의 조합(예를 들어, (i) 제1 및 제3 링커, (ii) 제2 및 제4 링커, (iii) 제1 및 제2 링커, (iv) 제3 및 제4 링커, (v) 제1, 제2, 제3 및 제4 링커)은 (a) 표 A에 제시된 임의의 프로테아제에 의해 절단 가능한 기질 서열, (b) 표 B에 제시된 기질 서열로부터 선택된 하나 이상의 기질 서열, (c) 표 C에 제시된 기질 서열로부터 선택된 하나 이상의 스페이서 서열, 및/또는 (d) 표 D에 제시된 임의의 PCL 서열의 아미노산 서열 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 그 변이체, 예를 들어 1개의 아미노산 치환, 2개의 아미노산 치환, 3개의 아미노산 치환, 4개 아미노산 치환, 또는 5개 아미노산 치환을 갖는 변이체를 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에있어서, 상기 제1 및 제3 링커가 동일하고/하거나 상기 제3 및 제4 링커가 동일한 IL2 전구단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 링커가 동일한 IL2 전구단백질.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제3 링커가 비절단성 링커인 IL2 전구단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 비절단성 링커가 표 E에 제시된 임의의 NCL 서열을 포함하거나 이로 구성되는 IL2 전구단백질.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 제1및 제3 링커가 (a) 길이가 2개 내지 60개 아미노산, 5개 내지 25개 아미노산, 또는 7개 내지 20개 아미노산 범위이거나, (b)길이가 5개 이상의 아미노산인 IL2 전구단백질.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 링커가 프로테아제-절단성 링커인 IL2 전구단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 링커의 길이가 20개 아미노산 내지 80개 아미노산 또는 20개 아미노산 내지 60개 아미노산 범위인 IL2 전구단백질.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 Fc 도메인 및/또는 상기 제2 Fc 도메인이 힌지 도메인을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적화 부분 및/또는 상기 제2 표적화 부분이 Fab인 IL2 전구단백질.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적화 부분 및/또는 상기 제2 표적화 부분이 scFv인 IL2 전구단백질.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 섹션 6.7에서 확인된 임의의 표적 분자에 결합할 수 있는 IL2 전구단백질.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 신데칸, 헤파라나제, 인테그린, 오스테오폰틴, 링크, 카드헤린, 라미닌, 라미닌 유형 EGF, 렉틴, 피브로넥틴, 노치, 넥틴(예: 넥틴-4), 테나신, 콜라겐(예: X형 콜라겐) 및 매트릭스신으로부터 선택적으로 선택되는 ECM 항원에 결합할 수 있는 IL2 전구단백질.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자에 결합할 수 있는 IL2 전구단백질.

청구항 21

제20항에 있어서, 항원은 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 및 B7-H3으로부터 선택적으로 선택되는 T 세포 공동자극 단백질인 IL2 전구단백질.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 CTLA-4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1 및 CHK2로부터 선택적으로 선택된 관문 억제제에 결합할 수 있는 IL2 전구단백질.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 AFP, ALK, BAGE 단백질, BIRC5(서바이빈), BIRC7, β-카테닌, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, 탄산 탈수효소 IX, 캐스페이스-8, CALR, CEACAM5(암배아 항원 또는 CEA라고도 함), CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, 사이클린-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질(예: GAGE-1 또는 -2), GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE 단백질(예: MAGE-1, -2, -3, -4, -6 및 -12), MART-1, 메조텔린, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLH1), RAGE 단백질, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, 톰슨-누벨 항원(Tn), TRP-1, TRP-2, 티로시나제 및 유로플라킨-3으로부터 선택적으로 선택된 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 IL2 전구단백질.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역이 동종이량체인 IL2 전구단백질.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역이 이종이량체인 IL2 전구단백질.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 도 1a에 도시된 구성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 도 2a에 도시된 구성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 28

선택적으로 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 IL2 전구단백질인 IL2 전구단백질로서, 상기 IL2 전구단백질,

(a) N-말단에서 C-말단 순서로 다음을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬:

(i) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제1 아미노산 서열;

(ii) (1) 표 B에 제시된 하나 이상의 서열, 또는 (2) 표 E에 제시된 서열을 포함하는 제2 아미노산 서열;

(iii) 서열번호:7과 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 제3 아미노산 서열;

(iv) 표 B에 제시된 서열을 포함하는 제4 아미노산 서열; 및

(v) 서열번호 8, 9 및 10 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제5 아미노산 서열; 및

(b) N-말단에서 C-말단 순서로 다음을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬:

(i) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제6 아미노산 서열;

(ii) (1) 표 B에 제시된 하나 이상의 서열, 또는 (2) 표 E에 제시된 서열을 포함하는 제7 아미노산 서열;

(iii) 서열번호:7과 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 제8 아미노산 서열;

(iv) 표 B에 제시된 서열을 포함하는 제9 아미노산 서열; 및

(v) 서열번호:8, 9, 또는 10과 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 제10 아미노산 서열, 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드가 상기 제1 아미노산 서열의 N-말단에 서열번호 11, 12, 13, 또는 14 중 어느 하나와 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 제11 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드가 상기 제1 아미노산 서열의 N-말단에 서열번호 11, 12, 13, 또는 14 중 어느 하나와 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 제12 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 아미노산 서열이 서열 번호:1, 2, 3, 4, 5 또는 6 중 어느 하나와 적어도 약 98% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제6 아미노산 서열이 서열 번호:1, 2, 3, 4, 5 또는 6 중 어느 하나와 적어도 약 98% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제2 아미노산 서열이 (a) 표 B에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열, 또는 (b) 표 D에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 34

제28항 내지 제32항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제2 아미노산 서열이 표 E에 제시된 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

청구항 35

제28항 내지 제34항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제2 아미노산 서열의 길이가 25개 이하, 15개 이하, 또는 6개 이하 아미노산인 IL2 전구단백질.

청구항 36

제28항 내지 제35항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제7 아미노산 서열이 (a) 표 B에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열, 또는 (b) 표 D에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 37

제28항 내지 제35항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제7 아미노산 서열이 표 E에 제시된 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

청구항 38

제28항 내지 제37항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제7 아미노산 서열의 길이가 25개 이하, 15개 이하, 또는 6개 이하 아미노산인 IL2 전구단백질.

청구항 39

제28항 내지 제38항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제3 아미노산 서열이 서열번호:7과 적어도 약 98% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 40

제28항 내지 제39항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제8 아미노산 서열이 서열번호:7과 적어도 약 98% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 41

제28항 내지 제40항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제4 아미노산 서열이 (a) 표 B에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열, 또는 (b) 표 D에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 42

제28항 내지 제41항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제9 아미노산 서열이 (a) 표 B에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열, 또는 (b) 표 D에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

청구항 43

제28항 내지 제42항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제9 아미노산 서열이 표 D에 제시된 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

청구항 44

제28항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제5 아미노산 서열이 서열 번호:8, 9, 또는 10과 적어도 약 98% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 45

제28항 내지 제44항 중 어느 한항에 있어서, 상기 제10 아미노산 서열이 서열 번호:8, 9, 또는 10과 적어도 약 98% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

청구항 46

제28항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬에는 상기 제1 아미노산 서열의 C-말단에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

청구항 47

제28항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 (a) 제1 및 제2 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있고, (b) 제2 및 제3 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있고, (c) 제3 및 제4 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있고, 및/또는 (d) 제4 및 제5 아미노산 서열 사이

에 추가 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

청구항 48

제28항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬에는 상기 제6 아미노산 서열의 C-말단에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

청구항 49

제28항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 (a) 제6 및 제7 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있고, (b) 제7 및 제8 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있고, (c) 제8 및 제9 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있고, 및/또는 (d) 제9 및 제10 아미노산 서열 사이에 추가 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 IL2 전구단백질을 인코딩하는 핵산 또는 다수의 핵산.

청구항 51

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 IL2 전구단백질 또는 제50항의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포.

청구항 52

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 IL2 전구단백질을 생산하는 방법으로서, 제51항의 숙주 세포를 배양하고 이에 의해 발현된 IL2 전구단백질을 회수하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 53

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 IL2 전구단백질 및 부형제를포함하는 약학적 조성물.

청구항 54

암 치료를 필요로 하는 대상에게 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항의 IL2 전구단백질 또는 제53항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암치료 방법.

청구항 55

IL2 단백질의 국소 전달 방법, 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IL2 단백질로 암을 치료하는 방법, 감소된 전신 노출 및/또는 감소된 전신 독성으로 대상에 IL2 치료제를 투여하는 방법, 활성화된 IL2 단백질을 암 조직에 표적으로 전달하는 방법, 또는 표적 조직에서 면역 반응을 국소적으로 유도하는 방법으로서, 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 IL2 전구단백질(또는 IL2 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 대상에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 IL2 전구단백질은 IL2 단백질이 국소적으로 전달될 조직(예: 암 조직)에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 방법.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 투여가 비국소적으로 이루어지는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2022년 6월 4일에 출원된 미국 가출원 제63/349,079호, 2022년 6월 24일에 출원된 미국 가출원 제63/355,382호, 2022년 12월 12일에 출원된 미국 가출원 제63/387,006호, 2023년 1월 23일에 출원된 미국 가출원 제63/481,096호, 2023년 3월 31일에 출원된 미국 가출원 제63/493,551호, 및 2023년 5월 9일에 출원된 미국 가출원 제63/500,997호의 우선권을 주장하며 각 내용은 참조를 통해 전체 내용이 본 문서에 포함된다.

[0002] **서열 목록**

[0003] 본 출원은 전자로 제출되고 본원에 의해 그 전체가 참고로 포함된 서열 목록을 함유한다. 2023년 5월 31일에 생성된 상기 사본은 명칭이 RGN-023WO_SL.xml이고, 크기가 332,645 바이트이다.

배 경 기 술

[0004] 인터루킨 2(IL-2 또는 IL2)는 주로 CD4+ 보조 T 세포가 생성하는 다능성 사이토카인이다. 이는 T 세포의 증식과 분화를 자극하고, 세포독성 T 림프구(CTL)의 생성과 말초혈액 림프구의 세포독성 세포와 림포카인 활성화 킬러(LAK) 세포로의 분화를 유도하고, T 세포에 의한 사이토카인 및 세포용해 분자 발현을 촉진하며, B 세포의 증식 및 분화와 B 세포에 의한 면역글로불린의 합성을 촉진하고 자연살해(NK) 세포의 생성, 증식 및 활성화를 자극한다(Waldmann, 2009, Nat Rev Immunol 6:595-601 및 Malek, 2008, Annu Rev Immunol 26:453-79 참조).

[0005] 다면적인 영향으로 인해 IL2는 종양 성장 억제에 최적은 아니다. 항신생물제로서 IL2는 종양 반응에 필요한 용량에 수반되는 심각한 독성으로 인해 사용이 제한되었다. Proleukin®(Prometheus Laboratories(캘리포니아주 San Diego 소재)에서 시판)은 전이성 흑색종 및 전이성 신장암 치료용으로 승인된 재조합 형태의 IL2이지만 부작용이 극히 심각하여 집중 치료를 받을 수 있는 병원 환경에서만 사용이 권장된다. 고용량 IL2 요법을 투여받는 환자는 심각한 심혈관, 폐, 신장, 간, 위장, 신경, 피부, 혈액 및 전신 이상사례를 경험하는 경우가 많아 집중적인 모니터링과 입원 관리가 필요하다. IL2 요법의 주요 부작용은 혈관 누출 증후군(VLS)으로, 이로 인해 폐와 간에 간질액이 축적되어 폐부종과 간 손상을 초래한다. VLS에 대한 치료법은 IL2 중단 외에는 없다. VLS를 피하기 위해 환자를 대상으로 저용량 IL2 용법을 테스트했으나 최적의 치료 결과에 미치지 못했다. IL2가 폐 내피 세포에 직접 결합함으로써 IL2-유발 폐부종을 초래하는 것으로 나타났으며, 이는 기능적 고친화성 IL2 수용체의 낮거나 중등도의 수치로 발현된다(Krieg 등, 2010, Proc Nat Acad Sci USA 107:11906-11).

[0006] IL2 암 요법의 독성을 감소시키기 위한 목적으로 다양한 IL2 변이체 및 전구약물이 생성되었다. 그러나 놀랍게도 이러한 분자는 암 요법의 치료 지수가 불량하다는 사실이 밝혀졌다. 예를 들어, PEG화 IL2 전구약물 벰페갈데스루킨은 3상 임상 연구에서 흑색종 환자의 PD1 면역관문 억제제의 치료적 효능을 개선하지 못하였다(Mullard, 2022, Nature Reviews Drug Discovery 21:327 (doi: https://doi.org/10.1038/d41573-022-00069-3)).

[0007] 따라서, 개선된 치료 유효성 및 안전성 프로파일을 가진 새로운 IL2 요법이 당업계에 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 프로테아제(*예:* 종양 환경에서 발현되는 프로테아제)에 의해 활성화되는 IL2 전구단백질에 관한 것이다.

[0009] IL2 전구단백질은 IL2Rα 부분이 마스킹하는 IL2 부분을 포함하며, 이러한 마스킹 부분은 프로테아제에 의한 절단 후에 방출되도록 구성된다. IL2 전구단백질은 바람직하게는 IL2 전구단백질을 특정 조직 또는 세포 유형으로 유도하는 표적화 부분을 추가로 포함한다.

[0010] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 각각 N-말단에서 C-말단까지 Fc 도메인, 절단성 또는 비절단성 일수 있는 제1 링커, IL2 부분, 프로테아제-절단성인 제2 링커 및 IL2Rα 부분을 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. IL2 전구단백질은 *예를 들어*, Fc 도메인 중 하나 또는 둘 다의 N-말단, 표적화 부분(또는 이의 성분, *예를 들어* Fab의 한 사슬)을 추가로 포함할 수 있다. 표적화 부분은 예를 들어 종양 표면에 존재하는 표적 분자(*예를 들어* 종양 관련 항원) 또는 종양 미세환경의 다른 성분(*예를 들어* 세포외 기질("ECM") 또는 종양 림프구)에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인("ABD")을 포함한다.

[0011] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 사용될 수 있는 예시적인 IL2 모이어티는 섹션 6.3에 기술되어 있다.

[0012] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 사용될 수 있는 예시적인 IL2Rα 모이어티는 섹션 6.4에 기술되어 있다.

[0013] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 사용될 수 있는 프로테아제-절단성 링커는 섹션 6.5에 기술되어 있다.

[0014] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 사용될 수 있는 비절단성 링커는 섹션 6.6에 기술되어 있다.

[0015] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 사용될 수 있는 표적화 부분은 섹션 6.7에 기술되어 있고 표적화 부분의 형식은 섹션 6.8에 개시하고 있다.

[0016] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 통합될 수 있는 Fc 도메인은 섹션 6.9에 기술되어 있다.

[0017] 본 개시내용의 예시적인 IL2 전구단백질은 섹션 6.2 및 넘버링된 실시형태 1 내지 165에 기술되어 있다.

[0018] 본 개시내용은 개시내용의 IL2 전구단백질을 인코딩하는 핵산을 추가로 제공한다. IL2 전구단백질을 인코딩하는 핵산은 단일 핵산(*예:* IL2 전구단백질의 모든 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 벡터) 또는 복수의 핵산(*예:* IL2 전구단백질의 다른 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 2개 이상의 벡터)일 수 있다. 본 개시내용은 본 개시내용의 핵산 및 IL2 전구단백질을 발현하도록 조작된 숙주 세포 및 세포주를 추가로 제공한다. 본 개시내용은 개시내용의 IL2 전구단백질을 생산하는 방법을 추가로 제공한다. 예시적인 핵산, 숙주 세포, 세포주 및 IL2 전구단백질을 생산하는 방법은 섹션 6.10 및 실시형태 166 내지 168번에 설명되어 있다.

[0019] 본 개시내용은 개시내용의 IL2 전구단백질을 포함하는 약학적 조성물을 추가로 제공한다. 예시적인 약학적 조성물은 섹션 6.11 및 넘버링된 실시형태 169에 기술되어 있다.

[0020] *예를 들어,* 암을 치료하기 위해 본 개시내용의 IL2 전구단백질 및 약학적 조성물을 사용하는 방법을 본원에서 추가로 제공한다. 예시적인 방법은 섹션 6.12 및 넘버링된 실시형태 170 내지 208에 기술되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] **도 1a 내지 도 1b.** 도 1a는 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 예시적인 표적화된 IL2 전구단백질의 예시이다. 비록 도 1a의 표적화 부분은 Fab로 예시되어 있지만, 표적화 부분은 다른 형식, *예를 들어* scFv 또는 섹션 6.8에 설명된 다른 형식일 수 있다. 도 1a-1 내지 1a-4는 각각 절단 가능 기질의 양쪽에 스페이서(각각 A1, A2, B1, B2, C1, C2 및 D1, D2)를 포함하는 링커 A, B, C 및 D의 실시형태에 대한 클로즈업 뷰를 예시한다. 기질 및 스페이서 서열의 수는 단지 예시 목적일 뿐이며, 프로테아제 절단 가능 링커는 섹션 6.5에 자세히 설명된 바와 같이 일반적으로 다중 기질 및 스페이서 서열을 가질 것으로 예상된다. 도 1b는 표적화 부분이 TAA에 결합하는 경우인 도 1a에 따른 예시적인 표적화된 IL2 전구단백질의 활성화 메커니즘을 예시한다. 본 명세서에 개시된 바와 같이 다른 표적에 결합하는 표적화 부분이 사용될 수 있다.

도 2a 내지 도 2d 도 2a는 2개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 예시적인 표적화된 IL2 전구단백질의 예시이다. 비록 도 2a의 표적화 모이어티는 Fab로 예시되어 있지만, 표적화 모이어티는 다른 형식(*예:* scFv 또는 섹션 6.8에 설명된 다른 형식)일 수있다. 도 2a-1 및 도 2a-2는 절단 가능 기질의 양쪽에 각각 스페이서(각각 B1, B2 및 D1, D2)를 포함하는 링커 B 및 D의 실시형태의 확대도를 예시한다. 기질 및 스페이서 서열의 수는 단지 예시 목적일 뿐이며, 프로테아제 절단 가능 링커는 섹션 6.5에 자세히 설명된 바와 같이 일반적으로 다중 기질 및 스페이서 서열을 가질 것으로 예상된다. 도 2b 내지 도 2d는 표적화 부분이 TCA에 결합하는 경우인 도 2a에 따른 예시적인 표적화된 IL2 전구단백질의 활성화 메커니즘을 예시한다. 결과적으로 활성화된 IL2 단백질은 하나 또는 둘 모두의 IL2 부분을 통해 T 세포 상의 IL2 수용체에 결합할 수 있고(도 2b에 예시됨), 하나 또는 둘 모두의 표적화 부분을 통해 T 세포 상의 TCA에 결합할 수 있고(도 2c에 예시됨), 또는 하나 또는 둘 모두의 IL2 부분을 통해 T 세포의 IL2 수용체에 결합하고, 하나 또는 둘 모두의 표적화 부분을 동일한 T 세포의 TCA에 동시에 결합할 수 있다(도 2D에 예시됨). 본 명세서에 개시된 바와 같이 다른 표적에 결합하는 표적화 부분이 사용될 수 있다.

도 3a 내지 도 3e는 절단성 및 비절단성 링커를 포함하는 EGFR 표적화 또는 비표적화된 IL2 전구단백질의 *생체내* 항종양 효능을 보여준다. 도 3a는 EGFR 표적화된 IL2 전구단백질, 비표적화된 IL2 전구단백질, 및 동종형 대조군의 평균 항종양 효능을 비교하는 그래프이다. 도 3b 내지 도 3e는 각각 개별 마우스에서 단일 IL2 전구단백질 또는 대조군의 항종양 효능을 나타낸다.

도 4a 내지 도 4d는 절단성 및 비절단성 링커를 포함하는 PD1 표적화 또는 비표적화된 IL2 전구단백질의 *생체내* 항종양 효능을 보여준다. 도 4a는 PD1 표적화된 IL2 전구단백질, 비표적화된 IL2 전구단백질, 및 동종형 대조군의 평균 항종양 효능을 비교하는 그래프이다. 도 4b 내지 도 4e는 각각 개별 마우스에서 단일 IL2 전구단백질 또는 대조군의 항종양 효능을 나타낸다.

도 5a 내지 도 5b는 uPA 소화 및 비소화 IL2 전구단백질 샘플을 표시하는 예시적인 웨스턴 블롯을 보여준다. 도 5a는 도 5b에 식별된 바와 같이 로딩된 샘플을 사용한 웨스턴 블롯 이미지이다.

도 6a 내지 도 6f는 조작된 CD25 KO/PD1 KO YT/STAT5-Luc 리포터 세포에서 프로테아제-절단성 및 비-절단성 링커를 포함하는 종양 표적화된 IL2 전구단백질의 *시험관내* 활성을 보여준다. 도 6a 내지 도 6d는 CA9 표적화된 IL2 전구단백질과 관련된 루시퍼라제 활성을 나타내는 그래프이며, 여기서 각각 서로 다른 CD9 표적화 부분을 포함하는 IL2 전구단백질의 활성을 나타낸다(도 6a - aCD9(Ab1), 도 6b - aCD9(Ab2), 도 6c - aCD9(Ab3) 및 도

6d - aCD9(Ab4)). 도 6e 및 도 6f는 각각 EGFR 표적화 및 PD1 표적화된 IL2 전구단백질과 관련된 루시퍼라제 활성을 보여준다.

도 7a 내지 도 7f는 조작된 CD25 OE/PD1 KO YT/STAT5-Luc 리포터 세포에서 프로테아제-절단성 및 비-절단성 링커를 포함하는 종양 표적화된 IL2 전구단백질의 시험관내 활성을 보여준다. 도 7a 내지 도 7d는 CD9 표적화된 IL2 전구단백질과 관련된 루시퍼라제 활성을 나타내는 그래프이며, 여기서 각각 서로 다른 CD9 표적화 부분을 포함하는 IL2 전구단백질의 활성을 나타낸다(도 7a - aCD9(Ab1), 도 7b - aCD9(Ab2) , 도 7c - aCD9(Ab3) 및 도 7d - aCD9(Ab4)). 도 7e 및 도 7f는 각각 EGFR 표적화 및 PD1 표적화된 IL2 전구단백질과 관련된 루시퍼라제 활성을 보여준다.

도 8a 내지 도 8d는 다양한 길이의 비절단성 링커를 포함하는 PD1 표적화된 IL2 전구단백질의 *시험관 내* 활성을 보여준다. 도 8a는 PD1 OE/CD25 KO YT/STAT5-Luc 리포터 세포에서 IL2 전구단백질의 활성을 보여주는 그래프이다. 도 8b는 PD1 KO/CD25 KO YT/STAT5-Luc 리포터 세포에서 IL2 전구단백질의 활성을 보여주는 그래프이다. 도 8c는 PD1 OE/CD25 OE YT/STAT5-Luc 리포터 세포에서 IL2 전구단백질의 활성을 보여주는 그래프이다. 도 8d는 PD1 KO/CD25 OE YT/STAT5-Luc 리포터 세포에서 IL2 전구단백질의 활성을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] **1. 정의**

[0023] 본원에 사용된 다음 용어는 다음과 같은 의미를 갖는다:

[0024] **ABD 사슬, 표적화 부분 사슬:** 표적화 부분 및 그 안에 있는 항원 결합 부위(ABD's)는 하나의 폴리펩티드 사슬로 존재할 수 있거나로(*예*: scFv 또는 scFab의 경우) 하나 이상의 폴리펩티드 사슬의 결합을 형성될 수 있습니다(예: Fab 또는 Fv의 경우). 본원에서 사용된 용어 "ABD 사슬" 및 "표적화 부분 사슬"은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재하는 ABD 또는 표적화 부분의 전부 또는 일부를 의미한다. "ABD 사슬" 또는 "표적화 부분 사슬"이라는 용어의 사용은 편의 및 설명 목적에 한한 것이며 특정 구성이나 생산 방법을 함축하지 않는다. 또한, IL2 전구단백질을 설명할 때 ABD 또는 표적화 부분에 대한 언급은 문맥에서 달리 지시하지 않는 한 ABD 사슬 또는 표적화 부분 사슬을 포함한다. 따라서, Fc 도메인이 표적화 부분에 작동 가능하게 연결된 IL2 전구단백질을 설명할 때, Fc 도메인은 *예를 들어*, (1) Fab 또는 Fv의 제1 ABD 또는 표적화 부분 사슬 (제2, 연관된 ABD 또는 표적화 부분 사슬상의 Fab 또는 Fv의 다른 성분과 함께) 또는 (2) scFv 또는 scFab를 함유하는 ABD 또는 표적화 부분 사슬에 펩티드 결합을 통해 (*예를 들어*, 링커를 통해) 직접적으로 또는 간접적으로 공유적으로 연결될 수 있다.

[0025] **약, 대략:** "약", "대략" 등의 용어는 사양 전체에서 숫자 앞에 사용되어 숫자가 반드시 정확하지는 않음을 나타낸다(*예*:분수, 측정 정확도의 변화 및/또는 정밀도의 변화, 타이밍 등). "약 X" 또는 "대략 X"(여기서, X는 숫자임)의 개시내용이 또한 "X"의 개시내용인 것으로 이해되어야 한다. 이와 같이, 예를 들어, 하나의 서열이 또 다른 서열에 대한 "약 X%의 서열 동일성"을 갖는 실시형태의 개시내용은 또한 다른 서열에 대한 "X%의 서열 동일성"을 갖는 실시형태의 개시내용이다.

[0026] **활성화하다,활성화**: 본 개시내용의 IL2 전구단백질과 관련된 용어 "활성화하다", "활성화" 등은 IL2Rα 부분에서 IL2 부분의 차폐 해제 또는 방출을 초래하는 프로테아제-절단성 링커의 프로테아제-매개 효소 절단을 의미한다.

[0027] **및, 또는:** 달리 명시되지 않는 한, "또는" 접속사는 대안에서의 특성 선택(A 또는 B, 여기서 A의 선택은 B와 상호 배타적임) 및 결합에서의 특성 선택(A 또는 B, 여기서 A와 B가 모두 선택됨)을 모두 포괄하는 부울 논리 연산자로서 올바른 의미로 사용되도록 의도되었다. 본문의 일부 위치에서, "및/또는"의 용어는 동일한 목적에 사용되고, 이는 "또는"이 상호 배타적인 대안을 참조하여 사용된다는 것을 암시하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0028] **항체:** 본원에 사용된 용어 "항체"는 항원에 비공유적으로, 가역적으로 및 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 계열의 폴리펩티드(또는 폴리펩티드 세트)를 의미한다. 예를 들어, IgG 유형의 자연 발생 "항체"는 이황화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함하는 사량체이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서는 VH로 약칭함)과 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서는 VL로 약칭함)과 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인(본원에서는 CL로 약칭함)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(framework region: FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역(complementarity

determining region: CDR)이라고 하는 초가변성 영역으로 추가로 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 아미노 말단부터 카르복시 말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(*예:* 효과기 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 비롯한 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. "항체"라는 용어는 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체 및 항이디오타입(항id) 항체를 포함하나 이에 국한되지는 않는다. 항체는 임의의 동종형/계열(*예:* IgG, IgE, IgM,IgD,IgA 및 IgY) 또는 하위계열(*예:* lgG1, lgG2, lgG3, lgG4, lgA1및 lgA2)일 수 있다. 경쇄와 중쇄는 모두 구조적 및 기능적 상동성 영역으로 구분된다. "불변" 및 "가변"이라는 용어는 기능적으로 사용된다. 이와 관련하여, 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 부분 모두의 가변 도메인이 항원 인식 및 특이성을 결정한다는 것을 알 수 있다. 반대로, 경쇄(CL) 및 중쇄(CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 도메인은 분비, 태반 이동성, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등과 같은 중요한 생물학적 특성을 부여한다. 관례에 따라 불변 영역 도메인의 넘버링은 항체의 항원 결합 도메인 또는 아미노 말단에서 멀어질수록 증가한다. N 말단은 가변 영역이고 C 말단은 불변 영역이다; CH3 및 CL 도메인은 각각 천연 항체 중쇄 및 경쇄의 카르복시 말단을 나타낸다. 문맥상 달리 지시하지 않는 한, 편의를 위해 항체에 대한 언급은 또한 자연 비발생 항원 결합 도메인 및/또는 자연 비발생 구성을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하는 조작된 항체뿐만 아니라 항체 단편도 지칭한다.

[0029] **항원 결합 도메인:** 본 원에 사용된 용어 "항원 결합 도메인" 또는 "ABD"는 항원에 비공유적으로, 가역적으로, 및 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 항체 또는 항체 단편(*예*: 표적화 부분)의 일부를 의미한다. ABD를 포함할 수 있는 항체 단편의 예는 단일 사슬 Fv(scFv), Fab 단편(VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 단가 단편); F(ab)2 단편(힌지 영역에서 디설파이드 브릿지로 연결된 2개의 Fab 단편으로 구성된 2가 단편); VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; VH 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward 등, 1989, Nature 341:544-546); 및 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 따라서, "항체 단편"이라는 용어는 항체의 단백질 분해 단편(*예:* Fab 및 $F(ab)_2$ 단편)과 항체의 하나 이상의 부분을 포함하는 조작된 단백질(*예:* scFv)을 모두 포함한다. 항체 단편은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디(maxibody), 미니바디(minibody), 나노바디(nanobody), 인트라바디(intrabody), 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), v-NAR 및 비스-scFv 내로 혼입될 수 있다(*예:* Hollinger 및 Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23: 1126-1136 참조).

[0030] **연관됨(Associated):** IL2 전구단백질의 맥락에서 "연관됨"이라는 용어는 2개 이상의 폴리펩티드 사슬 사이의 기능적 관계를 의미한다. 특히, "회합된"의 용어는 기능적 IL2 전구단백질을 생성하기 위해 2개 이상의 폴리펩티드가 *예를 들어* 분자 상호작용을 통해 비공유로 또는 하나 이상의 디설파이드 브릿지 또는 화학적 교차연결을 통해 공유로 서로 회합된다는 것을 의미한다. 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 존재할 수 있는 회합의 예에는 Fc 영역을 형성하기 위한 Fc 도메인 사이의 회합(섹션 6.9에 기술된 동종이량체 또는 이종이량체), Fab에서 VH와 VL 영역 사이의 회합, 및 Fab에서 CH1 및 CL 사이의 회합을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

[0031] **암:**"암"이라는 용어는 이상 세포의 통제되지 않는(및 종종 급속한) 성장을 특징으로 하는 질병을 의미한다. 암 세포는 국소적으로 또는 혈류와 림프계를 통해 신체의 다른 부위로 퍼질 수 있다. 본원에는 다양한 암의 예시가 기술되어 있으며 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 부신암, 신경절암, 담도암, 골암, 자궁내막암, 안암, 나팔관암, 생식기암, 대장암, 수막암, 식도암, 복막암, 뇌하수체암, 음경암, 태반암, 흉막암, 침샘암, 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 상부 호흡소화암, 요로암, 질암, 외음부암 , 림프종, 백혈병, 폐암 등(*예*: 임의의 전술한 유형의 임의의 TAA-양성 암)을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

[0032] **상보성 결정 영역**: 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화성을 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 일반적으로 각 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(*예:* CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)이 있고, 각 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3)이 있다. 해당 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 다음에 기술된 것을 포함하여 잘 알려진 여러 체계 중 하나를 사용하여 결정할 수 있다. Kabat 등, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 제5판. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD("Kabat" 번호부여 체계), Al-Lazikani 등, 1997, JMB 273:927-948("Chothia" 번호부여 체계) 및 ImMunoGenTics (IMGT) 번호부여 (Lefranc, 1999, The Immunologist 7:132-136; Lefranc 등, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77("IMGT" 번호부여 체계). 예를 들어, 전통적인 형식의 경우 Kabat 하에서 중쇄 가변 도메인(VH)의 CDR 아미노산 잔기는 31-35(CDR-H1), 50-

65(CDR-H2) 및 95-102(CDR-H3)로 넘버링된다; 경쇄 가변 도메인(VL) 내의 CDR 아미노산 잔기는 24-34(CDR-L1), 50-56(CDR-L2) 및 89-97(CDR-L3)으로 넘버링된다. Chothia 하에서, VH의 CDR 아미노산은 26-32(CDR-H1), 52-56(CDR-H2) 및 95-102(CDR-H3)로 넘버링된다; VL의 아미노산 잔기는 26-32(CDR-L1), 50-52(CDR-L2) 및 91-96(CDR-L3)으로 넘버링된다. Kabat 및 Chothia 모두의 CDR 정의를 결합함으로써 CDR은 인간 VH의 아미노산 잔기 26-35(CDR-H1), 50-65(CDR-H2) 및 95-102(CDR-H3), 인간 VL의 아미노산 잔기 24-34(CDR-L1), 50-56(CDR-L2) 및 89-97(CDR-L3)로 구성된다. IMGT 하에서 VH의 CDR 아미노산 잔기는 대략 26-35(CDR-H1), 51-57(CDR-H2) 및 93-102(CDR-H3)로 넘버링되고, VL의 CDR 아미노산 잔기는 대략 27-32(CDR-L1), 50-52(CDR-L2) 및 89-97(CDR-L3)("Kabat"에 따라 넘버링)넘버링된다. IMGT 하에서 항체의 CDR 영역은 IMGT/DomainGap Align 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다.

[0033] **효과기 기능**: 용어 "효과기 기능"은 항원 결합 도메인 이외의 항체의 도메인을 통한 결합에 의해 매개되는 항체 분자의 활동을 의미하며, 일반적으로 효과기 분자의 결합에 의해 매개 된다. 효과기 기능은 예를 들어 보체의 C1 성분과 항체의 결합에 의해 매개되는 보체 매개 효과기 기능을 포함한다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 옵소닌화 및 용해에 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하고 자가면역 과민증에도 관여할 수 있다. 효과기 기능에는 Fc 수용체(FcR)에 대한 항체 불변 도메인의 결합 시 촉발될 수 있는 Fc 수용체(FcR) 매개 효과기 기능도 포함된다. 항체가 세포 표면의 Fc 수용체에 결합하면 항체 코팅 입자의 흡입 및 파괴, 면역 복합체 제거, 킬러 세포(항체 의존성 세포 매개 세포독성 또는 ADCC라고 함)에 의한 항체 코팅 표적 세포의 용해, 염증 매개체 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생산 조절 등 여러 가지 중요하고 다양한 생물학적 반응이 촉발된다. 항체의 효과기 기능은 Fc 수용체 또는 보체 성분과 같은 효과기 분자에 대한 항체의 친화도를 변경, *예를 들어* 강화 또는 감소시킴으로써 변경될 수 있다. 결합 친화도는 일반적으로 효과기 분자 결합 부위를 변화시켜 다양하다. 이 경우 관심 대상 부위를 찾고 적절한 방식으로 적어도 부위의 일부를 변화시키는 것이 적절하다. 또한 효과기 분자에 대한 항체의 결합 부위의 변화는 전체 결합 친화도를 크게 변경하지 않으나 비생산적인 결합에서와 같이 효과기 기전을 비효과적으로 만드는 상호작용의 기하학적 구조를 변경할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 효과기 분자 결합에 직접적으로 관여하지 않지만 효과기 기능의 성능에 관여하는 부위를 변형함으로써 효과기 기능이 변경될 수도 있다는 것이 추가로 예상된다.

[0034] **에피토프:** 에피토프 또는 항원 결정인자는 본원에 기술된 항체 또는 다른 항원 결합 부분에 의해 인식되는 항원의 일부이다. 에피토프는 선형 또는 구성적일 수 있다.

[0035] **Fab:**용어 "Fab"은 한 쌍의 폴리펩티드 사슬을 의미하며, 제1 사슬은 제1 불변 도메인(본원에서는 C1으로 지칭됨)에 작동 가능하게 연결(일반적으로 N-말단)된 항체의 가변 중쇄(VH) 도메인을 포함하고, 제2 사슬은 제1 불변 도메인과 페어링할수 있는 제2 불변 도메인(본원에서는 C2로 지칭됨)에 작동가능하게 연결(일반적으로 N-말단)된 항체 N-말단의 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함한다. 네이티브 항체에서, VH는 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)의 N-말단에 있고 VL은 경쇄(CL)의 불변 도메인의 N-말단에 있다. 본 개시내용의 Fab는 천연 배향에 따라 배열될 수 있거나, VH 및 VL 쌍 짓기를 수월하게 하는 도메인 치환 또는 스왑을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이종이량체성 분자에서 정확한 변형된 Fab-사슬 쌍 짓기를 수월하게 하도록 Fab에서의 CH1 도메인 및 CL 도메인 쌍을 CH3-도메인 쌍으로 대체하는 것이 가능하다. 또한 CH1 및 CL을 역전시켜, CH1이 VL에 부착되게 하고 CL이 VH에 부착되게 하는 것이 가능하며, 형태는 일반적으로 Crossmab으로 알려져 있다. "Fab"이라는 용어는 단일 사슬 Fab를 포함한다.

[0036] **Fc 도메인 및 Fc 영역**: 용어 "Fc 도메인"은 다른 중쇄의 해당 부분과 쌍을 이루는 중쇄의 부분을 의미 한다. 용어 "Fc 영역"은 두 개의 중쇄 Fc 도메인이 결합하여 형성된 영역을 의미한다. Fc 영역 내의 2개의 Fc 도메인은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 네이티브 항체에서 Fc 도메인은 전형적으로 동일하지만, 하나 또는 두 Fc 도메인은 *예를 들어*, 놉-인-홀(knob-in-hole) 상호작용을 통한 이종이합체화를 허용하도록 유리하게 변형될 수 있다.

[0037] **Fv:** "Fv"라는 용어는 완전한 표적 인식 및 결합 부위를 포함하는 면역글로불린에서 파생될 수 있는 최소 항체 단편을 의미 한다. 이 영역은 긴밀한 비공유 회합으로 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인으로 구성된 이합체로 구성된다(VH-VL 이합체). 이러한 구성에서는 각 가변 도메인의 3개 CDR이 상호작용하여 VH-VL 이합체 표면에 표적 결합 부위를 정의한다. 종종 6개의 CDR은 항체에 표적 결합 특이성을 부여한다. 그러나 어떤 경우에는 단일 가변 도메인(또는 표적에 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)이라도 표적을 인식하고 결합하는 능력을 가질 수 있다. 본원에서 VH-VL 이합체에 대한 언급은 임의의 특정 구성을 전달하려는 의도가 아니다. 단일 폴리펩티드 사슬(*예:* scFv)에 존재하는 경우 VH는 VL의 N-말단 또는 C-말단이다.

[0038] **반 항체**: 용어 "반 항체"는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하고, 예를 들어 이황화 다리 또는 분자 상호작용을 통해 Fc를 포함하는 또 다른 분자와 결합할 수 있는 분자를 의미합니다. 절반 항체는 하나의 폴리펩티드 사슬 또는 하나 이상의 폴리펩티드 사슬(*예:* Fab의 2개의 폴리펩티드 사슬)로 구성될 수 있다. 절반 항체의 예시는 항체(*예:* IgG 항체)의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 분자이다. 절반 항체의 또 다른 예시는 VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 VH 도메인, CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 분자이고, 여기서 상기 VL 및 VH 도메인은 ABD를 형성한다. 절반 항체의 또 다른 예시는 scFv 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드이다. 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 전형적으로 2개의 절반 항체를 포함하며, 각각은 Fc 도메인, Fc 도메인에 대한 C-말단의 IL2Rα 부분, IL2Rα 부분에 대한 C-말단의 프로테아제-절단성 링커 및 프로테아제-절단성 링커에 대한 C-말단의 IL2 부분을 포함한다. IL2 전구단백질의 한쪽 또는 양쪽 절반 항체는 *예를 들어*, Fc 도메인에 대한 N-말단의, 표적화 부분을 추가로 포함할 수 있다.

[0039] 용어 "절반 항체"는 설명 목적으로만 사용되며 특정 구성이나 생성 방법을 의미하지 않는다. "제1" 절반 항체, "제2" 절반 항체, "좌측" 절반 항체, "우측" 절반 항체 등으로 절반 항체에 대한 설명은 단지 편의 및 설명의 목적을 위한 것이다.

[0040] **숙주 세포 또는 재조합 숙주 세포**: 용어 "숙주 세포" 또는 "재조합 숙주 세포"는 *예를 들어* 이종 핵산의 도입을 통해 유전적으로 조작된 세포를 의미한다. 상기 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 특정 변형이 다음의 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 상기 자손은, 실제로는, 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다. 숙주 세포는 이종 핵산을 일시적으로, *예를 들어*, 염색체외 이종 발현 벡터상에 또는 안정적으로, *예를 들어*, 이종 핵산의 숙주 세포 게놈으로의 통합을 통해 운반할 수 있다. 본 개시내용의 IL2 전구단백질을 발현하려는 목적을 위해, 숙주 세포는 바람직하게는 포유류 기원 또는 포유류-유사 특징의 세포주, 예컨대 원숭이 신장 세포(COS, *예를 들어*, COS-1, COS-7), HEK293, 새끼 햄스터 신장(BHK, *예를 들어*, BHK21), 중국 햄스터 난소(CHO), NSO, PerC6, BSC-1, 인간 간세포 암종 세포(*예를 들어*, Hep G2), SP2/0, HeLa, Madin-Darby 소 신장(MDBK), 골수종 및 림프종 세포 또는 이의 유도체 및/또는 조작된 변이체이다. 조작된 변형체는, *예를 들어*, 원래 세포주보다 더 높은 밀도로 성장하는 유도체 및/또는 글리칸 프로파일이 변형된 유도체 및/또는 부위 특이적 통합 부위 유도체를 포함한다.

[0041] **링커:**본 명세서에 사용된 용어 "링커"는 프로테아제-절단성 링커 또는 비절단성 링커를 의미한다.

[0042] **비절단성 링커**: 비절단성 링커는 아미노산 서열에 프로테아제에 대한 기질 서열이 결여된 펩티드, *예를 들어* 섹션 6.5.1에 기술된 프로테아제에 대한 기질 서열이 결여된 펩타이드를 의미하며, 비절단성 링커는 특정 서열 모티프, 예를 들어 섹션 6.5.2에 기술된 기질을 인식하고 절단한다.

[0043] **작동적으로 연결됨**: 용어 "작동적으로 연결됨"은 두개 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드 도메인 또는 핵산(*예를 들어* DNA) 세그먼트 사이의 기능적 관계를 의미 한다. 융합 단백질 또는 다른 폴리펩티드의 맥락에서, 용어 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 아미노산 분절이 연결되어 기능성 폴리펩티드를 생성함을 의미한다. 예를 들어, 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 맥락에서, 별도의 성분(*예를 들어*, Fc 도메인 및 IL2Rα 부분)은 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 작동 가능하게 연결될 수 있다. 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 절반 항체와 같은 융합 단백질을 인코딩하는 핵산의 맥락에서, "작동 가능하게 연결된"은 두 핵산이 연결되어 두 핵산에 의해 인코딩된 아미노산 서열이 프레임 내에 유지되는 것을 의미한다. 전사 조절의 맥락에서, 해당 용어는 전사 조절 서열과 전사된 서열의 기능적 관계를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서 서열은 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 자극하거나 조절하는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0044] **폴리펩티드, 펩티드및 단백질**: 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0045] **전구단백질:**"전구단백질"은 비활성이고 프로테아제에 의한 단백질 분해에 의해 활성화될 수 있는 단백질 전구체이다. 따라서 전구단백질은 "프로테아제 활성화 가능"하다.

[0046] **프로테아제:** 본 원에 사용된 용어 "프로테아제"는 펩티드 결합의 가수분해를 촉매하는 모든 효소를 의미한다. 일반적으로, 본 개시내용에 유용한 프로테아제, *예를 들어* 섹션 6.5.1에서 설명되는 프로테아제는 특정 서열 모티프, *예를 들어*, 섹션 6.5.2에서 설명되는 바와 같은 기질을 인식하고 절단한다. 바람직하게는, 프로테아제는

정상 조직에 비해 암 조직에서 더 높은 수준으로 발현된다.

[0047] **프로테아제-절단성링커:** 본원에서 사용되는 용어 "프로테아제-절단성 링커" 또는 "PCL"은 아미노산 서열이 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상(*예*: 2개, 3개 이상)의 기질 서열을 포함하는 펩티드를 의미한다. 예시적인 프로테아제-절단성 링커는 섹션 6.5에서 설명되어 있으며 예시적인 프로테아제-절단성 링커 서열은 섹션 6.5.4에서 개시되어 있다.

[0048] **인식:** 본원에 사용된 용어 "인식"은 항체 또는 항체 단편(*예*: 표적화 부분)이 해당 에피토프를 찾아 상호작용(*예* : 결합)하는 것을 의미한다.

[0049] **단일 사슬 Fab 또는 scFab**: 본원에 사용된 용어 "단일 사슬 Fab" 또는 "scFab"은 VH 도메인, CH1 도메인, VL 도메인, CL 도메인 및 링커를 포함하는 ABD를 의미한다. 일부 실시형태에서, 전술한 도메인 및 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 순서 중 하나로 배열된다: (a) VH-CH1-링커-VL-CL, (b) VL-CL-링커-VH-CH1, (c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 (d) VL-CH1-링커-VH-CL. 링커는 적합하게는 적어도 30개의 아미노산, 바람직하게는 32개 내지 50개의 아미노산의 절단 불가능 링커이다. 단일 사슬 Fab 단편은 전형적으로 CL 도메인과 CH1 도메인 사이의 천연 디설파이드 결합을 통해 안정화된다. 또한, 이러한 단일 사슬 Fab 분자는 시스테인 잔류물 삽입(*예를 들어*, Kabat 번호부여에 따르면 VH 도메인의 44번 위치 및 VL 도메인의 100번 위치)을 통해 사슬간 디설파이드 결합을 생성하여 추가로 안정화될 수 있다.

[0050] **단일 사슬 Fv 또는 scFv**: 본원에 사용된 용어 "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv"는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 ABD를 지칭하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv에 대한 검토는 문헌[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 제113권, Rosenburg 및 Moore 편집. (1994), Springer-Verlag, New York, 제269-315페이지] 참조. VH 및 VL은 N-말단에서 C-말단 순서로 VH-VL 또는 VL-VH로 배열되며, 전형적으로 링커, 예를 들어, 표 E에서 제시되는 링커에 의해 분리된다.

[0051] **스페이서:** 본 원에서 사용된 용어 "스페이서"는 아미노산 서열이 프로테아제에 대한 기질이 아닌, 기질을 포함하는 링커에 통합된 펩티드를 의미한다. 스페이서는 기질을 분자에 있는 다른 도메인, 예를 들어, ABD로부터 분리하기 위해 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 스페이서에 있는 잔기는 아미노펩티다제 및/또는 엑소펩티다제 작용을 최소화하여 N-말단 아미노산의 절단을 방지한다.

[0052] **특이적으로 (또는 선택적으로) 결합**: 항원 또는 에피토프에 "특이적으로(또는 선택적으로) 결합"이라는 용어는 단백질 및 기타 분자의 이질적인 집단에서 동족 항원 또는 에피토프의 존재를 결정짓는 결합 반응을 의미한다. 결합 반응은 항체 또는 항체 단편에 의해 매개될 수 있지만 반드시 매개될 필요는 없다. 용어 "특이적 결합"은 종간 반응성을 배제하지 않는다. 예를 들어, 한 종의 항원에 "특이적으로 결합"하는 항원 결합 도메인(*예를 들어*, 항체의 항원 결합 단편)은 하나 이상의 다른 종의 항원에도 "특이적으로 결합"할 수 있다. 따라서, 이러한 종간 반응성은 그 자체로 "특이적" 결합제로서 항원 결합 도메인의 분류를 변경하지 않는다. 특정 실시형태에서, 인간 항원에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항원 결합 도메인은 하나 이상의 비인간 포유류 종, *예를 들어*, 영장류 종(*마카카 파시큘리스*, *마카카 물라타* 및 *마카카 네메스트리나* 중 하나 이상을 포함하나 이에 국한되지 않음) 또는 설치류 종, *예를 들어*, *무스쿠스*와 종간 반응성을 갖는다.

[0053] **대상:**"대상"이라는 용어에는 인간 및 인간이 아닌 동물이 포함된다. 비인간 동물은 모든 척추동물 *예를 들어*, 포유동물 및 비포유동물, 예컨대, 비인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체는 인간이다.

[0054] **기질:**"기질"이라는 용어는 프로테아제가 작용하고 그 안에서 프로테아제가 펩티드 결합을 절단하는 펩티드 서열을 의미합니다.

[0055] **표적분자**: 본 원에 사용된 용어 "표적 분자"는 본 개시내용의 IL2 전구단백질의.표적화 부분에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 세포 표면 또는 세포외 기질에서 발현되는 임의의 생물학적 분자(예: 단백질, 탄수화물, 지질 또는 이들의 조합)를 의미한다.

[0056] **표적화 부분**: 본원에 사용된 용어 "표적화 부분"은 개시내용의 IL2 전구단백질이 국소화될 부위, 예를 들어 종양 세포 또는 종양 미세환경의 림프구에서 세포 표면 또는 세포외 기질 분자에 결합할 수 있는 모든 분자 또는 그 결합 부분(예: 면역글로불린 또는 항원 결합 단편)을 의미한다. 일부 실시형태에서, 표적화 부분은 TAA에 결합한다. 다른 실시형태에서, 표적화 부분은 TCA에 결합한다. 표적화 부분은 IL2 전구단백질을 특정 부위에 국소

화하는 것에 더하여 기능적 활성을 가질 수도 있다. 예를 들어, PD1과 같은 면역관문 억제제에 결합하는 표적화 부분은 또한 항종양 활성을 나타내거나 예를 들어 PD1 신호전달을 억제하여 IL2에 의한 항종양 활성을 강화할 수 있다.

[0057] **T 세포 항원, TCA:** "T 세포 항원" 또는 "TCA"라는 용어는 T-림프구 표면에 발현되며 특정 부위에 대한 약리학적 제제의 우선적 표적화에 유용한 분자(일반적으로 단백질, 탄수화물, 지질 또는 이들의 일부 조합)를 의미한다. 일부 실시형태에서, 부위는 암 조직이고/이거나 T 세포 항원은 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자 또는 T-림프구상에서 발현되는 면역관문 억제제이다.

[0058] **종양:** 용어 "종양"은 본원에서 용어 "암"과 상호교환적으로 사용되며, *예를 들어* 두 용어 모두 고체 및 액체, *예를 들어* 확산성 또는 순환성 종양을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "암" 또는 "종양"은 전악성 및 악성 암 및 종양을 포함한다.

[0059] **종양관련 항원, TAA:** "종양 관련 항원" 또는 "TAA"라는 용어는 암세포 표면에 전체적으로 또는 단편(*예*: MHC/펩티드)으로 발현되는 분자(일반적으로 단백질, 탄수화물, 지질 또는 이들의 일부 조합)를 의미하며, 이는 암세포에 대한 약리학적 제제의 우선적 표적화에 유용하다. 일부 실시형태에서, TAA는 정상 세포 및 암세포 둘 모두에 의해 발현되는 마커, *예를 들어*, 계통 마커이다. 일부 실시형태에서, TAA는 정상 세포와 비교하여 암 세포에서 과발현되는, 예를 들어, 정상 세포와 비교하여 1배 과발현, 2배 과발현, 3배 과발현 또는 그 이상 과발현되는 세포 표면 분자이다. 일부 실시형태에서, TAA는 암세포에서 부적절하게 합성되는 세포 표면 분자, 예를 들어, 정상 세포상에서 발현되는 분자와 비교하여 결실, 첨가 또는 돌연변이를 함유하는 분자이다. 일부 실시형태에서, TAA는 전적으로 암 세포의 세포 표면상에서 또는 단편(*예를 들어*, MHC/펩티드)으로서 발현될 것이며 정상 세포의 표면상에서는 합성되거나 발현되지 않을 것이다. 따라서, 용어 "TAA"는, 때때로 당업계에서 종양 특이적 항원("TSA")으로 공지된, 암 세포에 특이적인 항원을 포함한다.

[0060] **치료, 치료하다, 치료하는:** 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 증식성 질환의 진행, 중증도 및/또는 지속기간을 감소 또는 개선, 또는 본 개시내용의 하나 이상의 IL2 전구단백질을 투여하여 하나 이상의 질환(바람직하게는, 하나 이상의 식별 가능한 증상)을 개선하는것을 의미한다. 특정 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 환자에 의해 반드시 식별 가능하지 않은 종양의 성장과 같은 증식성 질환의 적어도 하나의 측정 가능한 물리적 매개변수의 개선을 지칭한다. 다른 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 물리적으로, *예를 들어*, 식별가능한 증상의 안정화에 의해, 생리학적으로, *예를 들어*, 물리적 매개변수의 안정화에 의해, 또는 둘 모두에 의한 증식성 장애의 진행의 억제를 지칭한다. 다른 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 종양 크기 또는 암성 세포 수의 감소 또는 안정화를 지칭한다.

[0061] **범용 경쇄, ULC:** 본원에서 사용되는 용어 "범용 경쇄" 또는 "ULC"는 2개 이상의 중쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이룰 수 있는 경쇄 가변 영역(VL)을 지칭한다. 표적화 부분의 맥락에서, 용어 "보편적 경쇄" 또는 "ULC"는 표적화 부분의 중쇄 영역과 쌍을 이룰 수 있고 또한 다른 중쇄 영역과 쌍을 이룰 수 있는 경쇄 폴리펩티드를 지칭한다. ULC는 또한 불변 도메인, *예를 들어*, 항체의 CL 도메인을 포함할 수 있다. 범용 경쇄는 "일반 경쇄"라고도 알려져 있다.

[0062] **VH:**"VH"라는 용어는 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 중쇄를 포함하는 항체의 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 의미한다.

[0063] **VL:**용어 "VL"은 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 의미한다.

[0064] **2. IL2 전구단백질**

[0065] 본 개시내용은 IL2 부분, IL2Rα 부분 및 IL2Rα가 IL2 부분의 활성을 감소시키거나 차단하도록 배열된 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질에 관한 것이다. IL2 전구단백질은 프로테아제, *예를 들어*, 종양 환경에서 과발현되는 프로테아제와 마주치면 프로테아제-절단성 링커가 절단되고 IL2가 방출되어 종양 세포에 대한 세포독성 T 세포 활성을 자극하도록 구성된다. 일반적으로, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 이량체이며 Fc 영역을 형성하기 위해 결합하는 2개의 Fc 도메인, C-말단에 프로테아제-절단성 링커 또는 비절단성 링커, IL2 부분, 프로테아제 절단성인 추가 링커 및 N-말단에서 C-말단 순서로 배열 된 IL2Rα 부분을 포함한다.

[0066] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 일반적으로 (a) 결합하여 Fc 영역을 형성할 수 있는 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인; (b) Fc 도메인에 대해 프로테아제-절단성 또는 비절단성 C-말단일 수 있는 2개의 링커, 도 1a 및 도 2a는 링커 A 및 링커 C에 해당하고 아래 넘버링된 실시형태를 참조하면 제1 링커 및 제3 링커에 해당, (c) 제1 및 제3 링커에 대한 C-말단의 두 개의 (제1 및 제2) IL2 부분; (c) 프로테아제-절단성인

IL2 부분에 대한 C-말단의 2개의 추가 링커, 도 1a 및 도 2a에 도시된 실시형태를 참조하면 링커 B 및 링커 D에 해당하고 아래 넘버링된 실시형태를 참조하면 제2 링커 및 제4 링커에 해당한다; 및 (d) 제2 및 제4 링커의 C-말단에 위치한 2개(제1 및 제2)의 IL2Rα 부분. IL2 전구단백질의 IL2 부분은 IL2Rα 부분에 의한 차폐로 인해 불활성 형태이지만, *예를 들어* 종양 환경에서 프로테아제-절단성 링커 중 하나 이상을 절단 할수 있는 프로테아제를 발현하는 부위에서 프로테아제 절단 후 방출 된다.

[0067] IL2 전구단백질은 하나 이상의 표적화 모이어티를 추가로 포함할 수 있으며, 일부 실시형태에서, Fc 도메인에 대한 N-말단의 2개의 표적화 모이어티를 포함한다. 표적화 부분의 예는 6.7에서 설명되어 있으며 적합한 표적화 부분 형식은 섹션 6.8에서 설명되어 있다. 도 1a 및 도 2a에 도시된 실시형태를 참조하여 IL2 전구단백질은 N-말단에 2개의 Fab 도메인을 포함할 수 있다. 도 1a 및 도 2a에 도시된 바와 같은 일부 실시형태에서 Fc 도메인은 N-말단에 힌지 도메인을 포함한다.

[0068] IL2 전구단백질에 포함시키기에 적합한 IL2 부분의 예는 섹션 6.3에 설명되어 있고,적합한 IL2Rα 부분의 예는 섹션 6.4에 설명되어있으며, 적합한 프로테아제-절단성 링커의 예는 섹션6.5에 설명되어 있다.

[0069] 일반적으로, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 다중 링커를 함유한다. 바람직하게는, 존재하는 경우, 특정 프로테아제-절단성 링커 이외의 링커는 비절단성이다. 비절단성 링커의 예는 섹션 6.6에서 제시되어 있다.

[0070] 힌지 서열이 있거나 없는 적합한 Fc 도메인은 섹션 6.9에서 설명되어 있다.

[0071] 하나의 예시적인 IL2 전구단백질이 도 1a에 도시되어 있다. IL2 전구단백질은 다음을 포함한다:

[0072] a) Fab의 중쇄와 Fab의 경쇄가 별도의 폴리펩티드 사슬에 연결되어 함께 제1 표적화 부분을 형성하는 제1 폴리펩티드 사슬, 힌지 도메인을 포함하는 Fc 도메인, 제1 프로테아제 절단성 링커("링커 A"), IL2 부분, 제2 프로테아제-절단성 링커("링커 B"), IL2Rα 부분이 뒤따르며; 및

[0073] b) Fab의 중쇄와 Fab의 경쇄가 별도의 폴리펩티드 사슬에 연결되어 함께 제2 표적화 부분을 형성하는 제2 폴리펩티드 사슬, 힌지 도메인을 포함하는 Fc 도메인, 제1 프로테아제-절단성 링커("링커 C"), IL2 부분, 제2 프로테아제 절단성 링커("링커 D"), IL2Rα 부분이 뒤따른다.

[0074] 추가의 예시적인 IL2 전구단백질이 도 2a에 도시되어 있다. IL2 전구단백질은 다음을 포함한다:

[0075] a) Fab의 중쇄와 Fab의 경쇄가 별도의 폴리펩타이드 사슬에 연결되어 함께 제1 표적화 부분을 형성하는 제1 폴리펩티드 사슬, 힌지 도메인을 포함하는 Fc 도메인, 비절단성 링커("링커 A"), IL2 부분, 프로테아제-절단성 링커("링커 B"), IL2Rα 부분이 뒤따르며; 및

[0076] b) Fab의 중쇄와 Fab의 경쇄가 별도의 폴리펩티드 사슬에 연결되어 함께 제2 표적화 부분을 형성하는 제2 폴리펩티드 사슬, 힌지 도메인을 포함하는 Fc 도메인, 비절단성 링커("링커 C"), IL2 부분, 프로테아제-절단성 링커("링커 D"), IL2Rα 부분이 뒤따른다.

[0077] 따라서, IL2 전구단백질은 도 1a에 예시된 바와 같이 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하거나 또는 도 2a에 예시된 바와 같이 2개의 프로테아제-절단성 링커를 포함할수 있다.

[0078] 4개의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 IL2 전구단백질에서 모든 프로테아제-절단성 링커의 절단은 IL2 부분을 포함하고 Fc 부분, IL2Rα 부분 및 존재하는 경우 표적화 부분이 결여된 활성화된 IL2 단백질의 방출을 초래한다. 일부 실시형태에서, 이러한 구성은 종양 환경에서 발현되는 TAA 또는 ECM 표적 분자에 결합하는 표적화 부분을 포함하는 IL2 전구단백질에 대해 유리하게 활용된다. 도 1b에 도시된 바와 같이, 이론에 얽매이려는 의도는 없지만, 발명자들은 이러한 구성에서 표적화 부분이 IL2 전구단백질을 종양 환경으로 표적화하고, 여기서 프로테아제가 프로테아제-절단성 링커를 절단하여 IL2 부분 및 링커 서열을 포함하는 IL2 단백질이 방출을 초래한다고 믿는다. 이 국소적으로 활성화된 IL2 단백질은 종양 환경에서 T-림프구를 자극하여 암세포에 대한 면역 반응을 유도한다.

[0079] 2개의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 IL2 전구단백질에서 두 프로테아제-절단성 링커의 절단은 IL2 부분, Fc 부분 및 존재하는 경우 표적화 부분을 포함하지만 IL2Rα 부분은 결여된 활성화된 IL2 단백질의 방출을 초래한다. 일부 실시형태에서, 이러한 구성은 TCA, 특히 항원 활성화 T 세포(예: PD1, Lag3, 41BB 등)에서 발현되는 TCA에 결합하는 표적화 부분을 포함하는 IL2 전구단백질에 대해 유리하게 활용 된다. 도 2b 내지 도 2d에 도시된 바와 같이, 이론에 얽매이려는 의도는 없지만, 발명자들은 이러한 구성에서 종양 환경에서 프로테아제-절단성 링커의 절단이 IL2 부분 및 T 세포 표적화 부분을 포함하는 IL2 단백질의 방출을 초래한다고 믿는다. 이 국

소적으로 활성화된 T 세포 표적화된 IL2 단백질은 종양 환경에서 T-림프구를 자극하여 암세포에 대한 향상된 면역 반응을 유도한다.

[0080] 중요한 점은, 이론에 얽매이지 않으면서, 발명자들은 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 IL2 부분과 IL2Rα 부분 사이에 프로테아제-절단성 링커를 포함시키는 것이 종양 세포에 대한 세포독성 T 세포 활성의 최적 자극 및 IL2에 의해 강화된 면역 반응 유도에 중요하다고 생각한다. 반면에, 본 개시내용의 IL2 전구단백질에서와 같이 배열된 성분을 갖지만 IL2 부분과 IL2Rα 부분을 분리하는 비절단성 링커를 갖는 분자는 낮은 종양 성장 제어를 나타내었다(U.S. 2022/0402989의 문단 [0253] 및 도 6g 및 6h 참조).

[0081] **3. IL2 부분**

[0082] 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 IL2 부분은 야생형 또는 변이체 IL2 부분을 포함한다.

[0083] 진핵 세포에서 인간 IL2는 153개 아미노산의 전구체 폴리펩티드로 합성되며, 이로부터 20개 아미노산이 제거되어 성숙한 분비 IL2가 생성된다(Taniguchi 등, 1983, Nature 302(5906):305-10). 성숙한 인간 IL2는 다음의 아미노산 서열을 갖고 있다:

[0084] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(서열 번호: 15)

[0085] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 부분은 CD122 지향적이 아니며, *예를 들어*, IL2Rα에 비해 IL2Rβ에 우선적으로 결합하게 만드는 IL2 부분에 아미노산 치환을 갖지 않는다.

[0086] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 부분은 CD25 지향적이며, *예를 들어*, IL2Rβ에 비해 IL2Rα에 우선적으로 결합하게 만드는 IL2 부분에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0087] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 IL2Rβ에 대한 결합을 감소시키는 IL2 부분에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, IL2 부분은 야생형 인간 IL2에 비해 인간 IL2Rβ에 대한 결합이 최대 50배(일부 실시형태에서 최대 100배) 내지 1,000배까지 약화될 수 있다.

[0088] IL2Rβ에 대한 감소된 결합을 갖는 IL2 부분은 IL2Rα에 대한 친화도를 유지하거나 IL2Rα에 대한 결합이 감소될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, IL2 부분은 야생형 인간 IL2에 비해 인간 ff α에 대한 결합이 최대 50배까지 약화될 수 있다.

[0089] 유용한 IL2 변이체의 다른 특징은 종양에서 IL2Rα 함유 CD8+ T 세포의 증식을 유도하는 능력, 종양에서 IL2Rα 함유 CD8+ T 세포에서 IL2 신호 전달을 유도하는 능력 및 개선된 치료 지수를 포함할 수 있다.

[0090] 일 실시형태에서, IL2 부분은 IL2Rβ에 대한 친화도를 감소시키고 IL2Rα에 대한 친화도를 보존하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 예시적인 아미노산 치환은 N88D이다. IL2Rβ에 대한 IL2의 친화도를 감소시키거나 제거하는 다른 아미노산 치환은 D20T, N88R, N88D 또는 Q126D이다(*예를 들어*, 미국 특허 공개 번호 미국 2007/0036752 참조).

[0091] 일 실시형태에서, IL2 부분은 IL2Rα에 대한 친화도를 감소시키고 IL2Rβ에 대한 친화성을 보존하거나 더 낮은 정도로 감소시켜 CD122 지향적 IL2 부분을 생성하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 예시적인 CD122 지향적 IL2 모이어티는 H16A 및 F42A 치환을 모두 포함하는 모이어티이다. 따라서, 일부 실시형태에서, IL2 부분은 아래에서 나타낸 바와 같이 H16A 및 F42A 치환을 갖는 인간 IL2의 아미노산 서열을 포함한다:

[0092] SAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(서열 번호:124)

[0093] 특정 실시형태에서, IL2 부분은 인간 IL2의 잔기 3에 상응하는 위치에서 IL2의 O-글리코실화 부위를 제거하는 아미노산 치환을 포함한다. T3에서의 예시적인 아미노산 치환은 T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K 및 T3P이다. 특정 실시형태에서, 치환은 T3A이다.

[0094] IL2 부분은 바람직하게는 본질적으로 전장 IL2 분자, *예를 들어*, 인간 IL2 분자이다. 특정 실시형태에서 IL2 부분은 인간 IL-2 분자이다.

[0095] 미국 특허 번호 4,518,584에서 설명되는 바와 같이 C125는 S, V 또는 A로 대체되어 단백질 응집을 감소시킬 수 있다.

[0096] 본원에서 설명되는 바와 같이, IL2의 N-말단 알라닌 잔기를 결실시켜 des-A1 IL2를 생성할 수도 있다.

[0097] 또한, IL2 부분은 미국 특허 번호 5,206,344에서 설명되는 바와 같이 메티오닌 104를 알라닌과 같은 중성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수 있다.

[0098] 따라서, 본 개시내용의 IL2 모이어티는 des-A1 M104A IL2, des-A1 M104A C125S IL2, M104A IL2, M104A C125A IL2, des-A1 M104A C125A IL2 또는 M104A C125S IL2로부터 선택되는 아미노산 결실 및/또는 치환을 가질 수 있으며, 다른 변형은 IL2와 이의 수용체의 결합을 변경한다. 이러한 및 다른 돌연변이체는 미국 특허 번호 5,116,943 및 문헌[Weiger 등, 1989, Eur J Biochem 180:295-300]에서 확인할 수 있다.

[0099] 다양한 측면에서, 임의의 전술한 IL2 모이어티는 성숙한 인간 IL2와 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0100] **4. IL2Rα 부분**

[0101] 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 IL2Rα 부분을 포함하며, 이는 IL2Rα의 IL2 결합 도메인, *예를 들어*, IL2Rα의 세포외 도메인을 포함하거나 이로 구성된다. 성숙한 인간 IL2Rα 세포외 도메인(인간 IL2Rα의 아미노산 22-272에 해당)의 서열은 다음과 같다:

[0102] Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

[0103] Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg

[0104] Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly

[0105] Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser

[0106] Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln

[0107] Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp

[0108] Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn

[0109] Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr

[0110] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu

[0111] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln

[0112] Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly Glu Glu

[0113] Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr Ser Cys

[0114] Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr Glu Met Ala Ala Thr

[0115] Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln Val Ala Val Ala Gly

[0116] Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu Ser Gly Leu Thr Trp

[0117] Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile (서열번호: 8)

[0118] 인간 IL2Rα 세포외 도메인(인간 IL2Rα의 아미노산 22-186에 해당하는 2개의 "스시" 도메인을 포함함)의 IL2 결합 부분의 서열은 다음과 같다:

[0119] Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

[0120] Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg

[0121] Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly

[0122] Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser

[0123] Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln

[0124] Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp

[0125] Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn

[0126] Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr

[0127] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu

[0128] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln

[0129] Leu Ile Cys Thr Gly(서열번호: 9)

[0130] 인간 IL2Rα의 아미노산 22-240에 상응하는 인간 IL2Rα 세포외 도메인의 대체 IL2 결합 부분의 서열은 다음과 같다:

[0131] Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

[0132] Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg

[0133] Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly

[0134] Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser

[0135] Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln

[0136] Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp

[0137] Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn

[0138] Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr

[0139] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu

[0140] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln

[0141] Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly Glu Glu

[0142] Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr Ser Cys

[0143] Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr Glu Met Ala Ala Thr

[0144] Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln(서열번호: 10)

[0145] IL2Rα 부분은 바람직하게는 위의 서열 중 임의의 하나, 즉, IL2Rα의 아미노산 22-186, IL2Rα의 아미노산 22-240 또는 IL2Rα의 아미노산 22-272 중 임의의 하나 또는 이의 임의의 IL2 결합 부분과 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0146] 특정 측면에서, IL2Rα 부분은 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있으며, 선택적으로 결합 부분은 인간 IL2Rα의 세포 외 도메인의 (a) 적어도 160개 아미노산, 적어도 161개 아미노산, 적어도 162개 아미노산, 적어도 164개 아미노산 또는 적어도 165개 아미노산 및/또는 (b) 최대 251개, 최대 240개, 최대 230개, 최대 220개, 최대 210개, 최대 200개, 최대 190개, 최대 180개 또는 최대 170개 아미노산의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 인간 IL2Rα의 부분은 선행하는 문장의 (a) 및 (b) 중 임의의 하나, *예를 들어*, 인간 IL2Rα에서 적어도 160개에서 최대 180개 아미노산, 인간 IL2Rα에서 적어도 162개에서 최대 200개 아미노산, 인간 IL2Rα에서 적어도 160개에서 최대 220개 아미노산, 인간 IL2Rα에서 적어도 164개에서 최대 190개 아미노산 등으로 결합된다.

[0147] 일부 실시형태에서, IL2Rα 부분은 IL2Rα의 아미노산 잔기 186에 대한 C 말단의 추가로 최대 5개 아미노산, 최대 10개 아미노산, 최대 15개 아미노산, 최대 20개 아미노산, 최대 30개 아미노산 또는 최대 40개 아미노산이 존재하거나 존재하지 않고, 아미노산 22-186과 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0148] 특정 실시형태에서, IL2Rα 부분은 예를 들어, 아미노산 N49, 아미노산 N68, 아미노산 T74, 아미노산 T85, 아미노산 T197, 아미노산 T203, 아미노산 T208 및 아미노산 T216 중 하나 이상에서 치환에 의해 천연 IL2Rα의 세포 외 도메인과 비교하여 적어도 하나 적은 O-글리코실화 및/또는 N-글리코실화를 갖는다. 일부 실시형태에서, 하

나 이상의 치환은 아스파라긴에서 알라닌, 트레오닌, 세린, 아르기닌, 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프로린, 트립토판, 티로신 및 발린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산으로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 치환은 트레오닌에서 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프로린, 세린, 트립토판, 티로신 및 발린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산으로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 치환은 아미노산 S50(*예를 들어*, S50P), 아미노산 S51(*예를 들어*, S51R, S51N, S51D, S51C, S51Q, S51E, S51G, S51H, S51I, S51L, S51K, S51M, S51F, S51P, S51W, S51Y 또는 S51V), 아미노산 T69(*예를 들어*, T69P), 아미노산 T70(*예를 들어*, T70R, T70N, T70D, T70C, T70Q, T70E, T70G, T70H, T70I, T70L, T70K, T70M, T70F, T70P, T70W, T70Y 또는 T70V, 아미노산 C192(*예를 들어*, C192R, C192N, C192D, C192Q, C192E, C192G, C192H, C192I, C192L, C192K, C192M, C192F, C192P, C192W, C192Y 또는 C192V) 또는 이의 임의의 조합에서 있다.

[0149] **5. 프로테아제-절단성 링커**

[0150] 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 일반적으로 하기 넘버링된 실시형태에서 제1, 제2, 제3 및 제4 링커로 지칭되는 4개의 링커를 포함하며, 제1 및 제2 링커는 하나의 폴리펩티드 사슬에 있고 제3 및 제4 링커는 다른 폴리펩티드 사슬에 있다. 도 1a 및 도 2a에 도시된 실시형태에서, 제1 및 제2 링커를 링커 A 및 링커 B로 지칭하고, 제3 및 제4 링커를 링커 C 및 링커 D로 지칭한다.

[0151] 다른 실시형태에서, 4개의 링커 (링커 A, 링커 B, 링커 C 및 링커 D에 해당하는 제1, 제2, 제3 및 제4 링커)는 모두 프로테아제 절단성이다. 이러한 실시형태에 따라 구성된 예시적인 IL2 전구단백질은 도 1a에 예시되어 있다.

[0152] 일부 실시형태에서, 제2 및 제4 링커(링커 B 및 링커 D에 해당함)는 프로테아제 절단성이고 제1 및 제3 링커(링커 A 및 링커 C에 해함)는 비절단성이다. 이러한 실시형태에 따라 구성된 예시적인 IL2 전구단백질은 도 2a에 예시되어 있다.

[0153] 프로테아제-절단성 링커는 20개 아미노산 내지 80개 이상의 아미노산의 범위일 수 있으며, 특정 측면에서, 비절단성 펩티드 링커는 20개 아미노산 내지 60개 아미노산, 20개 아미노산 내지 40개 아미노산, 30개 아미노산 내지 50개 아미노산, 20개 아미노산 내지 80개 아미노산 또는 30개 아미노산 내지 70개 아미노산 길이의 범위이다.

[0154] 프로테아제-절단성 링커는 하나 이상의 프로테아제, 예를 들어 섹션 6.5.1에서 제시되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질 서열을 포함한다. 하나 이상의 기질 서열, *예를 들어*, 섹션 6.5.2에서 제시되는 하나 이상의 기질 서열은 전형적으로 하나 이상의 스페이서 서열, *예를 들어*, 섹션 6.5.3에서 설명되는 스페이서 서열의 측면에 위치한다. 각각의 프로테아제-절단성 링커는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 기질 서열을 포함할 수 있다. 스페이서 서열은 스페이서 서열에 의해 인접하거나 중첩되거나 분리될 수 있다. 바람직하게는, 프로테아제-절단성 링커의 C- 및 N-말단은 스페이서 서열을 함유한다.

[0155] 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질의 다양한 측면에서, 제1 및 제3 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당)는 동일한 프로테아제에 의해 절단 가능하고/하거나 제2 및 제4 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 B 및 D에 해당)는 동일한 프로테아제에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 프로테아제는 표 A에 제시된 프로테아제이다.

[0156] 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질의 추가적인 측면에서, 제1 및 제3 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당)는 동일한 기질 서열을 포함하고/하거나 제2 및 제4 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 B 및 D에 해당)는 동일한 기질 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 기질 서열은 표 B에 제시되어 있다. 추가 실시형태에서, 제1 및 제3 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당함) 또한 동일한 스페이서 서열을 포함하고/하거나 제2 및 제4 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 B 및 D에 해당함) 또한 동일한 스페이서 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서 서열은 표 C에 제시되어 있다.

[0157] 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질의 추가적인 측면에서, 제1 및 제3 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당)는 동일한 링커 서열을 포함하고/하거나 제2 및 제4 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 B 및 D에 해당)는 동일한 링커 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 표 D에 제시되어 있다.

[0158] 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질의 일부 실시형태에서, 제1 및 제3 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당)는 제2 및 제4 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당)와 동일하다.

[0159] 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질의 다른 실시형태에서, 제1 및 제3 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당)는 제2 및 제4 프로테아제-절단성 링커(도 1a의 실시형태에서 링커 A 및 C에 해당)와 상이하다.

[0160] 2개의 프로테아제-절단성 링커(도 2a의 실시형태에서 링커 B 및 D에 해당)를 포함하는 IL2 전구단백질의 일부 실시형태에서, 두 프로테아제-절단성 링커는 모두 동일하다. 다른 실시형태에서, 2개의 프로테아제-절단성 링커는 상이하다.

[0161] 4개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질과 2개의 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질 전술한 측면 및 실시형태에서, 서로 다른 링커는 동일한 프로테아제, 서로 다른 프로테아제에 의해 절단될 수 있거나, 링커가 다중 기질 서열을 포함하는 경우, 서로 다른 링커는 여러 프로테아제에 의해 절단될 수 있으며, 그 중 하나 이상이 공통적이고 하나 이상이 서로 다르다.

[0162] 예시적인 프로테아제-절단성 링커 서열은 섹션 6.5.4에 제시되어 있다.

[0163] **5.1. 프로테아제**

[0164] 프로테아제-절단성 링커에 혼입될 수 있는 예시적인 프로테아제 기질 서열은 하기 표 A에 제시되어 있다.

표 1

[0165]

표 A **기질 절단용 예시적인 프로테아제**		
ADAMS, ADAMTS, *예:*	캐스페이스, *예:*	MMP24
ADAM8	캐스페이스1	MMP26
ADAM9	캐스페이스2	MMP27
ADAM10	캐스페이스3	
ADAM12	캐스페이스4	
ADAM15	캐스페이스5	
ADAM17/TACE	캐스페이스6	
ADAMDEC1	캐스페이스7	
ADAMTS1	캐스페이스8	시스테인 프로테이나제, *예:*
ADAMTS4	캐스페이스9	크루지페인
ADAMTS5	캐스페이스10	레구메인
	캐스페이스14	오투베인-2
아스파르테이트 프로테아제, *예:*		
BACE	시스테인 카텝신, *예:*	KLKs, *예:*,
레닌	카텝신 B	KLK4
	카텝신 C	KLK5
아스파르트산 카텝신, *예:*	카텝신 K	KLK6
카텝신 D	카텝신 L	KLK7
카텝신 E	카텝신 S	KLK8
	카텝신 V/L2	KLK10
NS3/4A	카텝신 X/Z/P	KLK11
PACE4		KLK13
플라스민	MMP, *예:*	KLK14
PSA	MMP1	
tPA	MMP2	메탈로 프로테이나제, *예:*
트롬빈	MMP3	메프린
트립타제		네프릴리신
uPA	MMP7	PSMA
	MMP8	BMP-1
유형 II 막횡단	MMP9	
세린 프로테아제(TTSP), *예:*	MMP10	

DESC1	MMP11	세린 프로테아제, *예:*
DPP-4	MMP12	활성화된 단백질 C
FAP	MMP13	카텝신 A
헵신	MMP14	카텝신 G
매트립타제 2	MMP15	키마제
MT/SP1/매트립타제	MMP16	응고인자 프로테아제
	MMP17	(*예:*, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
TMPRSS2	MMP19	인간 호중구 엘라스타제
TMPRSS3	MMP20	락토페린
TMPRSS4	MMP23	

[0166] 특정 실시형태에서, 프로테아제는 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP)-2, MMP-9, 레구메인 아스파라기닐 엔도펩티다아제, 트롬빈, 섬유모세포 활성화 프로테아제(FAP), MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-12, MMP-13, MMP-14, 막 유형 1 매트릭스 메탈로프로테아제(MT1-MMP), 플라스민, 막횡단 프로테아제, 세린(TMPRSS-3/4), 카텝신 A, 카텝신 B, 카텝신 D, 카텝신 E, 카텝신 F, 카텝신 H, 카텝신 K, 카텝신 L, 카텝신 L2, 카텝신 O, 카텝신 S, 캐스페이스 1, 캐스페이스 2, 캐스페이스 3 캐스페이스 4, 캐스페이스 5, 캐스페이스 6, 캐스페이스 7, 캐스페이스 8, 캐스페이스 9, 캐스페이스 10, 캐스페이스 11, 캐스페이스 12, 캐스페이스 13, 캐스페이스 14, 인간 호중구 엘라스타제, 우로키나아제/우로키나아제형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 디스인테그린 및 메탈로프로테아제(ADAM)10, ADAM12, ADAM17, 트롬보스폰딘 모티프를 갖는 ADAM(ADAMTS), ADAMTS5, 베타 세크레타제(BACE), 그랜자임 A, 그랜자임 B, 구아니디노벤조아타제, 헵신, 마트립타제, 마트립타제 2, 메프린, 네프릴리신, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 종양 괴사 인자 전환 효소(TACE), 칼리크레인-관련 펩티다아제(KLK)3, KLK5, KLK7, KLK11, C형 간염 바이러스의 NS3/4 프로테아제(HCV-NS3/4), 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA), 칼페인, 칼페인 2, 글루타메이트 카르복시펩티다아제 II, 혈장 칼리크레인, AMSH-유사 프로테아제, AMSH, γ-세크레타아제 성분, 항플라스민 절단 효소(APCE), 데시신 1, 아폽토시스-관련 시스테인 펩티다아제 또는 N-아세틸화된 알파-연결된 산성 디펩티다아제-유사 1이다.

[0167] 5.2. 기질

[0168] 종양 프로테아제로 절단 가능하고 프로테아제-절단성 링커에 혼입될 수 있는 예시적인 기질 서열은 하기 표 B에 제시되어 있다.

표 2

[0169]

표 B
프로테아제-절단성 링커에의 기질 서열

기질 서열	설계	프로테아제 절단
$(DE)_8$RPLALWRS$(DR)_8$ (SEQ ID NO: 16)	SU1	MMP7
AARGPAIH (SEQ ID NO: 17)	SU2	
AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 18)	SU3	콜라게나제
AGLGISST (SEQ ID NO: 19)	SU4	콜라게나제
AGLGVVER (SEQ ID NO: 20)	SU5	콜라게나제
ALAL (SEQ ID NO: 21)	SU6	리소좀 효소
ALFFSSPP (SEQ ID NO: 22)	SU7	
ALFKSSFP (SEQ ID NO: 23)	SU8	
ALLLALL (SEQ ID NO: 24)	SU9	TOP
AQFVLTEG (SEQ ID NO: 25)	SU10	콜라게나제
AQNLLGMV (SEQ ID NO: 26)	SU11	
AVGLLAPP (SEQ ID NO: 27)	SU12	세린 프로테아제
DAFK (SEQ ID NO: 28)	SU13	우로키나제 플라스미노겐 활성제(uPA)
DEVD (SEQ ID NO: 29)	SU14	캐스페이스-3
DEVDP (SEQ ID NO: 30)	SU15	캐스페이스-3
DPRSFL (SEQ ID NO: 31)	SU16	트롬빈
DVAQFVLT (SEQ ID NO: 32)	SU17	콜라게나제
DVLK (SEQ ID NO: 33)	SU18	플라스민

DWLYWPGI (SEQ ID NO: 34)	SU19	
EDDDDKA (SEQ ID NO: 35)	SU20	엔테로키나제
EP(Cit)G(Hof)YL (SEQ ID NO: 36)	SU21	MMP2, MMP9, MMP14
EPQALAMS (SEQ ID NO: 37)	SU22	콜라게나제
ESLPVVAV (SEQ ID NO: 38)	SU23	콜라게나제
ESPAYYTA (SEQ ID NO: 39)	SU24	MMP
F(Pip)RS	SU25	트롬빈
FK	SU26	리소좀 효소
FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 40)	SU27	
FRLLDWQW (SEQ ID NO: 41)	SU28	
GFLG (SEQ ID NO: 42)	SU29	리소좀 효소
GGAANLVRGG (SEQ ID NO: 43)	SU30	MMP11
GGGRR (SEQ ID NO: 44)	SU31	우로키나제 플라스미노겐 활성제(uPA)
GGPRGLPG (SEQ ID NO: 45)	SU32	카텝신 K
GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 46)	SU33	
GGSIDGR (SEQ ID NO: 47)	SU34	인자 Xa
GGWHTGRN (SEQ ID NO: 48)	SU35	
GIAGQ (SEQ ID NO: 49)	SU36	콜라게나제
GKAFRR (SEQ ID NO: 50)	SU37	칼리크레인 2
GPAGLYAQ (SEQ ID NO: 51)	SU38	
GPAGMKGL (SEQ ID NO: 52)	SU39	
GPEGLRVG (SEQ ID NO: 53)	SU40	콜라게나제
GPLGIAGI (SEQ ID NO: 54)	SU41	콜라게나제
GPLGVRG (SEQ ID NO: 55)	SU42	
GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 56)	SU43	콜라게나제
GPQGLLGA (SEQ ID NO: 57)	SU44	콜라게나제
GPRSFG (SEQ ID NO: 58)	SU45	
GPRSFGL (SEQ ID NO: 59)	SU46	
GPSHLVLT (SEQ ID NO: 60)	SU47	
GVSQNYPIVG (SEQ ID NO: 61)	SU48	HIV 프로테아제
GVVQASCRLA (SEQ ID NO: 62)	SU49	CMV 프로테아제
GWEHDG (SEQ ID NO: 63)	SU50	인터루킨 1β 전환 효소
HSSKLQ (SEQ ID NO: 64)	SU51	전립선 특이 항원
HSSKLQEDA (SEQ ID NO: 65)	SU52	전립선 특이 항원
HSSKLQL (SEQ ID NO: 66)	SU53	전립선 특이 항원
HTGRSGAL (SEQ ID NO: 67)	SU54	
IDGR (SEQ ID NO: 68)	SU55	인자 Xa
IEGR (SEQ ID NO: 69)	SU56	인자 Xa
ILPRSPAF (SEQ ID NO: 70)	SU57	
IPVSLRSG (SEQ ID NO: 71)	SU58	MMP
ISSGL (SEQ ID NO: 72)	SU59	MMP
ISSGLL (SEQ ID NO: 73)	SU60	MMP
ISSGLLS (SEQ ID NO: 74)	SU61	MMP
ISSGLLSS (SEQ ID NO: 75)	SU62	MMP
ISSGLSS (SEQ ID NO: 76)	SU63	MMP
KGSGDVEG (SEQ ID NO: 77)	SU64	캐스페이스-3
KQEQNPGST (SEQ ID NO: 78)	SU65	FAP
KRALGLPG (SEQ ID NO: 79)	SU66	MMP7
LAAPLGLL (SEQ ID NO: 80)	SU67	
LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 81)	SU68	
LAQKLKSS (SEQ ID NO: 82)	SU69	
LAQRLRSS (SEQ ID NO: 83)	SU70	
LEATA (SEQ ID NO: 84)	SU71	MMP9
LKAAPRWA (SEQ ID NO: 85)	SU72	
LLAPSHRA (SEQ ID NO: 86)	SU73	
LPGGLSPW (SEQ ID NO: 87)	SU74	
LSGRSANI (SEQ ID NO: 88)	SU75	세린 프로테아제

LSGRSANP (SEQ ID NO: 89)	SU76	세린 프로테아제
LSGRSDDH (SEQ ID NO: 90)	SU77	세린 프로테아제
LSGRSDIH (SEQ ID NO: 91)	SU78	세린 프로테아제
LSGRSDNH (SEQ ID NO: 92)	SU79	세린 프로테아제
LSGRSDNI (SEQ ID NO: 93)	SU80	세린 프로테아제
LSGRSDNP (SEQ ID NO: 94)	SU81	세린 프로테아제
LSGRSDQG (SEQ ID NO: 95)	SU82	세린 프로테아제
LSGRSDQH (SEQ ID NO: 96)	SU83	세린 프로테아제
LSGRSDTH (SEQ ID NO: 97)	SU84	세린 프로테아제
LSGRSDYH (SEQ ID NO: 98)	SU85	세린 프로테아제
LSGRSGNH (SEQ ID NO: 99)	SU86	세린 프로테아제
LVLASSSFGY (SEQ ID NO: 100)	SU87	단순 포진 바이러스 프로테아제
MDAFLESS (SEQ ID NO: 101)	SU88	콜라게나제
MGLFSEAG (SEQ ID NO: 102)	SU89	
MIAPVAYR (SEQ ID NO: 103)	SU90	
MVLGRSLL (SEQ ID NO: 104)	SU91	
NLL	SU92	카텝신 B
NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 105)	SU93	
NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 106)	SU94	
PAGLWLDP (SEQ ID NO: 107)	SU95	
PGGPAGIG (SEQ ID NO: 108)	SU96	
PIC(Et)FF (SEQ ID NO: 109)	SU97	카텝신 D
PLGC(me)AG (SEQ ID NO: 110)	SU98	MMP
PLGL (SEQ ID NO: 111)	SU99	
PLGLAG (SEQ ID NO: 112)	SU100	MMP
PLGLAX (SEQ ID NO: 113)	SU101	MMP
PLGLWA (SEQ ID NO: 114)	SU102	MMP
PLGLWSQ (SEQ ID NO: 115)	SU103	MMP
PLTGRSGG (SEQ ID NO: 116)	SU104	
PMAKK (SEQ ID NO: 117)	SU105	
PPRSFL (SEQ ID NO: 118)	SU106	트롬빈
PR(S/T)(L/I)(S/T)	SU107	MMP9
PRFRIIGG (SEQ ID NO: 119)	SU108	플라스민
PVGYTSSL (SEQ ID NO: 120)	SU109	
PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 121)	SU110	콜라게나제
QALAMSAI (SEQ ID NO: 122)	SU111	콜라게나제
QGRAITFI (SEQ ID NO: 123)	SU112	
QNQALRMA (SEQ ID NO: 125)	SU113	
RGPA (SEQ ID NO: 126)	SU114	
RGPAFNPM (SEQ ID NO: 127)	SU115	
RGPATPIM (SEQ ID NO: 128)	SU116	
RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 129)	SU117	플라스민
RLQLKAC (SEQ ID NO: 130)	SU118	MMP
RLQLKL (SEQ ID NO: 131)	SU119	MMP
RMHLRSLG (SEQ ID NO: 132)	SU120	
RPSPMWAY (SEQ ID NO: 133)	SU121	
RQARVVNG (SEQ ID NO: 134)	SU122	마트리파제
SAGFSLPA (SEQ ID NO: 135)	SU123	
SAPAVESE (SEQ ID NO: 136)	SU124	콜라게나제
SARGPSRW (SEQ ID NO: 137)	SU125	
SGEPAYYTA (SEQ ID NO: 138)	SU126	
SGGPLGVR (SEQ ID NO: 139)	SU127	
SGRIGFLRTA (SEQ ID NO: 140)	SU128	MMP14
SGRSA (SEQ ID NO: 141)	SU129	우로키나제 플라스미노겐 활성제(uPA)
SGRSANPRG (SEQ ID NO: 142)	SU130	
SMLRSMPL (SEQ ID NO: 143)	SU131	
SPLPLRVP (SEQ ID NO: 144)	SU132	

SPLTGRSG (SEQ ID NO: 145)	SU133	
SPRSIMLA (SEQ ID NO: 146)	SU134	
SSRGPAYL (SEQ ID NO: 147)	SU135	
SSRHRRALD (SEQ ID NO: 148)	SU136	플라스민
SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 149)	SU137	플라스민
SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 150)	SU138	플라스민
STFPFGMF (SEQ ID NO: 151)	SU139	
TARGPSFK (SEQ ID NO: 152)	SU140	
TGRGPSWV (SEQ ID NO: 153)	SU141	
TSGRSANP (SEQ ID NO: 154)	SU142	
TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 155)	SU143	
VAGRSMRP (SEQ ID NO: 156)	SU144	
VAQFVLTE (SEQ ID NO: 157)	SU145	콜라게나제
VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 158)	SU146	
VPLSLYSG (SEQ ID NO: 159)	SU147	MMP9
VVPEGRRS (SEQ ID NO: 160)	SU148	
WATPRPMR (SEQ ID NO: 161)	SU149	
YGAGLGVV (SEQ ID NO: 162)	SU150	콜라게나제
HPVGLLAR (SEQ ID NO: 163)	SU151	

[0170] ### 5.3. 스페이서

[0171] 프로테아제-절단성 링커에 혼입될 수 있는 예시적인 스페이서 서열은 하기 표 C에 제시되어 있다. 표 C에 제시된 스페이서 서열 외에도 섹션 6.6에 기재된 임의의 비절단성 링커 서열, *예를 들어* 표 E에 제시된 비절단성 링커 서열 또는 이의 부분이 스페이서 서열로서 사용될 수 있다.

표 3

[0172]

표 C **프로테아제-절단성 링커의 스페이서 서열**	
스페이서 서열	**설계**
$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 164)	SP1
$(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 165)	SP2
$(GGS)_n$ (SEQ ID NO: 166)	SP3
$(GS)_n$ (SEQ ID NO: 167)	SP4
$(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 168)	SP5
GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 169)	SP6
GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 170)	SP7
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 171)	SP8
GGGKSGGGKSGGGKS (SEQ ID NO: 172)	SP9
GGGKSGGKGSGKGGS (SEQ ID NO: 173)	SP10
GGGS (SEQ ID NO: 174)	SP11
GGGSG (SEQ ID NO: 175)	SP12
GGKGSGGKGSGGKGS (SEQ ID NO: 176)	SP13
GGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 177)	SP14
GGSGGS (SEQ ID NO: 178)	SP15
GGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 179)	SP16
GSGGG (SEQ ID NO: 180)	SP17
GSGSG (SEQ ID NO: 181)	SP18
GSS	SP19
GSSG (SEQ ID NO: 182)	SP20
GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 183)	SP21
GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 184)	SP22
GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 185)	SP23
GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 186)	SP24
GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 187)	SP25

GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 188)	SP26
GSSGT (SEQ ID NO: 189)	SP27
GSSSG (SEQ ID NO: 190)	SP28
QGQSGQ (SEQ ID NO: 191)	SP29
QGQSGQG (SEQ ID NO: 192)	SP30
QGQSGS (SEQ ID NO: 193)	SP31
QSGQ (SEQ ID NO: 194)	SP32
QSGQG (SEQ ID NO: 195)	SP33
QSGS (SEQ ID NO: 196)	SP34
SGQ	SP35
SGQG (SEQ ID NO: 197)	SP36
SGS	SP37
$(G)_n$ (SEQ ID NO: 198)	SP38

[0173] 일부 실시형태에서, 위의 표 C에 사용된 바와 같이, n은 1 내지 10의 정수, *예를 들어* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0174] **5.4. 예시적인 프로테아제-절단성 링커**

[0175] 하나 이상의 기질 서열뿐만 아니라 스페이서 서열을 포함하는 예시적인 프로테아제-절단성 링커는 하기 표 D에 제시되어 있다.

표 4

[0176]

표 D
프로테아제-절단성 링커 서열

링커 서열	**설계**	**프로테아제 절단**
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 199)	PCL1	
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 200)	PCL2	
GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 201)	PCL3	
GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 202)	PCL4	
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 203)	PCL5	
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA (SEQ ID NO: 204)	PCL6	
AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 205)	PCL7	ADAM17_2, FAPa_1, CTSL1_1
AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 206)	PCL8	FAPa_1, ADAM17_2, CTSL1_1
AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 207)	PCL9	MMP14_1, MMP14_1, MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 208)	PCL10	MMP14_1, MMP14_1, MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 209)	PCL11	MMP14_1, MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 210)	PCL12	MMP14_1, CTSL1_1, ADAM17_2
AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 211)	PCL13	CTSL1_1, ADAM17_2, FAPa_1
AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 212)	PCL14	
AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 213)	PCL15	FAPa_1, CTSL1_1, ADAM17_2
AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 214)	PCL16	
AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 215)	PCL17	
AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 216)	PCL18	
AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 217)	PCL19	
GGALFKSSFPGPAGLYAQPLAQKLKSSGGK (SEQ ID NO: 218)	PCL20	CTSL1_1, MMP14_1, ADAM17_2
GGGGSGGGGSGGGGSFVGGTGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 219)	PCL21	
GGGGSGGGGSGGGGSISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 220)	PCL22	

GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 221)	PCL23	
GGGGSGGGGSGPLGLWSQGGGGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 222)	PCL24	
GGGGSGGGGSKKAAPGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 223)	PCL25	
GGGGSGGGGSKKAAPVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 224)	PCL26	
GGGGSGGGGSPMAKKGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 225)	PCL27	
GGGGSGGGGSPMAKKVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 226)	PCL28	
GGGGSGGGGSQARAKGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 227)	PCL29	
GGGGSGGGGSQARAKVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 228)	PCL30	
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 229)	PCL31	
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSVPLSLYSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 230)	PCL32	
GGGGSGGGGSRQARVVNSVPLSLYSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 231)	PCL33	
GGGGSGGGGSVHMPLGFLGPGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 232)	PCL34	
GGGGSVHMPLGFLGPGRSRGSFPGGGGS (SEQ ID NO: 233)	PCL35	
GGGGSVHMPLGFLGPPMAKKGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 234)	PCL36	
GGGGSVHMPLGFLGPRQARVVNGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 235)	PCL37	
GGGGSVHMPLGFLGPRQARVVNGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 236)	PCL38	
GGPLAQKLKSSALFKSSFPGPAGLYAQGGR (SEQ ID NO: 237)	PCL39	ADAM17_2, CTSL1_1, MMP14_1
GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 238)	PCL40	
GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 239)	PCL41	
ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 240)	PCL42	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 241)	PCL43	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 242)	PCL44	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 243)	PCL45	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 244)	PCL46	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 245)	PCL47	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 246)	PCL48	CTSL1_1, MMP14_1
ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 247)	PCL49	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 248)	PCL50	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 249)	PCL51	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 250)	PCL52	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 251)	PCL53	MMP, 세린 프로테아제
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 252)	PCL54	
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 253)	PCL55	
KGGPGGPAGIGPLAQRLRSSALFKSSFPGR (SEQ ID NO: 254)	PCL56	FAPa_1, ADAM17_1, CTSL1_1
KSGPGGPAGIGALFFSSPPLAQKLKSSGGR (SEQ ID NO: 255)	PCL57	FAPa_1, CTSL1_2, ADAM17_2
LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 256)	PCL58	
LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 257)	PCL59	
LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 258)	PCL60	
LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 259)	PCL61	
LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 260)	PCL62	
LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 261)	PCL63	
QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 262)	PCL64	
QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 263)	PCL65	

RGGALFKSSFPLAQKLKSSGPAGLYAQGGK (SEQ ID NO: 264)	PCL66	CTSL1_1, ADAM17_2, MMP14_1
RGGGPAGLYAQPLAQKLKSSALFKSSFPGG (SEQ ID NO: 265)	PCL67	MMP14_1, ADAM17_2, CTSL1_1
SGGFPRSGGSFNPRTFGSKRKRRGSRGGGG (SEQ ID NO: 266)	PCL68	트롬빈, 인자 Xa, 헵신
SGPLAQKLKSSGPAGLYAQALFKSSFPGSK (SEQ ID NO: 267)	PCL69	ADAM17_2, MMP14_1, CTSL1_1
TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 268)	PCL70	
TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 269)	PCL71	
VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 270)	PCL72	
VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 271)	PCL73	
SGRSAGGGSGRSAGGGSGRSA (SEQ ID NO: 272)	PCL74	uPA
HPVGLLARGGGHPVGLLARGGGSGRSAGGGSGRSA (SEQ ID NO: 273)	PCL75	MPA(MMP-2 및 uPA)
GPLGVRGK (SEQ ID NO: 274)	PCL76	MMP-2
HPVGLLAR (SEQ ID NO: 163)	PCL77	MMP-2
GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 275)	PCL78	MMP-2, MMP-9, 및 일부 MT1-MMP
VPMSMRGG (SEQ ID NO: 276)	PCL79	MMP-9 및 MMP-2
IPVSLRSG (SEQ ID NO: 277)	PCL80	MMP-2 및 일부 MMP-9 또는 MMP-7
RPFSMIMG (SEQ ID NO: 278)	PCL81	MMP-9 및 MMP-7, 일부 MMP-3
VPLSLTMG (SEQ ID NO: 279)	PCL82	MMP-7, 일부 MMP-9, MMP-2, MPT-1-MMP
VPLSLYSG (SEQ ID NO: 280)	PCL83	MMP-2, MMP-9, MMP-7
IPESLRAG (SEQ ID NO: 281)	PCL84	MMP-2, MMP-7, MMP-9, 일부 MPT-1-MMP
GISSGLLSGRSDNHG (SEQ ID NO: 282)	PCL85	
GGGSISSGLLSGRSDNHGGGS (SEQ ID NO: 283)	PCL86	
GGGISSGLLSGRSDNHGGGS (SEQ ID NO: 284)	PCL87	
GGGHPVGLLARGGGS (SEQ ID NO: 285)	PCL88	
GGGSGGGSGGGGISSGLLSGRSDNHGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 286)	PCL89	
GGGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 287)	PCL90	
GGGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 288)	PCL91	
GGGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 289)	PCL92	
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 290)	PCL93	
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRS (SEQ ID NO: 291)	PCL94	

[0177] 특정 측면에서, 프로테아제-절단성 링커는 표 D에 제시되는 서열과 비교하여 최대 5개, 최대 4개, 최대 3개, 최대 2개 또는 최대 1개의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 프로테아제-절단성 링커는 표 D에서 제시되는 서열과 비교하여 1개 내지 5개의 아미노산 치환을 갖는 표 D의 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0178] **6. 비절단성 링커**

[0179] 특정 측면에서, 본 개시내용은 IL2 전구단백질의 2개 이상의 성분이 펩티드 링커에 의해 서로 연결된 IL2 전구단백질을 제공한다. 예를 들어, 링커는 Fc 도메인과 표적화 부분 또는 표적화 부분 내의 다른 도메인(예: scFv의 VH 및 VL 도메인)을 연결하는데 사용될 수 있으며 이에 국한되지 않는다.

[0180] 바람직하게는 IL2 전구단백질의 모든 링커 중 IL2 활성화를 초래하는 프로테아제-절단성 링커를 제외한 나머지 링커는 비절단성 링커(NCL)이다.

[0181] 비절단성 링커는 2개의 아미노산 내지 60개 이상의 아미노산 범위일 수 있고, 특정 측면에서 비절단성 펩티드 링커는 3개의 아미노산 내지 50개의 아미노산, 4 내지 30개의 아미노산, 5 내지 25개의 아미노산, 10 내지 25개의 아미노산, 10개의 아미노산 내지 60개의 아미노산, 12개의 아미노산 내지 20개의 아미노산, 20개의 아미노산 내지 50개의 아미노산 또는 25개의 아미노산 내지 35개의 아미노산 길이 범위이다.

[0182] 특정 측면에서, 비절단성 링커는 적어도 5개의 아미노산, 적어도 6개의 아미노산 또는 적어도 7개의 아미노산 길이이고 선택적으로 최대 30개의 아미노산, 최대 40개의 아미노산, 최대 50개의 아미노산 또는 최대 60개의 아미노산 길이이다.

[0183] 전술한 일부 실시형태에서, 비절단성 링커는 5개의 아미노산 내지 50개의 아미노산 길이 범위이며, *예를 들어*, 5 내지 50개, 5 내지 45개, 5 내지 40개, 5 내지 35개, 5 내지 30개, 5 내지 25개 또는 5 내지 20개의 아미노산 길이 범위이다. 전술한 다른 실시형태에서, 비절단성 링커는 6개의 아미노산 내지 50개의 아미노산 길이 범위이며, *예를 들어*, 6 내지 50개, 6 내지 45개, 6 내지 40개, 6 내지 35개, 6 내지 30개, 6 내지 25개 또는 6 내지 20개의 아미노산 길이 범위이다. 전술한 또한 다른 실시형태에서에서, 비절단성 링커는 7개의 아미노산 내지 50개의 아미노산 길이 범위이며, *예를 들어*, 7 내지 50개, 7 내지 45개, 7 내지 40개, 7 내지 35개, 7 내지 30개, 7 내지 25개, 또는 7 내지 20개의 아미노산 길이 범위이다.

[0184] 하전된(*예를 들어*, 하전된 친수성 링커) 및/또는 유연한 비절단성 링커가 특히 바람직하다.

[0185] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에서 사용될 수 있는 가요성 비절단성 링커의 예는 문헌[Chen 등, 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369] 및 문헌[Klein 등, 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27(10): 325-330]에서 개시되는 것을 포함한다. 특히 유용한 가용성 비절단성 링커는 글리신 및 세린의 반복부, *예를 들어*, G_nS(서열 번호: 292) 또는 SG_n(서열 번호: 293)(여기서, n은 1 내지 10의 정수, *예를 들어*, 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10임)의 단량체 또는 다합체이거나 이들을 포함한다. 일 실시형태에서, 비절단성 링커는 G_4S(서열 번호: 294)의 반복부, *예를 들어*, $(GGGGS)_n$(서열 번호: 295)의 단량체 또는 다합체이거나 이들을 포함한다.

[0186] 폴리글리신 비절단성 링커는 본 개시내용의 IL2 전구단백질에서 적합하게 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩티드 비절단성 링커는 2개의 연속 글리신(2Gly), 3개의 연속 글리신(3Gly), 4개의 연속 글리신(4Gly)(서열 번호: 296), 5개의 연속 글리신(5Gly)(서열 번호: 297), 6개의 연속 글리신(6Gly)(서열번호: 298), 7개의 연속 글리신(7Gly)(SEQ ID NO:299) 8개의 연속된 글리신(8Gly)(서열번호: 300) 또는 9개의 연속 글리신(9Gly)(서열번호: 301)을 포함한다.

[0187] 예시적인 비절단성 링커 서열은 아래 표 E에서 제시되어 있다.

표 5

[0188]

표 E
비절단성 링커 서열

링커 서열	**설계**
GGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGS (SEQ ID NO: 302)	NCL1
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 303)	NCL2
$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 295)	NCL3
$(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 304)	NCL4
$(GGS)_n$	NCL5
$(GS)_n$	NCL6
$(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 305)	NCL7
ADAAP (SEQ ID NO: 306)	NCL8
ADAAPTVSIFP (SEQ ID NO: 307)	NCL9
ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 308)	NCL10
AKTTAP (SEQ ID NO: 309)	NCL11
AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 310)	NCL12
AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 311)	NCL13
AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 312)	NCL14

AKTTPP (SEQ ID NO: 313)	NCL15
AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 314)	NCL16
ASTKGP (SEQ ID NO: 315)	NCL17
ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 316)	NCL18
EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 317)	NCL19
GEGESGEGESGEGES (SEQ ID NO: 318)	NCL20
GEGESGEGESGEGESGEGES (SEQ ID NO: 319)	NCL21
GEGGSGEGGSGEGGS (SEQ ID NO: 320)	NCL22
GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 321)	NCL23
GGEGSGGEGSGGEGS (SEQ ID NO: 322)	NCL24
GGGESGGEGSGEGGS (SEQ ID NO: 323)	NCL25
GGGESGGGESGGGES (SEQ ID NO: 324)	NCL26
GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 169)	NCL27
GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 170)	NCL28
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 171)	NCL29
GGGKSGGGKSGGGKS (SEQ ID NO: 172)	NCL30
GGGKSGGKGSGKGGS (SEQ ID NO: 173)	NCL31
GGGS (SEQ ID NO: 174)	NCL32
GGGSG (SEQ ID NO: 175)	NCL33
GGKGSGGKGSGGKGS (SEQ ID NO: 176)	NCL34
GGS	NCL35
GGSG (SEQ ID NO: 325)	NCL36
GGSGG (SEQ ID NO: 326)	NCL37
GGSGG (SEQ ID NO: 327)	NCL38
GGSGGGGSG (SEQ ID NO: 328)	NCL39
GGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 177)	NCL40
GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 329)	NCL41
GKGGSGKGGSGKGGS (SEQ ID NO: 330)	NCL42
GKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 331)	NCL43
GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 332)	NCL44
GKPGSGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 333)	NCL45
GKPGSGKPGSGKPGSGKPSGS (SEQ ID NO: 334)	NCL46
GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 335)	NCL47
GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 336)	NCL48
GSGGG (SEQ ID NO: 180)	NCL49
GSGSG (SEQ ID NO: 181)	NCL50
GSS	NCL51
GSSG (SEQ ID NO: 182)	NCL52
GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 183)	NCL53
GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 184)	NCL54
GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 185)	NCL55
GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 186)	NCL56
GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 187)	NCL57
GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 188)	NCL58
GSSGT (SEQ ID NO: 189)	NCL59
GSSSG (SEQ ID NO: 190)	NCL60
GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 337)	NCL61
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG (SEQ ID NO: 338)	NCL62
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG (SEQ ID NO: 339)	NCL63
IRPRAIGGSKPRVA (SEQ ID NO: 340)	NCL64
KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 341)	NCL65
KTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 342)	NCL66
PRGASKSGSASQTGSAPGS (SEQ ID NO: 343)	NCL67
QPKAAP (SEQ ID NO: 344)	NCL68
QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 345)	NCL69
$RADAAAA(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 346)	NCL70
RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 347)	NCL71
RADAAP (SEQ ID NO: 348)	NCL72

RADAAPTVS (SEQ ID NO: 349)	NCL73
SAKTTP (SEQ ID NO: 350)	NCL74
SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 351)	NCL75
SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 352)	NCL76
STAGDTHLGGEDFD (SEQ ID NO: 353)	NCL77
TVAAP (SEQ ID NO: 354)	NCL78
TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 355)	NCL79
TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 356)	NCL80

[0189] 특정 측면에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 N- 내지 C-말단 배향으로 표적화 부분(또는 표적화 부분 사슬), 힌지 도메인 및 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있다. 따라서 힌지 도메인은 표적화 부분와 CH2 도메인을 연결해 일종의 링커를 구성한다고 할 수 있다. 예시적인 힌지 도메인은 섹션 6.9.3에서 제시되어 있다.

[0190] **7. 표적화 부분**

[0191] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 표적화 모이어티을 혼입하면 전신 노출을 동시에 감소시키면서 종양 미세환경으로 고농도의 IL2를 전달할 수 있어, 차폐되지 않은 IL2 분자를 사용할 때보다 부작용이 적다.

[0192] 특정 부위 또는 조직에서 IL2 전구단백질이 존재하거나 이를 유도할 수 있는 임의의 유형의 표적 분자가 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 의해 표적화될 수 있을 것으로 예상된다. 일부 실시형태에서, IL2 전구단백질은 *예를 들어*, 종양 조직에 대한 국소 면역 반응을 유도하여 암을 치료하도록 의도된다. 따라서, 표적화 분자는 임의의 국소 종양 및 연관된 표적 분자일 수 있다. 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 표적화 모이어티에 의해 인식되는 표적 분자는 일반적으로 예를 들어, 활성화된 T 세포의 표면, 종양 세포의 표면, 바이러스에 감염된 세포의 표면, 다른 질환을 앓는 세포의 표면, 혈청, 세포외 기질(ECM) 또는 표적 부위에 존재하는 면역 세포, *예를 들어,* 종양 반응성 림프구상에서 발견된다.

[0193] 다양한 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에서 발견된다. 통상의 기술자는 표적 분자의 전술한 범주가 상호 배타적이지 않으며 따라서 주어진 표적 분자가 표적 분자의 전술한 범주 중 하나 이상에 속할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 일부 분자는 TAA와 ECM 단백질로 간주될 수 있고 다른 분자는 TCA와 면역관문 억제제로 간주될 수 있다.

[0194] 표적화될 수 있는 예시적인 암 유형은 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 담관암, B세포 백혈병, B세포 림프종, 담관암, 골암, 뇌암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 자궁경부암, 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 담낭암, 위암, 위장관암, 신경교종, 모세포 백혈병, 두경부암, 호지킨 림프종, 간암, 폐암, 수질성 갑상선암, 흑색종, 다발성 골수종, 난소암, 비호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암, 폐관암, 신장암, 육종, 피부암, 고환암, 요로상피암및 다른 요로 방광암을 포함한다. 그러나, 통상의 기술자라면 종양 미세환경과 연관된 TAA와 다른 표적 분자가 사실상 모든 유형의 암에 알려져 있다는 것을 인식할 것이다.

[0195] ECM 항원의 비제한적 예는 신디칸, 헤파라나제, 인테그린, 오스테오폰틴, 링크, 카드헤린, 라미닌, 라미닌 유형 EGF, 렉틴, 피브로넥틴, 노치, 넥틴(*예를 들어*, 넥틴-4), 테나신, 콜라겐(*예를 들어*, 콜라겐 유형 X) 및 마트릭스인을 포함한다.

[0196] 다른 표적 분자는 종양이나 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, 예를 들어 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 및 B7-H3와 같은 T 세포 공동-자극 단백질이 있다.

[0197] 특정 실시형태에서, 표적 분자는 면역분자 억제제, 예를 들어 CTLA-4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2이다. 특정 실시형태에서, 표적 분자는 PD1이다. 다른 실시형태에서, 표적 분자는 LAG3이다.

[0198] 항체와 항원 결합 부분은 일반적으로 특정 항원 결정인자에 결합하고 IL2 전구단백질을 표적 부위, 예를 들어, 항원 결정인자를 포함한 특정 유형의 종양 세포 또는 종양 기질로 유도할 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화 부분은 종양 관련 항원(TAA)을 인식한다. 바람직하게는, TAA는 인간 TAA이다. 항원은 정상 세포상에 존재할 수

도 있고 존재하지 않을 수도 있다. 특정 실시형태에서, TAA는 정상 세포와 비교하여 종양 세포에서 우선적으로 발현되거나 상향조절된다. 다른 실시형태에서, TAA는 계통 마커이다. 예시적인 TAA는 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 테나신-C의 A1 도메인(TNC A1), 테나신-C의 A2 도메인(TNC A2), 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B(EDB), 흑색종 연관 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸(MCSP), MART-1/Melan-A, gp100, 디펩티딜 펩티다제 IV(DPPIV), 아데노신 데아미나제 결합 단백질(ADAbp), 시클로필린 b, 결장직장 연관 항원(CRC)-C017-1A/GA733, 암배아 항원(CEA) 및 이의 면역원성 에피토프 CAP-1 및 CAP-2, etv6, aml1, 전립선 특이적 항원(PSA) 및 이의 면역원성 에피토프 PSA-1, PSA-2 및 PSA-3, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), T 세포 수용체/CD3-제타 사슬, 종양 항원의 MAGE 계열(*예를 들어*, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2(MAGE-B2), MAGE-Xp3(MAGE-B3), MAGE-Xp4(MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), GAGE 계열 종양 항원(*예를 들어*, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE- 7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나제, p53, MUC 계열, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α-태아단백질, E-카데린, α-카테닌, β-카테닌 및 γ-카테닌, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 선종성 폴립증 대장균 단백질(APC), 포드린, Connexin 37, Ig-이디오타입, p15, gp75, GM2 및 GD2 강글리오시드, 인간 유두종 바이러스 단백질과 같은 바이러스 생성물, Smad 종양 항원 계열, Imp-1, P1A, EBV 암호화 핵 항원(EBNA)-1, 뇌 글리코겐 포스포릴라제, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 CT-7, c-erbB-2, Her2, EGFR, IGF-1R, CD2(T-세포 표면 항원) , CD3(TCR과 연관된 이종다량체), CD22(B-세포 수용체), CD23(낮은 친화도 IgE 수용체), CD30(사이토카인 수용체), CD33(골수 세포 표면 항원), CD40(종양 괴사 인자 수용체), IL- 6R-(IL6 수용체), CD20, MCSP, PDGFβR(β-혈소판 유도 성장 인자 수용체), ErbB2 상피 세포 접착 분자(EpCAM), EGFR 변이체 III(EGFRvIII), CD19, 디시알로강글리오시드 GD2, 관상피 뮤신, gp36 , TAG-72, 신경교종-연관 항원, β-인간 융모성 성선자극호르몬, 알파페토단백질(AFP), 렉틴-반응성 AFP, 티로글로불린, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사 효소, RU1, RU2(AS), 장 카르복실 에스테라제, mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타제, 프로스타제 특이적 항원(PSA), PAP, LAGA-1a, p53, 프로스테인, PSMA, 생존 및 텔로머라제, 전립선암종 종양 항원-1(PCTA-1), ELF2M, 호중구 엘라스타제, 에프린 B2, 인슐린 성장 인자(IGF1)-I, IGF-II, IGFI 수용체, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, 종양 간질 항원, 피브로넥틴의 추가 도메인 A(EDA) 및 추가 도메인 B(EDB) 및 테나신-C의 A1 도메인(TnC A1)을 포함한다.

[0199] 적합한 표적화 부분 형식은 섹션 6.8에서 설명되어 있다. 표적화 부분은 바람직하게는 항원 결합 부분, 예를 들어, 항체 또는 항체의 항원 결합 부분, *예를 들어*, 섹션 6.8.2에서 설명되는 scFv 또는 섹션 6.8.1에서 설명되는 Fab이다.

[0200] 일부 실시형태에서, 표적화 부분은 표적화 부분의 기초가 될 수 있는 예시적인 항체 또는 항체 서열에 대한 언급과 함께 아래 표 F에서 제시되는 예시적인 표적 분자를 표적화한다.

표 6

[0201]

표 F
예시적 표적 분자

표적	**항체명 및/또는 결합 서열**
1-92-LFA-3	Amevive™(알레파셉트)
5T4	GEN1044
액티빈 수용체 유형 II	비마그루맙VH: 미국 특허 번호 8,388,968 B2의 서열 번호:107, 109 VL: 미국 특허 번호 8,388,968 B2의 서열 번호:93, 95
B7-H3	오브린다타맙(MGD009)
B7-H3 (CD276)	에노블리투주맙(MGA271)
B7-H3 (CD276)	MGC018
B7-H3 (CD276)	MGA012
B7-H3 (CD276)	8H9
B7-H3 (CD276)	VH: 미국 2021/0171641 A1의 서열 번호:21, 26 또는 31의 중쇄의 VH 서열. VL: 미국 2021/0171641 A1의 서열 번호:20, 22 또는 30의 경쇄의 VL 서열.
B7-H3 (CD276)	VH: 미국 2019/0002563 A1의 서열 번호:21, 29 또는 37의 중쇄의 VH 서열. VL: 미국 2019/0002563 A1의 서열 번호:17, 25 또는 33의 경쇄의 VL 서열.

B7-H3 (CD276)	VH: 미국 특허 번호 10,640,563의 서열 번호:146, 147 또는 148의 중쇄의 VH 서열.VL: 미국 특허 번호 10,640,563의 서열 번호:143, 144 또는 145의 경쇄의 VL 서열.
BAFF/B 림프구 자극 인자	Benlysta™(벨리무맙)
BAFF/B 림프구 자극 인자	VH: 미국 특허 번호 7,138,501의 서열 번호:327의 아미노산 1-123VL: 미국 특허 번호 7,138,501의 서열 번호:327의 아미노산 139-249.
BAFF/B 림프구 자극 인자	VH: 미국 특허 번호 7,605,236의 서열 번호:1321의 아미노산 1-126;VL: 미국 특허 번호 7,605,236의 서열 번호:1049의 아미노산 143-251.
BAFF/B 림프구 자극 인자	벨리무맙
BCMA	VH: 미국 2021/0206865 A1의 서열 번호 126의 중쇄의 VH 서열VL: 미국 2021/0206865 A1의 서열 번호 129 또는 서열 번호 132의 경쇄 VL 서열
CA125	이고부맙
CA125	OvaRex™(오레고부맙)
카드헤린	항체는 미국 공개 번호 미국 2006/0039915에서 설명되었다.
N-카드헤린	항체는 미국 공개 번호 미국 2010/0278821의 서열 번호: 10, 17 또는 18의 아미노산 서열에 결합한다.
CD11a	Raptiva™(에팔리주맙)문헌[Werther 등, 1996, The Journal of Immunology 157(11): 4986-4995]의 서열.
CD19	Blincyto™(블리나투모맙)
CD19	SGN-CD19A
CD20	Bexxar™(토시투모맙) VH: 미국 특허 공개 미국 2017/0002060 A1의 서열 번호:124의 중쇄의 VH 서열 VL: 미국 특허 공개 미국 2017/0002060 A1의 서열 번호:125의 중쇄의 VL 서열
CD20	Zevalin™(이브리투모맙 티욱세탄) VH: 미국 특허 번호 5,736,137의 서열 번호:9 VL: 미국 특허 번호 5,736,137의 서열 번호:6
CD20	Rituxan™(리툭시맙)VH: 미국 특허 번호 5,736,137의 서열 번호:9 VL: 미국 특허 번호 5,736,137의 서열 번호:6
CD20	Ocrevus™(오크렐리주맙)
CD20	오카라투주맙
CD20	Arzerra™(오파투무맙) VH: 미국 특허 번호 8,529,902의 서열 번호:2 VL: 미국 특허 번호 8,529,902의 서열 번호:4
CD20	Gazyva™(오비누투주맙)
CD20	VH: 미국 2021/0206870 A1의 서열 번호: 4미국 2021/0206870 A1의 서열 번호:6의 VL
CD20	엡코리타맙
CD22	벨리무맙
CD22	에프라투주맙
CD22	Besponsa ™(이노투주맙 오조가미신)
CD22	Lumoxiti ™(목세투무맙 파수독스)
CD22	피나투주맙 베도틴
CD25	Zenapax™(다클리주맙) VH: 미국 특허 번호 7,060,269의 서열 번호:9 VL: 미국 특허 번호 7,060,269의 서열 번호:10
CD30	Adcetris™(브렌툭시맙 베도틴) VH: 미국 특허 번호 7,090,843의 서열 번호:2 VL: 미국 특허 번호 7,090,843의 서열 번호:10
CD33	Myelotarg™(젬투주맙) 문헌[Man Sung, 등, 1993, Molecular immunology 30:1361-1367]의 서열
CD33	린투주맙
CD38	Darzalex™(다라투무맙)
CD40	루카투무맙
CD40	다세투주맙

CD40L	Hu5c8(루플리주맙)
CD44v6	비바투주맙 메르탄신
CD52	Campath™(알렘투주맙) VH: 미국 특허 공개 미국 2017/0002060 A1의 서열 번호:1 VL: 미국 특허 공개 미국 2017/0002060 A1의 서열 번호:2
CD70	Blenrep™(보르세투주맙 마포도틴)
CD123	플로테투주맙
CD221	Tepezza™(테프로투무맙)
CEA	Hybri-Ceaker®(알투모맙 펜테테이트)
CEA	Scintimun™(베실레소맙)
CEA	CEA-CIDE™(라베투주맙)
CEA	CEA-Scan™(아르시투모맙)
CEA	hMN-15미국 특허 번호 8,771,690 B2의 서열 번호:4-6의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열 미국 특허 번호 8,771,690 B2의 서열 번호:1-3의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열
CEA	임상 시험 NCT02324257의 RO6958688/RG7802의 CEA 결합 부분
CEA	시비사타맙
CEA	임상 시험 NCT01284231 및 NCT02291614의 MEDI-565/MT110/AMG211의 CEA 결합 부분VH: PCT 공개 번호 WO 2013/012414 A1의 서열 번호:49 또는 51 VL: PCT 공개 번호 WO 2013/012414 A1의 서열 번호:48.
CEA	라베투주맙
CEA	아테졸리주맙
CEA	시비사타맙
CEA	MEDI-565(AMG211, MT111)
CEA	RO6958688
CEA	VH: WO2022/048883A1에서 설명되는 서열 번호 9 VL: WO2022/048883A1에서 설명되는 서열 번호 10
CLDN18.2	AMG910
콜라겐 알파-4 사슬	TRC093 (MT293)
콜라겐	문헌[Liang, H. 등 A collagen-binding EGFR antibody fragment targeting tumors with a collagen-rich extracellular matrix. Sci. Rep. 5, 18205; doi: 10.1038/srep18205 (2016)]에서 설명되는 콜라겐 결합 항체 단편.
콜라겐 유형 I	세툭시맙(에르비툭스)
콜라겐 유형 X	PCT 공개 번호 WO 2019/020797의 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 서열.
콜라겐 유형 X	PCT 공개 번호 WO 2014/180992의 서열 번호: 1의 아미노산 서열.
콜라겐 유형 X	문헌[I. Girkontaite 등, "Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies," Matrix Biol 15, 231-238 (1996)]에서 설명되는 바와 같은 항체 X34.
콜라겐 유형 X	ThermoFisher Scientific의 카탈로그 번호 PA5-115039 또는 PA5-116871 또는 PA5-97603 또는 PA5-49198하에서 판매되는 X53 또는 1H8 또는 ARC0659 또는 JF0961 콜라겐 X 다중클론 항체
콜라겐 유형 X	RDI로부터 카탈로그 번호 제RDI-COLL10abr호로 판매되는 항체.
보체 C5	Soliris™(에쿨리주맙)VH: 미국 특허 번호 6,355,245의 서열 번호: 10의 아미노산 1-122 VL: 미국 특허 번호 6,355,245의 서열 번호: 9의 아미노산 3-110
CTLA-4	Yervoy™(이필리무맙) VH: WO 2001/014424 A2의 서열 번호: 17 VL: WO 2001/014424 A2의 서열 번호: 7
CTLA-4	(트레멜리무맙)
CTLA-4	Orencia™(아바타셉트)
DLL3	AMG757
EGFR	Erbitux™(세툭시맙)VH: 미국 특허 번호 6,217,866의 서열 번호: 11 VL: 미국 특허 번호 6,217,866의 서열 번호: 13

EGFR	Vectibix™(파니투무맙) VH: 미국 특허 번호 6,235,883의 서열 번호: 37 VL: 미국 특허 번호 6,235,883의 서열 번호: 38
EGFR	잘루투무맙VH: WO 2018/140831 A2의 서열 번호: 64 VL: WO 2018/140831 A2의 서열 번호: 69
EGFR	마파투무맙
EGFR	마투주맙
EGFR	니모투주맙 VH: WO 2018/140831 A2의 서열 번호: 51 VL: WO 2018/140831 A2의 서열 번호: 56
EGFR	ICR62
EGFR	mAb 528
EGFR	CH806
EGFRv3	AMG596
EGFRv3	AMG404
EGFR/CD64	MDX-447
EpCAM	Panorex™(에드레콜로맙) VH: WO 2018/140831 A2의 서열 번호:129 VL: WO 2018/140831 A2의 서열 번호:134
EpCAM	아데카투무맙 VH: WO 2018/140831 A2의 서열 번호:142 VL: WO 2018/140831 A2의 서열 번호:147
EpCAM	투코투주맙 셀몰류킨
EpCAM	시타투주맙 보가톡스
EpCAM	EP1629013 B1 VH: 서열 번호: 80, 84, 88, 92 또는 96 VL: 서열 번호: 82, 86, 90, 94 또는 98
EpCAM	G8.8 HC: 미국 특허 공개 번호 미국 2020/0317806 A1의 서열 번호: 4 HL: 미국 특허 공개 번호 미국 2020/0317806 A1의 서열 번호: 3
EpCAM	VH: WO 2021/211510 A2의 서열 번호: 17-22.VL: WO 2021/211510 A2의 서열 번호: 15-16.
EpCAM	Removab™(카투막소맙)
EpCAM	Vicineum™(오포르투주맙 모나톡스)
EpCAM	M701
RSV의 F 단백질	Synagic™(팔리비주맙)
GD2	3F8
당단백질 수용체 IIb/IIIa	ReoPro™(아비식시맙)
gpA33	MGD007
GPC3	ERY974
GUCY2C	PF-07062119
헤파라나제	항체는 HP130, HP 239, HP 108.264, HP 115.140, HP 152.197, HP 110.662, HP 144.141, HP 108.371, HP 135.108, HP 151.316, HP 117.372, HP 37/33, HP3/17, HP 201 또는 HP 102 또는 미국 특허 공개 미국 2004/0170631에 기재된 서열 번호:1-11의 아미노산 서열로부터 선택된다.
Her2	Herceptin™(트라스투주맙)
Her2	알데스류킨(프로류킨)
Her2	사르그라무스팀(류킨)
Her2	M802
Her2	루니모타맙(BTRC4017A, RO7227780)
Her2	ISB1302
Her2-neu	Perjeta™(페르투주맙)VH: WO 2013/096812 A1의 서열 번호:16. VL: WO 2013/096812 A1의 서열 번호:15.
Her2-neu	Rexomun™(에르투막소맙)
IgE	Xolair™(오말리주맙)
IGFIR	(피기투무맙)

IL1β	Ilaris™(카나키누맙) VH: 미국 특허 번호 7,446,175의 서열 번호:1. VL: 미국 특허 번호 7,446,175의 서열 번호: 2
IL12/IL23	Stelara™(우스테키누맙)
IL1Ra	Antril™, Kineret™(안킨라)
IL2R	Simulect™(바실릭시맙)VH: 미국 특허 번호 6,383,487의 서열 번호: 3 VL: 미국 특허 번호 6,383,487의 서열 번호: 6
IL6	클라자키주맙
IL6 수용체	Actemra™(토실리주맙)VH: 미국 특허 번호 7,479,543의 서열 번호: 31 VL: 미국 특허 번호 7,479,543의 서열 번호: 29
IL12/IL23 p40 하위단위	Stelara™(우스테키누맙)VH: 미국 특허 번호 6,902,734의 서열 번호: 7 VL: 미국 특허 번호 6,902,734의 서열 번호: 8
인테그린 α4	Tysabri™(나탈리주맙) VH: 미국 특허 번호 5,840,299의 서열 번호: 11-13 VL: 미국 특허 번호 5,840,299의 서열 번호: 7-8
인테그린 α4 β7	Entyvio™(베돌리주맙)HC: 미국 특허 공개 미국 2012/0282249의 서열 번호: 2. LC: 미국 특허 공개 미국 2012/0282249의 서열 번호: 4.
인테그린 α5 β1	VH: 유럽 특허 번호 제1 755 659호의 서열 번호: 2.VL: 유럽 특허 번호 제1 755 659호의 서열 번호: 4.
인테그린 β1	VH: 미국 특허 공개 미국 2022/0089744의 서열 번호:2, 6, 8, 10, 12, 14, 29-43 또는 91-100.VL:, 미국 특허 공개 미국 2022/0089744의 서열 번호:4, 16, 18, 20, 22, 44-57 또는 107-116.
LAG-3	렐라트리맙(BMS-98016)
LAG-3	Sym022
LAG-3	HLX26
LAG-3	TSR-033
LAG-3	ABL501
LAG-3	INCAGN02385
LAG-3	피안리맙(REGN3767)
LAG-3	RO7247669
LAG-3	EMB-02
LAG-3	FS118
LAG-3	GSK2831781
LAG-3	IBI323
LAG-3	IBI110
LAG-3	LAG525
LAG-3	XmAb®22841
LAG-3	LBL-007
LAG-3	VH: 미국 특허 번호 9,902,772의 서열 번호:1, 8, 10 또는 12.VL: 미국 특허 번호 9,902,772의 서열 번호:2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13 또는 14.
LAG-3	VH: 미국 특허 공개 미국 2021/0095026의 서열 번호: 182.VL: 미국 특허 공개 미국 2021/0095026의 서열 번호: 88.
라미닌	Sigma Aldrich의 Lam-89
메조텔린	아마툭시맙
메조텔린	HPN536
MUC1	시바투주맙 테트라세탄
MUC1	Pankomab™(가티포투주맙)
MUC1	퀌투무맙
MUC1	칸투주맙 라브탄신
MUC16 (CA125)	미국 2018/0118848A1에서 다음 서열 번호: 쌍 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 VL 서열을 갖는 항-MUC16 항체: 18/26; 82/858; 98/170
MUC17	AMG199

넥틴-4	엔포투맙(ASP7465, ASG-22CE, ASG-22ME) VH: PCT 공개 WO 2021/151984의 서열 번호:3. VL: PCT 공개 WO 2021/151984의 서열 번호:4.
넥틴-4	SBT290
넥틴-4	VH: 미국 특허 번호 11,274,160의 서열 번호:1.VL: 미국 특허 번호 11,274,160의 서열 번호:2.
NGF	(타네주맙)
오스테오폰틴	HC: PCT 공개 WO 2021/030209의 서열 번호:22.LC: PCT 공개 WO 2021/030209의 서열 번호:24.
PD1	MDX-1106/BMS-936558(니볼루맙)은 문헌[WHO Drug Information, 제27권, 번호 1, 제68-69 페이지(2013)]에서 설명되는 구조를 갖는 인간 IgG4 mAb이며, 이 중 중쇄 및 경쇄 서열은 미국 공개 번호 미국20190270812A1의 도 7에서 개시되어 있다.
PD1	MK-3475(펨브로릴주맙)은 문헌[WHO Drug Information, 제27권, 번호 2, 제161-162 페이지(2013)]에서 설명되는 구조를 갖는 인간화된 IgG4 mAb이며, 이 중 중쇄 및 경쇄 서열은 미국 공개 번호 미국20190270812A1의 도 6에서 개시되어 있다.
PD1	REGN2810(미국 공개 번호 20150203579에서 H4H7798N로서 개시됨)
PD1	PCT 공개 WO2015112800A1의 서열 번호: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 1 14/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202, 298/186, 306/186 및 314/186을 갖는 VH/VL 쌍을 갖는 항-PD1 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는 PCT 공개 WO2015112800A1.
PD1	MEDI-0680 (AMP-514)
PD1	PDR001
PD1	BGB-108
PD1	WO2008/156712에서 설명되는 h409A11
PD1	WO2008/156712에서 설명되는 h409A16
PD1	WO2008/156712에서 설명되는 h409A17
PD1	미국 특허 번호 7488802에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	미국 특허 번호 7521051에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	미국 특허 번호 8008449에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	미국 특허 번호 8354509에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	미국 특허 번호 8168757에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	PCT 공개 번호 WO2004/004771에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	PCT 공개 번호 WO2004/056875에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	PCT 공개 번호 WO2004/072286에서 설명되는 항-PD1 항체
PD1	미국 공개 번호 미국2011/0271358에서 설명되는 항-PD1 항체
PDL1	더발루맙(MEDI4736)
PDL1	아테졸리주맙(Tecentriq, MPDL3280A)
PDL1	MDX 1105(BMS-936559)
PDL1	아벨루맙
PDL1	ZKAB001(소카졸리맙)
PDL1	TQB2450
PDL1	MEDI4736
PDL1	HLX20
PDL1	KN035
PDL1	LY3434172
PDL1	LY3300054
PDL1	LDP
PDL1	EMB-09
PDL1	ABL501
PDL1	INBRX-105
PDL1	SHR-1210
PDL1	STI-3031 (IMC-001)
PDL1	MPDL3280A (RG7446)
PDL1	KN035
PDL1	BGB-A333

PDL1	HLX301
PDL1	Y101D
PDL1	ES101
PDL1	IBI322
PDL1	엔바폴리맙
PDL1	VH: 미국 특허 번호 11,168,144의 서열 번호:46, 48, 50 또는 52.VL: 미국 특허 번호 11, 168,144의 서열 번호:58, 137 또는 12.
PDL1	VH: 미국 특허 번호 11,208,486의 서열 번호:23, 124, 126, 127, 128, 130, 140 또는 145.VL: 미국 특허 번호 11,208,486의 서열 번호:24 또는 125.
포스파티딜세린	(바비툭시맙)
PSCA	GEM3PSCA
PSMA	huJ591
PSMA	WO 2017/023761A1의 다음 서열 번호 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 VL 서열을 갖는 항- PSMA 항체: 2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 1 14/1642; 122/130; 및 138/146.
PSMA	WO2003034903A2에서 설명되는 PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgemx 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgemx 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1 및 Abgenix 4.152.1과 같은 항체WO 2003/034903A2 에서 설명되는 PSMA 3.7 (PTA-3257), PSMA 3.8, PSMA 3.9 (PTA-3258), PSMA 3.11 (PTA-3269), PSMA 5.4 (PTA-3268), PSMA 7.1 (PTA-3292), PSMA 7.3 (PTA-3293), PSMA 10.3 (PTA-3247) , PSMA 1.8.3 (PTA-3906), PSMA A3.1.3 (PTA- 3904), PSMA A3.3.1 (PTA-3905), Abgenix 4.248.2 (PTA-4427), Abgenix 4.360.3 (PTA-4428), Abgenix 4.7.1 (PTA-4429), Abgenix 4.4.1 (PTA-4556), Abgenix 4.177.3 (PTA-4557), Abgenix 4.16.1 (PTA-4357), Abgenix 4.22.3 (PTA-4358), Abgenix 4.28.3 (PTA-4359), Abgenix 4.40.2 (PTA-4360), Abgenix 4.48.3 (PTA-4361), Abgenix 4.49.1 (PTA-4362), Abgenix 4.209.3 (PTA-4365), Abgenix 4.219.3 (PTA-4366), Abgenix 4.288.1 (PTA-4367), Abgenix 4.333.1 (PTA-4368), Abgenix 4.54.1 (PTA-4363), Abgenix 4.153.1 (PTA-4388), Abgenix 4.232.3 (PTA-4389), Abgenix 4.292.3 (PTA-4390), Abgenix 4.304.1 (PTA-4391), Abgenix 4.78.1 (PTA-4652), 및 Abgemx 4.152.1(PTA-4653)과 같은 하이브리도마 세포주. WO 2003/034903A2에서 설명되는 서열 번호: 2-7의 VH WO 2003/034903A2에서 설명되는 서열 번호: 8-13의 VL
PMSA	VH: WO 2011/121110A1에서 설명되는 서열 번호: 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 351, 365, 379, 393, 407, 421, 435, 449, 463, 477, 491, 505, 519, 533, 547, 561, 575, 589, 603 또는 617.WO 2011/121110A1에서 설명되는 VL 서열 번호: 230, 244, 258, 272, 286, 300, 314, 328, 342, 356, 370, 384, 398, 412, 426, 440, 454, 468, 482, 496, 510, 524, 538, 552, 566, 580, 594, 608 또는 622. WO 2011/121110A1에서 설명되는 VH 및 VL 서열 번호: 235, 249, 263, 277, 291, 305, 319, 333, 347, 361, 375, 389, 403, 417, 431, 445, 459, 473, 487, 501, 515, 529, 543, 557, 571, 585, 599, 613 또는 627.
PMSA	미국 2022/0119525 A1의 서열 번호: 229-312 중 하나의 VL 아미노산 서열과 미국 2022/0119525 A1의 서열 번호: 217의 VH 아미노산 서열을 갖는 항-PMSA 항체.
PMSA	ES414
PMSA	BAY2010112 (파소툭시주맙)
PMSA	CCW702
PMSA	JNJ-63898081
PMSA	CC-1

PMSA	아카파타맙
PSMA	HPN424
RAAG12	RAV12
RANKL	Prolia™(데노수맙)VH: 미국 특허 공개 2017/0002060의 서열 번호:51 VL: 미국 특허 공개 2017/0002060의 서열 번호:52
SLAMF7	Empliciti™(엘로투주맙)
SSTR2	XmAb®18087
STEAP1	미국20210179731A1에 설명된 VHCDR1 서열 번호:14, 33, 182,184또는 185.미국20210179731A1에 설명된 VHCDR2 서열 번호:15, 21, 34, 182,184또는 185. 미국20210179731A1에 설명된 VHCDR3 서열 번호:16및 35. 미국20210179731A1에 설명된 VH 서열 번호:182또는 184. 미국20210179731A1에 설명된 VLCDR1 서열 번호:11또는 30. 미국20210179731A1에 설명된 VLCDR2 서열 번호:12또는 31. 미국20210179731A1에 설명된 VLCDR3 서열 번호:13또는 32. 미국20210179731A1에 설명된 VL 서열 번호:183또는 186.
STEAP1	AMG509
STEAP2	미국 특허 번호 10,772,972 B2의 서열 번호: (1) 4-6-8-12-14-16; (2) 20-22-24-28-30-32; (3) 36-38-40-44-46-48; (4) 52-54-56-60-62-64; (5) 68-70-72-60-62-64; (6) 76-78-80-60-62-64; (7) 84-86-88-60-62-64; (8) 92-94-96-60-62-64; (9) 100-102-104-60-62-64; (10) 108-110-112-116-118-120; (11) 124-126-128-132-134-136; (12) 140-142-144-148-150-152; (13) 156-158-160-164-166-168; (14) 172-174-176-180-182-184; (15) 188-190-192-196-198-200; (16) 204-206-208-212-214-216; (17) 220-222-224-228-230-232; (18) 236-238-240-244-246-248; (19) 252-254-256-260-262-264; (20) 268-270-272-276-278-280; (21) 284-286-288-292-294-296; (22) 300-302-304-308-310-312; (23) 316-318-320-324-326-328; (24) 332-334-336-340-342-344; (25) 348-350-352-356-358-360; (26) 364-366-368-372-374-376; 및 (27) 380-382-384-388-390-392로부터 선택되는 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 갖는 항-STEAP 2 항체. (a) 미국 특허 번호 10,772,972 B2의 서열 번호: 2, 18, 34, 50, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362 및 378 중 임의의 하나의 아미노산을 포함하는 VH; 및 (b) 미국 특허 번호 10,772,972 B2의 서열 번호: 10; 26; 42; 58; 114; 130; 146; 162; 178; 194; 210; 226, 242; 258; 274; 290; 306; 322; 338; 354; 370; 및 386 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 갖는 항-STEAP 2 항체. 미국 특허 번호 10,772,972 B2의 다음 서열 번호 쌍 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VH/VL 쌍을 갖는 항-STEAP 2 항체: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; 및 378/386.
신데칸-1(CD 138)	문헌[Wijdenes 등 (1996) Br. J. Haematol., 94: 318-323]에서 설명되는 B-B4 항체
신데칸-4	유럽 특허 공개 EP 2 603 236에서 설명되는 서열 번호: 1의 아미노산 93 및 121의 아미노산 서열 또는 서열 번호:2의 아미노산 92 및 122의 아미노산 서열.
TGFβ	GC1008
TNFR	Enbrel™(에타너셉트)
TNFα	Remicade™(인플릭시맙) VH: 국제 특허 공개 제WO201/3087911 A1호의 서열 번호:2 VH: 국제 특허 공개 제WO2013/ A1087911호의 서열 번호:3
TNFα	Humira™(아달리무맙)VH: 미국 특허 번호 6,258,562의 서열 번호:4 VL: 미국 특허 번호 6,258,562의 서열 번호:3
TNFα	Cimzia ™(세르톨리주맙 페골)VH: 미국 특허 번호 7,012,135의 서열 번호:14 VL: 미국 특허 번호 7,012,135의 서열 번호:9

TNF α	Simponi ™(골리무맙)VH: 미국 특허 번호 7,250,165의 서열 번호:7 VL: 미국 특허 번호 7,250,165의 서열 번호:8
VEGF	Avastin™(베바시주맙)VH: 미국 특허 번호 7,060,269의 서열 번호:9 VL: 미국 특허 번호 7,060,269의 서열 번호:10
VEGF	Lucentis™(라니비주맙) VH: 미국 특허 번호 9,914,770의 서열 번호:4 VL: 미국 특허 번호 9,914,770의 서열 번호:2

[0202] 일부 측면에서, 표적화 부분은 표적 분자에 결합하기 위해 표 F에서 제시되는 항체와 경쟁한다. 추가 측면에서, 표적화 부분은 표 F에서 제시되는 항체의 CDR 서열을 갖는 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 부분은 표 F에서 제시되는 항체의 모든 6개 CDR 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 표적화 부분은 적어도 중쇄 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) 및 범용 경쇄의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 추가 측면에서, 표적화 부분은 표 F에서 제시되는 항체의 VH의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 부분은 표 F에서 제시되는 항체의 VL의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 표적화 부분은 범용 경쇄 VL 서열을 추가로 포함한다.

[0203] 일부 실시형태에서, 표적화 부분은 리간드-수용체 결합을 비차단하거나 저조하게 차단한다. 비차단하거나 저조하게 차단하는 항-PD1 항체의 예는 PCT 공개 번호 WO2015/112800A1 의 서열 번호: 2/10, 미국 특허 번호 11,034,765 B2의 서열 번호: 16/17; 미국 특허 번호 10,294,299 B2의 서열 번호: 164/178, 165/179, 166/180, 167/181, 168/182, 169/183, 170/184, 171/185, 172/186, 173/187, 174/188, 175/189, 176/190 및 177/190의 VH/VL 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함한다. 비차단하거나 저조하게 차단하는 항-LAG3 항체의 예는 미국 공개 미국2022/0056126A1의 서열 번호 23/24, 3/4 및 11/12의 VH/VL 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함한다.

[0204] IL2 전구단백질에 의해 표적화될 수 있는 추가 표적 분자는 아래 표 I과 *예를 들어*, 문헌[Hafeez *등*, 2020, Molecules 25:4764, doi:10.3390/molecules25204764], 특히 표 1에 개시되어 있다. 문헌[Hafeez *등*]의 표 1은 전문이 본원에 인용방식에 의해 원용된다.

[0205] **8. 표적화 부분 형식**

[0206] 특정 측면에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 표적화 부분은 항원 결정자에 대한 특이적 결합을 유지하는 임의 유형의 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 일 실시형태에서, 표적화 부분은 면역글로불린 분자 또는 이의 단편, 특히 IgG 클래스 면역글로불린 분자, 보다 구체적으로는 IgG_1 또는 IgG_4 면역글로불린 분자이다. 항체 단편은 VH(또는 V_H) 단편, VL(또는 V_L) 단편, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, scFv 단편, Fv 단편, 미니바디, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0207] **8.1. Fab**

[0208] Fab 도메인은 파파인과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린 분자의 단백분해 절단에 의해 전통적으로 제조되었다. Fab 도메인은 임의의 적합한 종으로부터의 불변 도메인 및 가변 영역 서열을 포함할 수 있고, 이와 같이 쥐과, 키메라, 인간 또는 인간화된일 수 있다.

[0209] Fab 도메인은 통상적으로 VL 도메인에 부착된 CL 도메인과 쌍을 짓는 VH 도메인에 부착된 CH1 도메인을 포함한다. 야생형 면역글로불린에서, VH 도메인이 VL 도메인과 쌍을 이루어 Fv 영역을 구성하고, CH1 도메인과 CL 도메인이 쌍을 이루어 결합 부위를 추가로 안정화한다. 2개의 불변 도메인 사이의 다이설파이드 결합은 Fab 도메인을 더 안정화시킬 수 있다.

[0210] 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 경우, 특히 포적화 부분의 경쇄가 공통 또는 범용 경쇄가 아닌 경우, 동일한 표적화 부분에 속하는 Fab 도메인의 올바른 결합을 허용하고 다른 표적화 부분에 속하는 Fab 도메인의 비정상적인 쌍을 최소화하기 위해 Fab 이종이량체화 전략을 사용하는 것이 유리하다. 예를 들어, 아래 표 G에서 나타낸 Fab 이종이합체화 전략을 사용할 수 있다:

표 7

[0211]

표 G Fab 이종이합체화 전략					
전략	VH	CH1	VL	CL	참조
CrossMabCH1-CL	WT	CL 도메인	WT	CH1 도메인	Schaefer 등, 2011, Cancer Cell 2011; 20:472-86; PMID:22014573.
직교 Fab VHVRD1CH1CRD2 - VLVRD1C λCRD2	39K, 62E	H172A, F174G	1R, 38D, (36F)	L135Y, S176W	Lewis 등, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
직교 Fab VHVRD2CH1wt - VLVRD2Cλwt	39Y	WT	38R	WT	Lewis 등, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
TCR CαCβ	39K	TCR Cα	38D	TCR Cβ	Wu 등, 2015, MAbs 7:364-76
CR3	WT	T192E	WT	N137K, S114A	Golay 등, 2016, J Immunol 196:3199-211.
MUT4	WT	L143Q, S188V	WT	V133T, S176V	Golay 등, 2016, J Immunol 196:3199-211.
DuetMab	WT	F126C	WT	S121C	Mazor 등, 2015, MAbs 7:377-89; Mazor 등, 2015, MAbs 7:461-669.
교환된 도메인	WT	CH3 + 놉 또는 홀 돌연변이	WT	CH3 + 홀 또는 놉 돌연변이	Wozniak-Knopp 등, 2018, PLoSONE13(4):e0195442

[0212] 따라서, 특정 실시형태에서, Fab의 2개의 폴리펩티드 사이의 정확한 회합은 *예를 들어*, WO 2009/080251에 기재된 바와 같이 Fab의 VL 및 VH 도메인을 서로 교환하거나 CH1 및 CL 도메인을 서로 교환함으로써 촉진된다.

[0213] 정확한 Fab 쌍형성은 또한 Fab의 CH1 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형 및 CL 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하고/하거나 VH 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형 및 VL 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입함으로써 촉진될 수 있다. 변형된 아미노산은 전형적으로 VH:VL 및 CH1:CL 계면의 일부이므로 Fab 구성요소가 다른 Fab의 구성요소보다 서로 우선적으로 쌍을 형성하게 한다.

[0214] 일 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 잔기의 Kabat 번호매김에 의해 표시된 바와 같이 가변(VH, VL) 및 불변(CH1, CL) 도메인의 보존된 프레임워크 잔기로 제한된다. Almagro, 2008, Frontiers In Bioscience 13:1619-1633은 Kabat, Chothia, 및 IMGT 번호매김 체계에 기초하여 프레임워크 잔기의 정의를 제공한다.

[0215] 일 실시형태에서, VH 및 CH1 및/또는 VL 및 CL 도메인에 도입된 변형은 서로 상보적이다. 중쇄 및 경쇄 계면에서의 상보성은 입체 접촉 및 소수성 접촉, 정전 상호작용/전하 상호작용 또는 다양한 상호작용의 조합에 기초하여 달성될 수 있다. 단백질 표면 사이의 상보성은 자물쇠와 열쇠 적합성, 놉 인투 홀, 돌출부와 공동, 공여자와 수용자 등의 측면에서 문헌에 광범위하게 설명되어 있으며, 모두 2개의 상호작용 표면 사이의 구조적 및 화학적 일치의 속성을 의미한다.

[0216] 일 실시형태에서, 하나 이상의 도입된 변형은 Fab 구성요소의 계면에 걸쳐 새로운 수소 결합을 도입한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 도입된 변형은 Fab 구성요소의 계면에 걸쳐 새로운 염 가교를 도입한다. 예시적인 치환은 WO 2014/150973 및 WO 2014/082179에 기재되어 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0217] 일부 실시형태에서, Fab 도메인은 CH1 도메인에서의 192E 치환 및 CL 도메인에서의 114A 및 137K 치환을 포함하고, 이는 CH1 도메인과 CL 도메인 사이에 염 브릿지를 도입한다(*예*: Golay 등, 2016, J Immunol 196:3199-211 참조).

[0218] 일부 실시형태에서, Fab 도메인은 CH1 도메인에서의 143Q 및 188V 및 CL 도메인에서의 113T 및 176V 치환을 포함하고, 이는 CH1 도메인과 CL 도메인 사이에 접촉의 소수성 영역 및 극성 영향을 교환하도록 작용한다(*예*: Golay 등, 2016, J Immunol 196:3199-211 참조).

[0219] 일부 실시형태에서, Fab 도메인은 Fab 도메인의 정확한 어셈블리를 촉진하는 직각 Fab 계면을 도입하도록 VH 도

메인, CH1 도메인, VL 도메인, CL 도메인의 일부 또는 전부의 변형을 포함할 수 있다(Lewis 등, 2014 Nature Biotechnology 32:191-198). 하나의 실시형태에서, 39K, 62E 변형은 VH 도메인에서 도입되고, H172A, F174G 변형은 CH1 도메인에서 도입되고, 1 R, 38D, (36F) 변형은 VL 도메인에서 도입되고, L135Y, S176W 변형은 CL 도메인에서 도입된다. 또 다른 실시형태에서, 39Y 변형은 VH 도메인에서 도입되고, 38R 변형은 VL 도메인에서 도입된다.

[0220] Fab 도메인은 또한 조작된 디설파이드 결합에 의해 천연 CH1:CL 디설파이드 결합을 대체하도록 변형될 수 있어서, Fab 성분 쌍 짓기의 효율을 증가시킨다. 예를 들어, 조작된 디설파이드 결합은 CH1 도메인에서의 126C 및 CL 도메인에서의 121 C를 도입하여서 도입될 수 있다(*예*: Mazor 등, 2015, MAb 7:377-89 참조).

[0221] Fab 도메인은 또한 CH1 도메인 및 CL 도메인을 정확한 조립을 촉진하는 대안적인 도메인으로 대체함으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, Wu 등, 2015, MAbs 7:364-76은 CH1 도메인을 T 세포 수용체의 불변 도메인에 의해 치환하는 것 및 CL 도메인을 T 세포 수용체의 b 도메인에 의해 치환하는 것 및 VL 도메인에서의 38D 변형 및 VH 도메인에서의 39K 변형을 도입하여서 VL 도메인과 VH 도메인 사이의 추가적인 전하-전하 상호작용에 의해 이들 도메인 대체를 쌍 짓기하는 것을 기재한다.

[0222] 정확한 VH-VL 쌍 짓기를 촉진하기 위한 Fab 이종이합체화 전략의 사용을 위해 또는 이에 더하여, 공통 경쇄(범용 경쇄로도 지칭됨)의 VL은 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 각각의 고유한 ABD에 사용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본원에서 설명되는 바와 같은 공통 경쇄를 이용하는 것은 원래 동족 VL을 이용하는 것과 비교하여 IL2 전구단백질의 부적절한 종의 수를 감소시킨다. 다양한 실시형태에서, ABD의 VL 도메인은 공통 경쇄를 포함하는 단일특이적 항체로부터 확인된다. 다양한 실시형태에서, IL2 전구단백질의 ABD의 VH 영역은 제한된 인간 경쇄 레퍼토리 또는 인간 중쇄와 동족인 단일 인간 경쇄를 발현하도록 이전에 조작된 마우스 B 세포 내의 *생체 내*에서 재배열된 인간 중쇄 가변 유전자 분절을 포함하고, 관심 항원과의 노출에 반응하여, 하나 또는 2개의 가능한 인간 VL 중 하나와 동족인 복수의 인간 VH를 함유하는 항체 레퍼토리를 생성하며, 여기서 항체 레퍼토리는 관심 항원에 특이적이다. 공통 경쇄는 재배열된 인간 Vκ1-39Jκ5 서열 또는 재배열된 인간 Vκ3-20Jκ1 서열로부터 유래된 것이고, 체세포 돌연변이된(*예*: 친화도 성숙된) 버전을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제10,412,940호를 참조한다.

[0223] **8.2. scFv**

[0224] 단일 사슬 Fv 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬에서 항체의 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하고, 단일 사슬 폴리펩티드로서 발현될 수 있고, 이것이 유래된 온전한 항체의 특이성을 보유한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 표적 결합을 위한 원하는 구조를 형성하게 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 VH 사슬 및 VL 사슬을 연결하기에 적합한 링커의 예는 섹션 v에서 확인된 비절단성 링커이다.

[0225] 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이 scFv는 VL 및 VH 가변 영역을 어느 순서로든 가질 수 있으며, *예를 들어*, 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단 단부와 관련하여, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0226] scFv는 임의의 적합한 종, 예컨대 쥐과, 인간 또는 인간화된 VH 서열 및 VL 서열로부터의 VH 서열 및 VL 서열을 포함할 수 있다.

[0227] scFv 인코딩 핵산을 생성하기 위해, VH 및 VL 인코딩 DNA 단편은 링커, *예를 들어*, 섹션 6.6에 설명된 임의의 링커를 인코딩하는 또 다른 단편(VH 서열 및 VL 서열이 인접한 단일 사슬 단백질로서 발현될 수 있도록(VL 영역 및 VH 영역은 가요성 링커에 의해 연결됨), 통상적으로 아미노산 서열 (Gly4~Ser)3(서열 번호: 170)과 같은 아미노산 글리신 및 세린을 함유하는 서열의 반복부)에 작동 가능하게 연결된다(*예를 들어*, Bird 등, 1988, Science 242:423-426; Huston 등, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 85:5879-5883; McCafferty 등, 1990, Nature 348:552-554 참조).

[0228] **9. Fc 영역**

[0229] 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 전형적으로 회합하여 Fc 영역을 형성하는 한 쌍의 Fc 도메인을 포함한다. 천연 항체에서, Fc 영역은 N-말단에 힌지 영역을 포함하여 불변 도메인을 형성한다. 본 개시내용 전반에 걸쳐, Fc 도메인에 대한 언급은 달리 명시되지 않는 한 N-말단에 힌지 도메인이 있는 Fc 도메인을 포괄한다.

[0230] Fc 도메인은 ABD 또는 이의 성분에 작동 가능하게 연결된 임의의 적합한 종으로부터 유래될 수 있다. 일 실시형

태에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인 유래이다. 바람직한 실시형태에서, 표적화 부분 또는 이의 성분은 IgG Fc 분자에 융합된다. 표적화 부분 또는 성분은 IgG Fc 도메인의 N-말단이나 C-말단 또는 둘 모두에 융합될 수 있다.

[0231] Fc 도메인은 IgA(하위클래스 lgA1 및 lgA2 포함), IgD, IgE, IgG(하위클래스 lgG1, lgG2, lgG3 및 lgG4 포함) 및 IgM을 포함하는 임의의 적합한 항체 클래스로부터 유래될 수 있다. 일 실시형태에서, Fc 도메인은 lgG1, lgG2, lgG3 또는 lgG4 유래이다. 일 실시형태에서, Fc 도메인은 lgG1으로부터 유래된다. 일 실시형태에서, Fc 도메인은 lgG4으로부터 유래된다. IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 도메인의 예시적인 서열은 아래 표 Y에 제공된다.

표 8

[0232]

표 Y
Fc 서열

Fc	서열	서열 번호
hIgG1 Fc (UniprotKB P01857-1의 아미노산 99-330)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	1
hIgG2 Fc (UniprotKB P01859-1의 아미노산 99-326)	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	2
hIgG3 Fc(UniprotKB P01860-1의 아미노산 99-377)	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	3
hIgG4 Fc(UniprotKB P01861-1의 아미노산 99-327)	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	4

[0233] 일부 측면에서, Fc 도메인은 서열 번호:1에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. Fc 도메인이 서열 번호:1에 대해 적어도 90% 서열 동일성 및 100% 미만의 서열 동일성을 포함하는 경우(예: 서열 번호:1에 대해 90% 내지 99% 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본원에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.1에 기술된 바와 같음) 및/또는 Fc 이종이량체화를 촉진하는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.2에 설명된 대로)을 포함한다.

[0234] 일부 측면에서, Fc 도메인은 서열 번호:2에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. Fc 도메인이 서열 번호:2에 대해 적어도 90% 서열 동일성 및 100% 미만의 서열 동일성을 포함하는 경우(예: 서열 번호:2에 대해 90% 내지 99% 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본원에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.1에 기술된 바와 같음) 및/또는 Fc 이종이량체화를 촉진하는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.2에 설명된 대로)을 포함한다.

[0235] 일부 측면에서, Fc 도메인은 서열 번호:3에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. Fc 도메인이 서열 번호:3에 대해 적어도 90% 서열 동일성 및 100% 미만의 서열 동일성을 포함하는 경우(예: 서열 번호:3에 대해 90% 내지 99% 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본원에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.1에 기술된 바와 같음) 및/또는 Fc 이종이량체화를 촉진하는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.2에 설명된 대

로)을 포함한다.

[0236] 일부 측면에서, Fc 도메인은 서열 번호:4에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. Fc 도메인이 서열 번호:4에 대해 적어도 90% 서열 동일성 및 100% 미만의 서열 동일성을 포함하는 경우(예: 서열 번호:4에 대해 90% 내지 99% 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본원에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.1에 기술된 바와 같음) 및/또는 Fc 이종이량체화를 촉진하는 하나 이상의 치환(예: 섹션 6.9.2에 설명된 대로)을 포함한다.

[0237] Fc 영역 내의 2개의 Fc 도메인은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 천연 항체에서, Fc 도메인은 일반적으로 동일하지만, 다중특이적 결합 분자, *예를 들어*, 본 개시내용의 IL2 전구단백질 및 이를 활성화하여 생성되는 MBM를 생성하는 목적의 경우, Fc 도메인은 이종 이합체화를 허용하기 위해 상이할 수 있는 것이 유리할 수 있으며, 이는 아래 섹션 6.9.2에서 설명되어 있다.

[0238] 천연 항체에서, IgA, IgD 및 IgG의 중쇄 Fc 도메인은 2개의 중쇄 불변 도메인(CH2 및 CH3) 및 IgE 및 IgM의 중쇄 Fc 도메인은 3개의 중쇄 불변 도메인(CH2, CH3 및 CH4)으로 이루어진다. 이것은 이합체화하여 Fc 영역을 생성한다.

[0239] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에서, Fc 영역 및/또는 이의 내부의 Fc 도메인은 1개 이상의 상이한 항체 클래스, 예를 들어, 1개, 2개 또는 3개의 상이한 클래스로부터의 중쇄 불변 도메인을 포함할 수 있다.

[0240] 일 실시형태에서, Fc 영역은 IgG1로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0241] 일 실시형태에서 Fc 영역은 IgG2로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0242] 일 실시형태에서 Fc 영역은 IgG3으로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0243] 일 실시형태에서, Fc 영역은 IgG4로부터 유도된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0244] 일 실시형태에서, Fc 영역은 IgM으로부터의 CH4 도메인을 포함한다. IgM CH4 도메인은 통상적으로 CH3 도메인의 C 말단에 위치한다.

[0245] 일 실시형태에서, Fc 영역은 IgG로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인 및 IgM으로부터 유래된 CH4 도메인을 포함한다.

[0246] 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 대한 Fc 영역을 생성하는 데 사용하기 위한 중쇄 불변 도메인이 위에서 설명되는 자연 발생 불변 도메인의 변이체를 포함할 수 있다고 이해될 것이다. 이러한 변이체는 야생형 불변 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 하나의 예에서 본 개시내용의 Fc 영역은 야생형 불변 도메인에서 서열이 변하는 적어도 하나의 불변 도메인을 포함한다. 변이체 불변 도메인이 야생형 불변 도메인보다 더 길거나 더 짧을 수 있다고 이해될 것이다. 바람직하게는 변이체 불변 도메인은 야생형 불변 도메인과 적어도 60% 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서 변이체 불변 도메인은 적어도 70% 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서 변이체 불변 도메인은 적어도 80% 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서 변이체 불변 도메인은 적어도 90% 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서 변이체 불변 도메인은 적어도 95% 동일하거나 유사하다.

[0247] IgM 및 IgA는 공통 H2L2 항체 단위의 공유 다합체로서 인간에서 발생한다. IgM은 이것이 J-사슬을 혼입할 때 오합체로서 발생하거나 이것이 J-사슬이 부족할 때 육합체로서 발생한다. IgA는 단량체 및 이합체 형태로 발생한다. IgM 및 IgA의 중쇄는 테일피스로 알려진 C 말단 불변 도메인으로의 18개 아미노산 연장을 보유한다. 테일피스는 중합체에서의 중쇄 사이의 디설파이드 결합을 형성하는 시스테인 잔기를 포함하고, 중합에서 중요한 역할을 갖는 것으로 여겨진다. 테일피스는 또한 글리코실화 부위를 함유한다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 테일피스를 포함하지 않는다.

[0248] 본 개시내용의 IL2 전구단백질으로 혼입되는 Fc 도메인은 단백질의 기능적 특징, 예를 들어, FcRn 또는 백혈구 수용체와 같은 Fc-수용체에 대한 결합, 보체에 대한 결합, 변형된 이황화 결합 구성 또는 변경된 글리코실화 패턴을 변경하는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 효과기 기능을 변경하는 예시적인 Fc 변형은 섹션 6.9.1에서 설명되어 있다.

[0249] Fc 도메인은 또한 예를 들어 동일한 Fc 도메인에 비해 비동일한 Fc 도메인의 우선적인 쌍 짓기인 이종이합체화를 허용하여서 비대칭 IL2 전구단백질의 제조성을 개선하는 변형을 포함하도록 변경될 수 있다. 이종이합체화는

서열이 상이한 Fc 도메인을 함유하는 Fc 영역에 의해 상이한 폴리펩티드 성분이 서로에 연결된 IL2 전구단백질의 제조를 허용한다. 이종이합체화 전략의 예는 섹션 6.9.2에서 예시되어 있다.

[0250] 위에서 언급된 임의의 변형은 원하는 기능적 특성을 달성하기 위해 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있고/있거나 IL2 전구단백질의 특성을 변경하기 위해 다른 변형과 조합될 수 있음이 이해될 것이다.

[0251] **9.1. 변경된 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인**

[0252] 일부 실시형태에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0253] 특정 실시형태에서 Fc 수용체는 Fcɣ 수용체이다. 일 실시형태에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 일 실시형태에서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 구체적 실시형태에서 Fc 수용체는 활성화 인간 Fcɣ 수용체, 보다 구체적으로 인간 FcɣRIIIa, FcɣRI 또는 FcɣRIIa, 가장 구체적으로 인간 FcɣRIIIa이다. 일 실시형태에서, 효과기 기능은 보체 의존적 세포독성(CDC), 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포 식세포작용(ADCP), 및 사이토카인 분비의 군으로부터 선택된 하나 이상이다. 특정한 실시형태에서, 효과기 기능은 ADCC이다.

[0254] 일 실시형태에서, Fc 도메인(*예를 들어*, IL2 전구단백질 절반 항체의 Fc 도메인) 또는 Fc 영역(*예를 들어*, Fc 영역을 형성하기 위해 회합할 수 있는 IL2 전구단백질의 하나의 또는 둘 모두의 Fc 도메인)은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329(Kabat EU 인덱스에 따른 번호부여)의 군으로부터 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 더 특정 실시형태에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 L234, L235 및 P329(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 아미노산 치환 L234A 및 L235A(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다. 하나의 이러한 실시형태에서, Fc 도메인 또는 영역은 Igd Fc 도메인 또는 영역, 특히 인간 Igd Fc 도메인 또는 영역이다. 일 실시형태에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 P329번 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 더 특정 실시형태에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다. 일 실시형태에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 P329번 위치에서의 아미노산 치환 및 E233, L234, L235, N297 및 P331(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)로부터 선택된 위치에서의 추가의 아미노산 치환을 포함한다. 더 특정 실시형태에서, 추가의 아미노산 치환은 E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 특정한 실시형태에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 P329, L234 및 L235번 위치에서의 아미노산 치환(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)을 포함한다. 더 특정한 실시형태에서, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G("P329G LALA", "PGLALA" 또는 "LALAPG")를 포함한다.

[0255] 통상적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 치환은 Fc 영역의 2개의 Fc 도메인의 각각에 존재한다. 이와 같이, 특정한 실시형태에서, Fc 영역의 각각의 Fc 도메인은 L234A, L235A 및 P329G의 아미노산 치환을 포함하고(Kabat EU 인덱스 넘버링), 즉 Fc 영역에서의 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인의 각각에서 234번 위치에서의 류신 잔기는 알라닌 잔기에 의해 대체되고(L234A), 235번 위치에서의 류신 잔기는 알라닌 잔기에 의해 대체되고(L235A), 329번 위치에서의 프롤린 잔기는 글리신 잔기에 의해 대체된다(P329G)(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0256] 일 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인, 특히, 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 실시형태에서, IgG1 Fc 도메인은 효과기 기능을 감소시키기 위해 D265A, N297A 돌연변이(EU 번호부여)를 포함하는 변이체 IgG1이다.

[0257] 또 다른 실시형태에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합이 감소된 IgG4 Fc 도메인이다. Fc 수용체와의 결합이 감소된 예시적 IgG4 Fc 도메인은 아래 표 H에서 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다: 일부 실시형태에서, Fc 도메인은 아래에 나타낸 서열의 굵은 글씨 부분만을 포함한다.

표 9

[0258]

표 H	
Fc 도메인	서열

WO2014/121087의 서열 번호:1	Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys (SEQ ID NO: 358)
WO2014/121087의 서열 번호:2	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO: 359)
WO2014/121087의 서열 번호:30	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys** (SEQ ID NO: 360)

WO2014/121087의 서열 번호:31	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys** (SEQ ID NO: 361)
WO2014/121087의 서열 번호:37	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys** (SEQ ID NO: 362)
WO2014/121087의 서열 번호:38	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys** (SEQ ID NO: 363)

[0259] 특정한 실시형태에서, 효과기 기능이 감소된 IgG4는 때때로 IgG4 또는 hIgG4로서 본원에 칭해지는 WO2014/121087호의 서열 번호:31의 아미노산 서열의 볼드체 부분을 포함한다.

[0260] 이종이량체성 Fc 영역에 대해, 상기에 기술된 변이체 IgG4 Fc 서열의 조합, 예를 들어, WO2014/121087호의 서열 번호:30의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분) 및 WO2014/121087호의 서열 번호:37의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분)을 포함하는 Fc 영역 또는 WO2014/121087호의 서열 번호:31의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분) 및 WO2014/121087호의 서열 번호:38의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분)을 포함하는 Fc 영역을 혼입하는 것이 가능하다.

[0261] **9.2. Fc 이종이합체화 변이체**

[0262] 특정 IL2 전구단백질은 천연 면역글로불린과 달리 2개의 Fc 도메인 사이에 이량체화를 수반하며, 이는 동일하지 않은 N-말단 또는 C-말단 영역에 작동적으로 연결된다. Fc 영역을 형성하기 위한 2개의 Fc 도메인의 부적절한 이종이량체화는 원하는 이종이량체성 분자의 수율을 증가시키기 위한 장애물일 수 있고 정제에 대한 도전을 나타낸다. 본 개시내용의 IL2 전구단백질에 존재할 수 있는 Fc 도메인의 이합체화를 향상시키기 위해 당해 기술분야에서 이용 가능한 다양한 접근 방식을 사용할 수 있으며, 이는 예를 들어, EP 1870459A1; 미국 특허 번호 5,582,996; 미국 특허 번호 5,731,168; 미국 특허 번호 5,910,573; 미국 특허 번호 5,932,448; 미국 특허 번호 6,833,441; 미국 특허 번호 7,183,076; 미국 특허 출원 공개 번호 2006204493A1; 및 PCT 공개 번호 WO 2009/089004A1에 개시된 바와 같다.

[0263] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 Fc 이종이합체, 즉, 이종성의 비동일한 Fc 도메인을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 IL2 전구단백질을 제공한다. 통상적으로, Fc 이종이합체에서의 각각의 Fc 도메인은 항체의 CH3 도메인을 포함한다. CH3 도메인은 임의의 동종형, 종류 또는 하위종류 및 바람직하게는 이전의 섹션에 기재된 것과 같은 IgG(lgG1, lgG2, lgG3 및 lgG4) 종류의 항체의 불변 영역으로부터 유래된다.

[0264] CH3 도메인에서의 2개의 상이한 중쇄의 이종이합체화는 원하는 IL2 전구단백질을 생성시키지만, 동일한 중쇄의 동종이합체화는 원하는 IL2 전구단백질의 수율을 감소시킬 것이다. 이와 같이, 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질을 형성하기 위해 회합하는 폴리펩티드는 비변형된 Fc 도메인에 비해 이종이량체성 회합을 선호하는 변형에 의해 CH3 도메인을 함유할 것이다.

[0265] 특정 실시형태에서 Fc 이종이합체의 형성을 촉진하는 상기 변형은 Fc 도메인의 하나에서의 "손잡이" 변형 및 다른 Fc 도메인에서의 "구멍" 변형을 포함하는 소위 "구멍으로의 손잡이" 또는 "구멍에 손잡이" 변형이다. 놉-인투-홀 기술은 *예를 들어*, 미국 특허 번호 5,731,168; 미국 제7,695,936호; Ridgway 등, 1996, Prot Eng 9:617-621, 및 Carter, 2001, Immunol Meth 248:7-15에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 이종이합체 형성을 촉진하고 동종이합체 형성을 방해하기 위해서 공동에 돌기가 위치할 수 있도록 제1 폴리펩티드의 계면에서 돌기("손잡이")를 도입하고 제2 폴리펩티드의 계면에서 상응하는 공동("구멍")을 도입하는 것을 수반한다. 돌출부는 제1 폴리펩티드의 계면에서 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄(*예*: 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 구축된다. 돌출부와 동일하거나 유사한 크기의 보상 공동은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄(*예*: 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 제2 폴리펩티드의 계면에서 생성된다.

[0266] 따라서, 일부 실시형태에서, Fc 도메인의 제1 아단위의 CH3 도메인에서의 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기에 의해 대체되어서, 제2 아단위의 CH3 도메인 내의 공동에 위치 가능한 제1 아단위의 CH3 도메인 내의 돌기를 생성하고, Fc 도메인의 제2 아단위의 CH3 도메인에서의 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기에 의해 대체되어서, 제1 아단위의 CH3 도메인 내의 돌기가 위치 가능한 제2 아단위의 CH3 도메인 내의 공동을 생성한다. 바람직하게는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 및 트립토판(W)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 및 발린(V)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 돌출부 및 공동은 *예를 들어*, 부위 특이적 돌연변이 생성, 또는 펩티드 합성에 의해 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 변경함으로써 만들어질 수 있다. 예시적인 치환은 Y470T이다.

[0267] 이러한 특정 실시형태에서, 제1 Fc 도메인에서 366번 위치에서의 트레오닌 잔기는 트립토판 잔기에 의해 대체되고(T366W), Fc 도메인에서 407번 위치에서의 티로신 잔기는 발린 잔기에 의해 대체되고(Y407V), 선택적으로 366번 위치에서의 트레오닌 잔기는 세린 잔기에 의해 대체되고(T366S), 368번 위치에서의 류신 잔기는 알라닌 잔기에 의해 대체된다(L368A)(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링). 추가의 실시형태에서, 제1 Fc 도메인에서 추가적으로 354번 위치에서의 세린 잔기는 시스테인 잔기에 의해 대체되거나(S354C), 356번 위치에서의 글루탐산 잔기는 시스테인 잔기에 의해 대체되고(E356C)(특히 354번 위치에서의 세린 잔기는 시스테인 잔기에 의해 대체됨), 제2 Fc 도메인에서 추가적으로 349번 위치에서의 티로신 잔기는 시스테인 잔기에 의해 대체된다(Y349C)(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링). 특정한 실시형태에서, 제1 Fc 도메인은 S354C 및 T366W의 아미노산 치환을 포함하고, 제2

Fc 도메인은 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V의 아미노산 치환을 포함한다(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0268] 일부 실시형태에서, (*예를 들어*, Gunasekaran 등, 2010, J Biol Chem 285(25): 19637-46에서 설명되는 바와 같은) 정전기 스티어링은 Fc 영역의 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인의 회합을 촉진하도록 사용될 수 있다.

[0269] 이종이합체화를 촉진하도록 변형된 Fc 도메인의 사용에 대한 대안으로서 또는 이것 이외에, Fc 도메인은 Fc 이종이합체의 선택이 가능하게 하는 정제 전략을 허용하도록 변형될 수 있다. 하나의 이러한 실시형태에서, 하나의 폴리펩티드는 단백질 A에 대한 이의 결합을 무효화하는 변형된 Fc 도메인을 포함하여서, 이종이량체성 단백질을 생성시키는 정제 방법이 가능하게 한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,586,713을 참조한다. 이와 같이, IL2 전구단백질은 제1 CH3 도메인 및 제2 Ig CH3 도메인을 포함하고, 제1 Ig CH3 도메인 및 제2 Ig CH3 도메인은 서로 적어도 하나의 아미노산만큼 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 결여된 상응하는 IL2 전구단백질과 비교하여 단백질 A에 대한 IL2 전구단백질의 결합을 감소시킨다. 일 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 단백질 A에 결합하고, 제2 CH3 도메인은 단백질 A 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이/변형, 예컨대 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의해; EU 넘버링에 의해서는 H435R)을 함유한다. 제2 CH3은 Y96F 변형(IMGT에 의해; EU에 의해서는 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. 이 변형 종류는 본원에서 "별" 돌연변이로 지칭된다.

[0270] 일부 실시형태에서, Fc는 이종이합체화를 수월하게 하는 하나 이상의 돌연변이(*예*: 손잡이 및 구멍 돌연변이)뿐만 아니라 정제를 수월하게 하는 별 돌연변이를 함유할 수 있다.

[0271] **9.3. 힌지 도메인**

[0272] 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 N-말단에 힌지 도메인을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 천연 힌지 영역 또는 변형된 힌지 영역일 수 있다. 힌지 영역은 통상적으로 Fc 영역의 N 말단에서 발견된다. 용어 "힌지 도메인"은, 문맥상 달리 기술하지 않는 한, 단일 폴리펩티드 사슬 또는 단량체성 폴리펩티드 사슬의 맥락에서 단량체성 힌지 도메인이고, 이합체성 폴리펩티드(*예를 들어*, 2개의 Fc 도메인의 회합에 의해 형성된 동종이량체 또는 이종이량체성 IL2 전구단백질)의 맥락에서 별개의 폴리펩티드 사슬에서 2개의 회합된 힌지 서열을 포함할 수 있는 자연 발생 또는 자연 비발생 힌지 서열을 지칭한다. 때로는 2개의 회합된 힌지 서열을 "힌지 영역"이라고 한다.

[0273] 천연 힌지 영역은 천연 발생 항체에서 Fab 도메인과 Fc 도메인 사이에서 보통 발견되는 힌지 영역이다. 변형된 힌지 영역은 천연 힌지 영역과 길이 및/또는 조성이 다른 임의의 힌지이다. 이러한 힌지는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 상어, 돼지, 햄스터, 낙타, 라마 또는 염소 힌지 영역과 같은 다른 종으로부터의 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 변형된 힌지 영역은 중쇄 Fc 도메인 또는 Fc 영역의 종류 또는 하위종류와 상이한 종류 또는 하위종류의 항체로부터 유래된 완전한 힌지 영역을 포함할 수 있다. 대안적으로, 변형된 힌지 영역은 반복부에서의 각각의 단위가 자연 힌지 영역으로부터 유래된 자연 힌지 또는 반복 단위의 일부를 포함할 수 있다. 추가의 대안에서, 자연 힌지 영역은 하나 이상의 시스테인 또는 다른 잔기를 세린 또는 알라닌과 같은 자연 잔기로 전환하여서 또는 적합하게 위치한 잔기를 시스테인 잔기로 전환하여서 변경될 수 있다. 이러한 수단에 의해 힌지 영역에서의 시스테인 잔기의 수는 증가하거나 감소할 수 있다. 다른 변형된 힌지 영역은 전체적으로 합성일수 있고, 길이, 시스테인 조성 및 가요성과 같은 원하는 특성을 보유하도록 설계될 수 있다.

[0274] 다수의 변형된 힌지 영역은 예를 들어 미국 특허 번호 5,677,425, WO 99/15549, WO 2005/003170, WO 2005/003169, WO 2005/003170, WO 98/25971 및 WO 2005/003171에 이미 설명되어 있고 이들은 인용방시게 의해 본원에 원용된다.

[0275] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 하나 또는 둘 모두의 Fc 도메인이 이의 N 말단에서 온전한 힌지 도메인을 보유하는 Fc 영역을 포함한다.

[0276] 다양한 실시형태에서, 힌지 영역 내의 위치 233-236은 G, G, G 및 비점유; G, G, 비점유 및 비점유; G, 비점유, 비점유 및 비점유; 또는 EU 번호부여에 의해 번호부여된 위치를 갖는 모든 비점유일 수 있다.

[0277] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 동일한 동종형(*예를 들어*, 인간 IgG1 또는 인간 IgG4)의 야생형 힌지 영역에 비해 Fcɣ 수용체에 대한 결합 친화도를 감소시키는 변형된 힌지 영역을 포함한다.

[0278] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 각각의 Fc 도메인이 이의 N 말단에서 온전한 힌지 도메인을 보유하는 Fc 영역을 포함하고, 각각의 Fc 도메인 및 힌지 도메인은 IgG4로부터 유래되고, 각각의 힌지 도메인은 변형된 서열 CPPC를 포함한다. 인간 IgG4의 코어 힌지 영역은 서열 CPPC를 함유하는 IgG1과 비교하여 서열 CPSC

를 함유한다. IgG4 서열에 존재하는 세린 잔기는 이 영역에서 증가된 가요성으로 이어지고, 따라서 분자의 비율은 사슬간 디설파이드를 형성하기 위해 IgG 분자에서 다른 중쇄를 가져오기보다는 동일한 단백질 사슬 내에 디파이드 결합(사슬간 디설파이드)을 형성한다. (Angel 등, 1993, Mol Immunol 30(1):105-108). IgG1과 동일한 코어 서열을 생성하기 위해 프롤린으로 세린 잔기를 변경 하는 것은 IgG4 힌지 영역에서의 사슬간 디설파이드의 완전한 형성을 허용하여서, 정제된 생성물에서의 이질성을 감소시킨다. 이 변경된 동종형은 IgG4P라 칭해진다.

[0279] **9.3.1. 키메라 힌지 서열**

[0280] 힌지 도메인은 키메라 힌지 도메인일 수 있다.

[0281] 예를 들어, 키메라 힌지는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역으로부터 유래된 "하부 힌지" 서열과 조합된 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역으로부터 유래된 "상부 힌지" 서열을 포함할 수 있다.

[0282] 특정한 실시형태에서, 키메라 힌지 영역은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA(서열 번호:364)(본원에 그 전체가 참고로 포함된WO2014/121087호의 서열 번호:8로서 이전에 개시됨) 또는 ESKYGPPCPPCPAPPVA(서열 번호:365)(WO2014/121087호의 서열 번호:9로서 이전에 개시됨)를 포함한다. 이러한 키메라 힌지 서열은 (예를 들어, 섹션 6.9.1에서 설명되는 것과 같이 효과기 기능을 감소시키기 위해 CH2 및/또는 CH3 도메인에서 추가로 변형될 수 있는 IgG4 Fc 도메인, 예를 들어, 인간 또는 쥐과 Fc 도메인으로 혼입하여서) IgG4 CH2 영역에 적합하게 연결될 수 있다.

[0283] **9.3.2. 효과기 기능이 감소된 힌지 서열**

[0284] 추가의 실시형태에서, 힌지 영역은 예를 들어 WO2016161010A2호에 기재된 것과 같이 효과기 기능을 감소시키도록 변형될 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 다양한 실시형태에서, 변형된 힌지 영역 내의 위치 233-236은 G, G, G 및 비점유; G, G, 비점유 및 비점유; G, 비점유, 비점유 및 비점유; 또는 EU 번호부여에 의해 번호부여된 위치를 갖는 모든 비점유일 수 있다(WO2016161010A2의 도 1에서 나타낸 바와 같음). 이 분절은 GGG-, GG--, G--- 또는 ----로 표시될 수 있는데, "-"는 비점유된 위치를 나타낸다.

[0285] 236번 위치는 정규 인간 IgG2에서 비점유되지만 다른 정규 인간 IgG 동종형에 의해 점유된다. 233번 내지 235번 위치는 (WO2016161010A2호의 도 1에 도시된 것과 같이) 모든 4개의 인간 동종형에서 G 이외의 잔기에 의해 점유된다.

[0286] 233번 내지 236번 위치 내의 힌지 변형은 P에 의해 점유된 228번 위치와 조합될 수 있다. 228번 위치는 인간 IgG1 및 IgG2에서 P에 의해 자연히 점유되지만, 인간 IgG4에서의 S 및 인간 IgG3에서의 R에 의해 점유된다. IgG4 항체에서의 S228P 돌연변이는 IgG4 항체를 안정화시키고 외인성 항체와 내인성 항체 사이의 중쇄 경쇄 쌍의 교환을 감소시키는 데 유리하다. 바람직하게는 위치 226-229는 각각 C, P, P 및 C에 의해 점유된다.

[0287] 예시적인 힌지 영역은, 변형된 힌지 서열 지정된 GGG-(233-236), GG--(233-236), G---(233-236) 및 무 G(233-236)에 의해 점유된, 중간(또는 코어) 힌지 및 하부 힌지로 때때로 지칭되는 226번 내지 236번 잔기를 갖는다. 선택적으로, 힌지 도메인 아미노산 서열은 CPPCPAPGGG-GPSVF(서열 번호:366)(WO2016161010A2호의 서열 번호:1로서 이전에 개시됨), CPPCPAPGG--GPSVF(서열 번호:367)(WO2016161010A2호의 서열 번호:2로서 이전에 개시됨), CPPCPAPG---GPSVF(서열 번호:368)(WO2016161010A2호의 서열 번호:3으로서 이전에 개시됨) 또는 CPPCPAP----GPSVF(서열 번호:369)(WO2016161010A2호의 서열 번호:4로서 이전에 개시됨)를 포함한다.

[0288] 상기에 기재된 변형된 힌지 영역은 통상적으로 CH2 및 CH3 도메인을 포함하고, 지정된 영역을 플랭킹하는 추가 힌지 분절(*예*: 상부 힌지)을 가질 수 있는 중쇄 불변 영역으로 혼입될 수 있다. 존재하는 이러한 추가 불변 영역 분절은 상이한 아이소타입의 하이브리드일 수 있지만 통상적으로 동일한 동종형, 바람직하게는 인간 아이소타입을 갖는다. 이러한 추가 인간 불변 영역 분절의 동종형은 바람직하게는 인간 IgG4이지만, 또한 도메인이 상이한 아이소타입을 갖는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG3 또는 이의 하이브리드일 수 있다. 인간 IgG1, IgG2 및 IgG4의 예시적인 서열은 WO2016161010A2호의 도 2 내지 도 4에 도시되어 있다.

[0289] 특정 실시형태에서, 변형된 힌지 서열은 (예를 들어, 섹션 6.9.1에 설명된 것과 같이 효과기 기능을 감소시키기 위해 CH2 및/또는 CH3 도메인에서 추가로 변형될 수 있는 IgG4 Fc 도메인, 예를 들어, 인간 또는 쥐과 Fc 도메인으로 혼입하여서) IgG4 CH2 영역에 연결될 수 있다.

[0290] **10. 핵산 및 숙주 세포**

[0291] 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 IL2 전구단백질를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 일부 실시형태에

서, IL2 전구단백질은 단일 핵산에 의해 암호화된다. 다른 실시형태에서, IL2 전구단백질은 복수(*예를 들어*, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상)의 핵산에 의해 암호화될 수 있다.

[0292] 단일 핵산은 단일 폴리펩티드 사슬을 포함하는 IL2 전구단백질, 2개 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 IL2 전구단백질 또는 2개 초과의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 IL2 전구단백질의 부분을 암호화할 수 있다(예를 들어, 단일 핵산은 3개, 4개 또는 그 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 IL2 전구단백질의 2개의 폴리펩티드 사슬 또는 4개 또는 그 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 IL2 전구단백질의 3개의 폴리펩티드 사슬을 암호화할 수 있다). 발현의 별도의 제어를 위해, 2개 이상의 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임은 별도의 전사 조절 요소(*예를 들어*, 프로모터 및/또는 인핸서)의 제어하에 있을 수 있다. 2개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임은 또한 동일한 전사 조절 요소에 의해 제어되고, 별개의 폴리펩타이드로의 번역을 허용하는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0293] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 폴리펩티드드 사슬을 포함하는 IL2 전구단백질은 2개 이상의 핵산에 의해 암호화된다. IL2 전구단백질을 인코딩하는 핵산의 수는 (예를 들어, 하나 초과의 폴리펩티드 사슬이 단일 핵산에 의해 인코딩될 때) IL2 전구단백질에서의 폴리펩티드 사슬의 수와 동일하거나 이보다 적을 수 있다.

[0294] 본 개시내용의 핵산은 DNA 또는 RNA(*예를 들어*, mRNA)일 수 있다.

[0295] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 핵산을 함유하는 숙주 세포 및 벡터를 제공한다. 핵산은 본원의 아래에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 동일한 숙주 세포 또는 별도의 숙주 세포에 존재하는 단일 벡터 또는 별도의 벡터에 존재할 수 있다.

[0296] **10.1. 벡터**

[0297] 본 개시내용은 본원에서 설명되는 IL2 전구단백질 또는 이의 성분, 예를 들어, IL2 전구단백질의 절반 항체의 폴리펩티드 사슬 중 1개 또는 2개를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, 람다 파지 또는 효모 인공 염색체(YAC)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0298] 수많은 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 벡터 종류는 예를 들어 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 바큘로바이러스, 레트로바이러스(라우스 육종 바이러스, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 이용한다. 또 다른 백터 종류는 셈리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus), 동부 말 뇌염 바이러스(Eastern Equine Encephalitis virus) 및 플라비바이러스(Flavivirus)와 같은 RNA 바이러스로부터 유래된 RNA 요소를 이용한다.

[0299] 추가적으로, 염색체로 DNA를 안정하게 통합시킨 세포는 형질주입된 숙주 세포의 선택을 허용하는 하나 이상의 마커를 도입하여서 선택될 수 있다. 마커는 예를 들어, 영양요구성 숙주에 대한 프로토트로피, 살생제 저항성(*예를 들어*, 항살생제) 또는 구리와 같은 중금속에 대한 저항성 등을 제공할 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 발현되는 DNA 서열에 직접적으로 연결되거나, 동시형질전환에 의해 동일한 세포로 도입될 수 있다. 추가 요소는 또한 mRNA의 최적 합성에 필요할 수 있다. 이 요소는 스플라이스 신호뿐만 아니라 전사 프로모터, 인핸서 및 종결 신호를 포함할 수 있다.

[0300] 작제물을 함유하는 발현 벡터 또는 DNA 서열이 발현을 위해 준비되면, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포로 형질주입되거나 도입될 수 있다. 이를 달성하기 위해 예를 들어, 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 전기천공, 레트로바이러스 형질도입, 바이러스 형질감염, 유전자 총, 지질 기반 형질감염 또는 다른 통상적인 기술과 같은 다양한 기술이 이용될 수 있다. 생성된 형질주입된 세포를 배양하고 발현된 폴리페타이드를 회수하기 위한 방법 및 조건은 당업자에게 알려져 있고, 본 설명에 기초하여 특정 발현 벡터 및 이용된 포유류 숙주 세포에 의존하여 변하거나 최적화될 수 있다.

[0301] **10.2. 세포**

[0302] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0303] 일 실시형태에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 핵산을 포함하도록 유전적으로 조작된다.

[0304] 일 실시형태에서, 숙주 세포는 발현 카세트를 사용하여서 유전적으로 조작된다. "발현 카세트"의 구절은 이러한 서열과 맞는 숙주에서 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 이러한 카세트는 프로모터, 인트론을 갖거나 갖지 않는 오픈 리딩 프레임 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 예를 들어, 유도성 프로모터와 같은 발현을 가져오는 데 필요하거나 도움이 되는 추가 인자가 또한 사용될 수 있다.

[0305] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0306] 세포는 진핵 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 또는 인간 세포일 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 적합한 진핵 세포는 Vero 세포, HeLa 세포, COS 세포, CHO 세포, HEK293 세포, BHK 세포 및 MDCKII 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 적합한 곤충 세포는 Sf9 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0307] **11. 약학적 조성물**

[0308] 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 IL2 전구단백질 및 하나 이상의 담체, 부형제 및/또는 희석제를 포함하는 조성물의 형태일 수 있다. 상기 조성물은 특정 용도를 위해, 예를 들어, 수의학적 사용 또는 인간에서의 약제학적 사용을 위해 제형화될 수 있다. 조성물의 형태(*예를 들어*, 건조 분말, 액체 제형 등) 및 사용된 부형제, 희석제 및/또는 담체는 IL2 전구단백질의 의도된 용도에 따라 및 치료 용도의 경우, 투여 방식에 따라 달라질 것이다.

[0309] 치료학적 사용을 위해, 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 멸균의 약학적 조성물의 일부로서 공급될 수 있다. 이 조성물은 (환자에게 이것을 투여하는 원하는 방법에 따라) 임의의 적합한 형태일 수 있다. 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 비강내, 정맥내, 근육내, 종양내, 척추강내, 국소 또는 국재와 같은 다양한 경로에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 임의의 주어진 경우에 가장 적합한 투여 경로는 IL2 전구단백질, 대상체, 및 질환의 성질 및 중증도 및 대상체의 신체 조건에 따라 달라질 것이다. 통상적으로, 약학적 조성물은 정맥내로 또는 피하로 투여될 것이다.

[0310] 약학적 조성물은 용량당 본 개시내용의 IL2 전구단백질의 미리 결정된 양을 함유하는 단위 투여량 형태로 편리하게 제시될 수 있다. 단위 용량에 포함된 IL2 전구단백질의 분량은 치료되는 질환뿐만 아니라 당해 기술분야에 잘 알려진 다른 인자에 따라 달라질 것이다. 이러한 단위 투여량은 단일 투여에 적합한 IL2 전구단백질의 양을 함유하는 동결건조된 건조 분말의 형태 또는 액체의 형태일 수 있다. 건조 분말 단위 투여량 형태는 주사기, 희석제의 적합한 분량 및/또는 투여에 유용한 다른 성분을 갖는 키트에서 포장될 수 있다. 액체 형태의 단위 투여량은 단일 투여에 적합한 IL2 전구단백질의 분량으로 미리 충전된 주사기의 형태로 편리하게 공급될 수 있다.

[0311] 약학적 조성물은 또한 다중 투여에 적합한 IL2 전구단백질의 분량을 함유하는 벌크 형태로 공급될 수 있다.

[0312] 약학적 조성물은 원하는 순도 정도를 갖는 IL2 전구단백질을 통상적으로 당해 기술분야에서 이용된 선택적인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제(이들 모두는 "담체"로서 본원에서 지칭됨), 즉, 완충제, 안정화제, 보존제, 등장화제(isotonifier), 비이온성 세제, 항산화제 및 다른 기타 첨가제와 혼합하여서 동결건조된 제형 또는 수성 용액으로서 보관을 위해 준비될 수 있다. 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 제16판 (Osol, 편집 1980)] 참조. 이러한 첨가제는 이용된 투여량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이어야 한다.

[0313] 완충제는 생리학적 조건에 근접하는 범위에서 pH를 유지하는데 도움이 된다. 이들은 광범위한 농도로 존재할 수 있지만, 전형적으로 약 2 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 존재할 것이다. 본 개시내용과 함께 사용하기에 적합한 완충제는 유기산 및 무기산 둘 모두 및 이의 염 예컨대 시트레이트 완충제(*예를 들어*, 일나트륨 시트레이트-이나트륨 시트레이트 혼합물, 시트르산-삼나트륨 시트레이트 혼합물, 시트르산-일나트륨 시트레이트 혼합물 *등*), 숙시네이트 완충제(*예를 들어*, 숙신산-일나트륨 숙시네이트 혼합물, 숙신산-수산화나트륨 혼합물, 숙신산-이나트륨 숙시네이트 혼합물 *등*), 타르트레이트 완충제(*예를 들어*, 타르타르산-나트륨 타르트레이트 혼합물, 타르타르산-칼륨 타르트레이트 혼합물, 타르타르산-수산화나트륨 혼합물 *등*), 푸마레이트 완충제(*예를 들어*, 푸마르산-일나트륨 푸마레이트 혼합물, 푸마르산-이나트륨 푸마레이트 혼합물, 일나트륨 푸마레이트-이나트륨 푸마레이트 혼합물 *등*), 글루코네이트 완충제(*예를 들어*, 글루콘산-나트륨 글리코네이트 혼합물, 글루콘산-수산화나트륨 혼합물, 글루콘산-칼륨 글리코네이트 혼합물 *등*), 옥살레이트 완충제(*예를 들어*, 옥살산-나트륨 옥살레이트 혼합물, 옥살산-수산화나트륨 혼합물, 옥살산-칼륨 옥살레이트 혼합물 *등*), 락테이트 완충제(*예를 들어*, 락트산-나트륨 락테이트 혼합물, 락트산-수산화나트륨 혼합물, 락트산-칼륨 락테이트 혼합물 *등*) 및 아세테이트 완충제(*예를 들어*, 아세트산-나트륨 아세테이트 혼합물, 아세트산-수산화나트륨 혼합물 *등*)를 포함한다. 추가적으로, 인산염 완충제, 히스티딘 완충제 및 트리메틸아민 염, 예컨대 Tris를 사용할 수 있다.

[0314] 보존제는 미생물 성장을 지연시키도록 첨가될 수 있고, 약 0.2% 내지 1%(w/v)의 범위의 양으로 첨가될 수 있다. 본 개시내용과 사용하기 위한 적합한 보존제는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레솔, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤즈알코늄 할라이드(*예를 들어*, 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드), 헥사메토늄 클로라이드 및 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레소르시놀, 사이클로헥산올 및 3-펜탄올을 포함한다. "안정화제"로 때때로 알려진 등장화제는 본 개시내용의 액체 조성물의 등장성

을 보장하도록 첨가될 수 있고, 다가 당 알코올, 예를 들어, 3가 또는 더 고차의 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리쓰리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다. 안정화제는 기능이 벌크제(bulking agent)로부터 치료제를 가용화시키고, 변성 또는 용기 벽에 대한 부착을 방지하는 것을 돕는 첨가제의 범위일 수 있는 부형제의 넓은 카테고리를 지칭한다. 통상적인 안정화제는 다가 당 알코올(상기 열거됨); 아미노산, 예컨대 아르기닌, 리신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등, 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 리비톨, 미오이노시톨, 갈락티톨, 글리세롤 및 이노시톨과 같은 사이클리톨을 포함하는 기타; 폴리에틸렌 글리콜; 아미노산 중합체; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타티온, 티오크산, 나트륨 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, a-모노티오글리세롤 및 나트륨 티오 설페이트; 저분자량 폴리펩타이드(*예를 들어*, 10개 잔기 또는 미만의 펩타이드); 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈 모노사카라이드, 예컨대 자일로스, 만노스, 프럭토스, 글루코스; 디사카라이드, 예컨대 락토스, 말토스, 수크로스 및 트레할로스; 및 트리사카라이드, 예컨대 라피노스; 및 폴리사카라이드, 예컨대 덱스트란일 수 있다. 안정화제는 IL2 전구단백질의 중량당 0.5 중량% 내지 10 중량%의 범위의 양으로 존재할 수 있다.

[0315] 비이온성 계면활성제 또는 세제("습윤제"로도 알려짐)은 당단백질을 가용화시키는 것을 도울뿐만 아니라 또한 당단백질의 변성을 야기하지 않으면서 응력을 받는 전단 표면에 제형이 노출되게 허용하는, 아지테이션 유도된 응집에 대해 당단백질을 보호하도록 첨가될 수 있다. 적합한 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트(20, 80 등), 폴리옥사머(184, 188 등), 및 플루로닉 폴리올을 포함한다. 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/mL 내지 약 1.0 mg/mL, 예를 들어 약 0.07 mg/mL 내지 약 0.2 mg/mL 범위로 존재할 수 있다.

[0316] 추가적인 여러가지 부형제는 증량제(*예를 들어*, 전분), 킬레이트제(*예를 들어*, EDTA), 산화방지제(*예를 들어*, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E), 및 공용매를 포함한다.

[0317] 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 예를 들어, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 함유하는 IL2 전구단백질을 포함하는 약학적 조성물로 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 IL2 전구단백질을 포함하는 약제학적 또는 멸균 조성물을 제조하기 위해, IL2 전구단백질 제제를 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체와 결합할 수 있다.

[0318] 예를 들어, IL2 전구단백질의 제형은 IL2 전구단백질을 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제와 혼합하여 *예를 들어*, 동결건조 분말, 슬러리, 수용액, 로션 또는 현탁액과 같은 형태로 제조할 수 있다(*예를 들어*, Hardman 등, 2001 , Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, 및 Wlkins, New York, N.Y.; Avis, 등; (편집),1993, Pharmaceutical Dosage Forms: General Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, 등 (편집), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, 등 (편집),1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner 및 Kotkoskie, 2000, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 참조).

[0319] 특정 대상체에 대한 유효량은 치료되는 병태, 대상의 전반적인 건강, 방법 경로 및 투여 용량, 부작용의 중증도와 같은 요인에 따라 달라질 수 있다(*예를 들어*, Maynard, 등 (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK 참조).

[0320] 본 개시내용의 조성물은 당해 기술분야에서 알려진 다양한 방법 중 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. IL2 전구단백질에 대한 선택된 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척수 또는 다른 일반적인 투여 경로, 예를 들어, 주사 또는 주입을 포함한다. 일반적인 투여는 보통 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 나타내고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 제한 없이 포함한다. 대안적으로, 본 개시내용의 조성물은 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어 비강내, 경구, 질내, 직장, 설하 또는 국소 투여와 같은 비일반적인 경로를 통해 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, IL2 전구단백질은 주입에 의해 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 피하로 투여된다.

[0321] **12. 치료 적응증 및 사용방법**

[0322] 본 개시내용은 본 개시내용의 IL2 전구단백질을 사용하고 적용하는 방법을 제공한다.

[0323] 특정 측면에서, 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이는 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에서 설명되는 IL2 전구단백질 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질은 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 의한 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커의 절단에 의해 생성된다. 따라서 IL2 전구단백질은 암 조직에서 선택적으로 활성화된다.

[0324] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IL2 단백질을 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이는 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에서 설명한 바와 같이 IL2 전구단백질 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 IL2 전구단백질은 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖고, 각각은 IL2 단백질이 투여되는 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함한다. 따라서, IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질은 암 조직에서 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질 내한 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커의 절단에 의해 생성된다.

[0325] 본 개시내용은 IL2 단백질의 국소 전달 방법을 추가로 제공하며, 이는 대상체에게 본원에서 설명한 바와 같이 IL2 전구단백질 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 IL2 전구단백질은 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖고 있으며, 각각은 IL2 단백질이 국소 전달될 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "국소 전달"은 국소 투여를 필요로 하지 않고 오히려 IL2 전구단백질의 활성 성분이, 선택적으로 조직에 의해 발현되는 표적 분자를 인식하는 표적화 부분을 갖는 관심의 위치로의 표적화와 함께, 의도된 부위에서 활성인 프로테아제에 의해 관심 부위에서 단백질이 활성화되는 것을 지칭함을 나타낸다.

[0326] 본 개시내용은 대상체에게 감소된 전신 노출 및/또는 감소된 전신 독성을 갖는 IL2 요법을 투여하는 방법을 제공하며, 이는 대상체에게 본원에서 설명한 바와 같이 IL2 전구단백질 또는 약학적 조성물의 형태로 IL2 요법을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 IL2 전구단백질은 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖고 있으며, 각각은 IL2 치료법이 바람직하고/하거나 의도된 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함한다.

[0327] 따라서, 전술한 방법은 IL2 요법을 위해 의도된 부위에서 IL2 전구단백질의 우선적인 활성화 덕분에 감소된 표적외 부작용을 갖는 IL2 요법을 가능하게 한다.

[0328] 전술한 방법의 일부 실시형태에서, IL2 전구단백질은 또한 표적화되며, 치료를 위해 의도된 부위(*예*: 조직에 의해)에서 발현되는 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함한다.

[0329] 따라서 본 개시내용은 치료를 위한 부위, *예를 들어*, 암 조직에 활성화된 IL2 단백질을 표적화 전달하는 방법을 제공하며, 이는 대상체에게 본원에서 설명한 바와 같은 IL2 전구단백질 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 IL2는 치료를 위해 의도된 부위 또는 조직(*예를 들어*, 암 조직)에 의해 발현되는 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 모이어티을 포함하고, 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖고, 각각은 IL2 요법이 바람직하고/하거나 의도된 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함한다.

[0330] 본 개시내용은 표적 조직에서 면역 반응을 국소적으로 유도하는 방법을 추가로 제공하며, 이는 대상체에게 표적 조직에서 발현되는 표적 분자를 결합할 수 있는 하나 이상의 표적화 모이어티와 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 본원에서 설명된 바와 같은 IL2 전구단백질 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 각각은 표적 조직에서 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함한다. 이후, IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질은 표적 조직에서 하나 이상의 프로테아제에 의한 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커의 절단에 의해 생성된다. 이후, 생성된 활성화된 IL2 단백질은 표적 조직에서 적어도 하나의 세포 유형에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0331] 일부 실시형태에서, 투여는 조직에 국소가 아니다. 예를 들어, 표적 조직이 암 조직인 경우, 투여는 전신 또는 피하 투여일 수 있다.

[0332] 본 개시내용의 IL2 전구단백질은 표적 분자(종양 세포 또는 종양 미세환경, *예를 들어*, 세포외 기질 또는 종양 림프구)를 발현하는 임의의 증식성 장애(*예를 들어*, 암)의 치료에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 암은 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 부신피질 암종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 기저 세포

암종, 뇌 종양, 담관암, 방광암, 골암, 유방암, 기관지 종양, 버킷 림프종, 원인 불명의 원발성 암종, 심장 종양, 자궁경부암, 척색종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수증식성 신생물, 결장암, 결장직장암, 두개인두종, 피부 T 세포 림프종, 관 암종, 배아 종양, 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 유착 신경모세포종, 섬유성 조직구종, 유잉육종, 안구암, 생식 세포 종양, 담낭암, 위암, 위장관 유암종 종양, 위장관 기질 종양, 임신성 융모성 질환, 신경교종, 두경부암, 모발 세포 백혈병, 간세포암, 조직구증가증, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구내 흑색종, 섬세포종양, 카포시육종, 신장암, 랑게르한스세포 조직구증가증, 후두암, 백혈병, 구순암 및 구강암, 간암, 상피내 소엽 암종, 폐암, 림프종, 거대글로불린혈증, 악성 섬유성 조직구종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, NUT 유전자 관련 잠복 원발성 정중선암종을 동반한 전이성 편평경부암, 구강암, 다발성 내분비샘 신생물 증후군 다발성 골수종, 균상 식육종, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 신생물, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 비소세포폐암, 구인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 유두종증, 부신경절종, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 뇌하수체 종양, 흉막폐 모세포종, 원발성 중추신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신세포암, 신우 및 요관암, 망막모세포종, 횡문근 종양, 침샘암, 세자리 증후군, 피부암, 소 세포 폐암, 소장암, 연조직 육종, 척수 종양, 위암, T-세포 림프종, 기형종양, 고환암, 인후암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 질암, 외음부암 또는 윌름스 종양이다.

[0333] 아래 표 I은 특정 표적 분자를 표적으로 하는 IL2 전구단백질이 사용될 수 있는 예시적인 적응증을 나타낸다.

표 10

[0334]

표 I
표적 분자 적응증의 예

표적	**예시적인 적응증(들)**
ADRB3	유잉 육종
ALK	NSCLC, ALCL, IMT, 신경모세포종
B7H3	흑색종, 골육종, 백혈병, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 결장직장암
BCMA	다발성 골수종, 백혈병(*예를 들어*, 급성 림프모구성 백혈병("ALL"), 급성 골수성 백혈병("AML"), 만성 림프구성 백혈병("CLL"), 만성 골수성 백혈병("CML") 및 모발 세포 백혈병("HCL")); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종(미만성 거대 B 세포 림프종("DLBCL")을 포함함))
카드헤린 17	위암, 췌장암, 결장직장 선암종
CAIX	투명 세포 신세포 암종, 저산소성 고형 종양, 두경부 편평상피 암종
CD123	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종. 바람직한 실시형태에서, 적응증은 AML이다.
CD171	신경모세포종, 부신경절종
CD179a	B 세포 악성종양
CD19	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종.
CD20	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종.
CD22	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종; 폐암
CD24	난소암, 유방암, 전립선암, 방광암, 신장암, 비-소 세포 암종
CD30	역형성 거대 세포 림프종, 배아 암종, 호지킨 림프종
CD32b	B세포 악성종양, 위암, 췌장암, 식도암, 교모세포종, 유방암, 대장암
CD33	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종. 바람직한 실시형태에서, 적응증은 AML이다.
CD38	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종
CD44v6	대장암, 두경부 소 세포 암종
CD97	B세포 악성종양, 위암, 췌장암, 식도암, 교모세포종, 유방암, 대장암
CEA(CEACAM5)	대장 암종, 위 암종, 췌장 암종, 폐암, 유방암, 갑상선 수질 암종
CLDN6	난소암, 유방암, 폐암
CLL-1	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종. 바람직한 실시형태에서, 적응증은 AML이다.
CS1 (SLAMF7)	다발성 골수종

EGFR	폐의 편평 세포 암종, 항문암, 교모세포종, 두경부 상피 종양, 대장암
EGFRvIII	교모세포종
EPCAM	위장관암, 결장직장암
EphA2	카포시 육종, 교모세포종, 고형 종양, 신경교종
에프린 B2	갑상선암, 유방암, 악성 흑색종
ERBB2(Her2/neu)	유방암, 난소암, 위암, 폐 선암종, 비-소 세포 폐암, 자궁암, 자궁장액성 자궁내막 암종, 타액선 암종
FAP	췌장암, 결장직장암, 전이, 상피암, 연조직 육종
FCRL5	다발성 골수종
FLT3	백혈병(*예를 들어*, ALL,CLL,AML, CML, HCL), 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨림프종,*예를 들어*, DLBCL), 다발성 골수종
엽산 수용체 알파	난소암, 유방암, 신장암, 폐암, 결장직장암, 뇌암
엽산 수용체 베타	난소암
푸코실 GM1	AML, 골수종
GD2	악성 흑색종, 신경모세포종
GD3	흑색종
GloboH	난소암, 위암, 전립선암, 폐암, 유방암, 췌장암
gp100	흑색종
GPNMB	유방암, 두경부암
GPR20	GIST
GPR64	유잉 육종, 전립선, 신장 및 폐 육종
GPRC5D	다발성 골수종
HAVCR1	신장암
HER2	HER-2(+) 위식도 접합부 선암종, HER-2 양성 위선암종, HER2 양성 유방 암종
HER3	결장암 및 위암
HMWMAA	흑색종, 교모세포종, 유방암
IGF-I 수용체	유방암, 전립선암, 폐암
IL11Rα	갑상선 유두암, 골육종, 결장직장 선암종, 림프구성 백혈병
IL13Rα2	신세포 암종, 전립선암, 신경교종, 두경부암, 성상세포종
KIT	골수성 백혈병, 카포시 육종, 적백혈병, 위장관 기질 종양
KLRG2	유방암, 폐암 및 난소암.
LewisY	편평 세포 폐 암종, 폐 선암종, 난소 암종, 대장 선암종
LMP2	전립선암, 호지킨 림프종, 비인두 암종
LRP6	유방암
LY6K	유방암, 폐암, 난소암, 자궁경부암
LYPD8	결장직장암 및 위암
메조텔린	중피종, 췌장암, 난소암, 위암, 폐암, 자궁내막암
MUC1	유방암 및 난소암, 폐암, 위암, 췌장암, 전립선암
NCAM	흑색종, 윌름스 종양, 소 세포 폐암, 신경모세포종, 골수종, 부신경절종, 췌장 선조 세포 암종, 골수성 백혈병
NY-BR-1	유방암
o-아세틸 GD2	신경모세포종, 흑색종
OR51E2	전립선암
PANX3	골육종
PLAC1	간세포 암종
폴리시알산	소 세포 폐암
PDGFR-베타	골수단구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병
PRSS21	결장암, 고환암, 난소암
PSCA	전립선암, 위암 및 방광암
PSMA	전립선암
ROR1	전이성 암, 만성 림프구성 백혈병, 폐, 유방, 난소, 결장, 췌장, 육종의 고형 종양
SLC34A2	방광암
SLC39A6	유방암, 식도암
SLITRK6	유방암, 요로상피암, 폐암
SSEA-4	유방암, 암 줄기 세포, 상피성 난소 암종
STEAP1	전립선암

STEAP2	전립선암(거세 저항성 전립선암 포함), 방광암, 자궁경부암, 폐암, 대장암, 신장암, 유방암, 췌장암, 위암, 자궁암, 난소암, 바람직하게는 전립선암
TACSTD2	암종, *예를 들어*, 비-소 세포 폐암
TAG72	난소암, 유방암, 결장암, 폐암, 췌장암, 위암
TEM1/CD248	대장암
TEM7R	대장암
Tn	결장직장암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 위암
TSHR	갑상선암, 다발성 골수종
티로시나제	전립선암, 흑색종
UPK2	방광암
VEGFR2	난소암 및 췌장암, 신세포 암종, 결장직장암, 갑상선 수질 암종

[0335] 추가 표적 분자 및 해당 적응증은 *예를 들어*, 문헌[Hafeez 등, 2020, Molecules 25:4764, doi:10.3390/molecules25204764], 특히 표 1에서 개시되어 있다. 표 1은 본원에 전문이 인용방식에 의해 원용된다.

[0336] **서열**

[0337] 본 개시내용의 특정 IL2 전구단백질의 서열은 아래 표 S에서 제공되어 있다.

표 11

[0338]

표 S

예 IL2 전구단백질 성분 서열

성분	서열	서열 번호
hIgG1 Fc (UniprotKB P01857-1의 아미노산 99-330)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	1
hIgG2 Fc(UniprotKB P01859-1의 아미노산 99-326)	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	2
hIgG3 Fc(UniprotKB P01860-1의 아미노산 99-377)	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	3
hIgG4 Fc(UniprotKB P01861-1의 아미노산 99-327)	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	4
hIgG4s Fc	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	5
hIgG1 PVA Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	6
hIL2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	7
hIL2Rα 세포외 도메인	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI	8
hIL2Rα의 아미노산 22-186	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG	9

hIL2Rα의 아미노산 22-240	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	10
hIgG1 CH1(UniprotKB P01857-1의 아미노산 1-98)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV	11
hIgG2 CH1(UniprotKB P01859-1의 아미노산 1-98)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV	12
hIgG3 CH1(UniprotKB P01860-1의 아미노산 1-98)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV	13
hIgG4 CH1(UniprotKB P01861-1의 아미노산 1-98)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV	14

[0339] **번호가 매겨진 실시형태**

[0340] 다양한 특정 실시형태가 예시되고 기재되어 있지만, 본 개시내용(들)의 정신 및 사상으로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변경이 이루어질 수 있다고 이해될 것이다. 본 개시내용은 하기에 기술된 숫자가 매겨진 실시형태에 의해 예시된다.

[0341] 다음의 번호가 매겨진 실시형태에서, 표적화 부분은 바람직하게는 포유동물 표적 분자에 결합하고, IL2 및 IL2Rα 부분은 바람직하게는 포유동물 IL2 및 IL2Rα로부터 유래되고, Fc 도메인은 바람직하게는 포유동물 항체로부터 유래되며, 대상체는 바람직하게는 포유동물이다. 더욱 바람직하게, 포유동물은 인간이다.

[0342] 1. IL2 전구단백질으로서,

[0343] (a) 다음을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬:

[0344] (i) 제1 Fc 도메인;

[0345] (ii) 프로테아제-절단성 링커(PCL) 또는 비절단성 링커("NCL")인 제1 링커;

[0346] (iii) 제1 IL2Rα 부분;

[0347] (iv) 프로테아제-절단성 링커(PCL)인 제2 링커; 및

[0348] (v) 제1 IL2 부분; 및

[0349] (b) 다음을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬:

[0350] (i) 제1 Fc 도메인과 결합하여 Fc 영역을 형성할 수 있는 제2 Fc 도메인;

[0351] (ii) 프로테아제-절단성 링커(PCL) 또는 비절단성 링커("NCL")인 제3 링커;

[0352] (iii) 제2 IL2Rα 부분;

[0353] (iv) 프로테아제-절단성 링커(PCL)인 제4 링커; 및

[0354] (v) 제2 IL2 부분, 를 포함하는 IL2 프로프로테인.

[0355] 2. 실시형태 1에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2 부분이 성숙한 인간 IL2와 적어도 약 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0356] 3. 실시형태 1에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2 부분이 성숙한 인간 IL2와 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0357] 4. 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2 부분이 성숙한 인간 IL2에 비해 N-말단 알라닌 결실이 있는 아미노산 서열을 포함한다.

[0358] 5. 실시형태 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2 부분이 야생형 IL2와 비교하여 N88 위치에 아미노산 치환(선택적으로 여기서 아미노산 치환은 N88D임)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0359] 6. 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2 부분이 야생형 IL2와 비교하여 C125S, C125A 또는 C125V 위치에 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0360] 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되어 있다.

[0361] 8. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되어 있다.

[0362] 9. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 97% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되어 있다.

[0363] 10. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되어 있다.

[0364] 11. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되어 있다.

[0365] 12. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 인간 IL2Rα의 IL2 결합 부분과 적어도 약 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되어 있다.

[0366] 13. 실시형태 7 내지 12 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 (a) IL2Rα의 아미노산 22-186, (b) IL2Rα의 아미노산 22-240 및/또는(c) 인간 IL2Rα의 아미노산 22-272와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0367] 14. 실시형태 7 내지 12 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 (a) IL2Rα의 아미노산 22-186, (b) IL2Rα의 아미노산 22-240 및/또는(c) 인간 IL2Rα의 아미노산 22-272와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0368] 15. 실시형태 7 내지 12 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 (a) IL2Rα의 아미노산 22-186, (b) IL2Rα의 아미노산 22-240 및/또는(c) 인간 IL2Rα의 아미노산 22-272와 적어도 96% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0369] 16. 실시형태 7 내지 12 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 (a) IL2Rα의 아미노산 22-186, (b) IL2Rα의 아미노산 22-240 및/또는(c) 인간 IL2Rα의 아미노산 22-272와 적어도 97% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0370] 17. 실시형태 7 내지 12 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 (a) IL2Rα의 아미노산 22-186, (b) IL2Rα의 아미노산 22-240 및/또는(c) 인간 IL2Rα의 아미노산 22-272와 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0371] 18. 실시형태 7 내지 12 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 IL2Rα 부분이 (a) IL2Rα의 아미노산 22-186, (b) IL2Rα의 아미노산 22-240 및/또는(c) 인간 IL2Rα의 아미노산 22-272와 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0372] 19. 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 제2 링커, 제4 링커, 선택적으로 제1 링커, 선택적으로 제3 링커, 또는 전술한 것 중 두개 이상 또는 모두의 임의의 조합(*예를 들어*, (i) 제1 및 제3 링커, (ii) 제2 및 제4 링커, (iii) 제1 및 제2 링커, (iv) 제3 및 제4 링커, (v) 제1, 제2, 제3 및 제4 링커)은 표 A에 제시된 임의의 프로테아제에 의해 절단 가능한 기질 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

[0373] 20. 실시형태 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 제2 링커, 제4 링커, 선택적으로 제1 링커, 선택적으로 제3 링커, 또는 전술한 것 중 두개 이상 또는 모두의 임의의 조합(*예를 들어*, (i) 제1 및 제3 링커, (ii) 제2 및 제4 링커, (iii) 제1 및 제2 링커, (iv) 제3 및 제4 링커, (v) 제1, 제2, 제3 및 제4 링커)은 표 B에 제시된 기질 서열로부터 선택된 하나 이상의 기질 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

[0374] 21. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 제2 링커, 제4 링커, 선택적으로 제1 링커, 선택적으로 제3 링커, 또는 전술한 것 중 두개 이상 또는 모두의 임의의 조합(*예를 들어*, (i) 제1 및 제3 링커, (ii) 제2 및

제4 링커, (iii) 제1 및 제2 링커, (iv) 제3 및 제4 링커, (v) 제1, 제2, 제3 및 제4 링커)은 표 C에 제시된 기질 서열로부터 선택된 하나 이상의 스페이서 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

[0375] 22. 실시형태 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 제2 링커, 제4 링커, 선택적으로 제1 링커, 선택적으로 제3 링커, 또는 전술한 것 중 두개 이상 또는 모두의 임의의 조합(*예를 들어*, (i) 제1 및 제3 링커, (ii) 제2 및 제4 링커, (iii) 제1 및 제2 링커, (iv) 제3 및 제4 링커, (v) 제1, 제2, 제3 및 제4 링커)은 표 D에 제시된 임의의 PCL 서열의 아미노산 서열 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 이의 변형체, *예를 들어* 1개 아미노산 치환, 2개 아미노산 치환, 3개 아미노산 치환, 4개 아미노산 치환, 또는 5개 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0376] 23. 실시형태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제3 링커가 동일하고/하거나 제3 및 제4 링커가 동일한 IL2 전구단백질.

[0377] 24. 실시형태 23에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커가 동일한 IL2 전구단백질.

[0378] 25. 실시형태 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제3 링커가 비절단성 링커인 IL2 전구단백질.

[0379] 26. 실시형태 25에 있어서, 비절단성 링커가 표 E에 제시된 임의의 NCL 서열을 포함하거나 이로 구성된 IL2 전구단백질.

[0380] 27. 실시형태 25에 있어서, 제1 및 제3 링커의 길이가 2개 내지 60개 아미노산 범위인 IL2 전구단백질.

[0381] 28. 실시형태 25에 있어서, 제1 및 제3 링커의 길이가 5개 내지 25개 아미노산 범위인 IL2 전구단백질.

[0382] 29. 실시형태 25에 있어서, 제1 및 제3 링커의 길이가 7개 내지 20개 아미노산 범위인 IL2 전구단백질.

[0383] 30. 실시형태 25에 있어서, 제1 및 제3 링커의 길이가 적어도 5개 아미노산인 IL2 전구단백질.

[0384] 31. 실시형태 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커가 프로테아제-절단성 링커인 IL2 전구단백질.

[0385] 32. 실시형태 31에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커의 길이가 20개 내지 80개 아미노산 범위인 IL2 전구단백질.

[0386] 33. 실시형태 31에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커의 길이가 20개 내지 60개 아미노산 범위인 IL2 전구단백질.

[0387] 34. 실시형태 1 내지 33 중 어느 한 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 Fc 도메인 및/또는 제2 Fc 도메인이 힌지 도메인을 포함한다.

[0388] 35. 실시형태 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 하나 이상의 표적 분자에 결합하는 하나 이상의 표적화 모이어티를 추가로 포함한다.

[0389] 36. 실시형태 35에 있어서, IL2 전구단백질은 제1 표적화 및/또는 제2 표적화 부분을 포함한다.

[0390] 37. 실시형태 36에 있어서, IL2 전구단백질은 제1 Fc 도메인의 N-말단에 있는 제1 표적화 부분 또는 이의 성분(*예*: Fab의 VH) 및/또는 제2 Fc 도메인의 N-말단에 있는 제2 표적화 부분 또는 이의 성분(*예*: Fab의 VH)을 포함한다.

[0391] 38. 실시형태 35 또는 37에 있어서, IL2 전구단백질은 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 Fab이다.

[0392] 39. 실시형태 35 또는 37에 있어서, IL2 전구단백질은 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 scFv이다.

[0393] 40. 실시형태 35 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 IL2 전구단백질.

[0394] 41. 실시형태 35 내지 40 중 어느 한 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 섹션 6.7에서 확인된 임의의 표적 분자에 결합할 수 있다.

[0395] 42. 실시형태 35 내지 41 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화

부분은 (a)표 F에 제시된 항체의 (i) CDR 또는(ii) VH 및 VL서열을 포함하거나 (b) 표 F에 제시된 항체와 표적 분자에 결합하기 위해 경쟁한다.

[0396] 43. 실시형태 35 내지 41 중 어느 하나에 에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 신데칸, 헤파라나제, 인테그린, 오스테오폰틴, 링크, 카데린, 라미닌, 라미닌 유형 EGF, 렉틴, 피브로넥틴, 노치, 넥틴(*예*: 넥틴-4), 테나신, 콜라겐(*예*: 콜라겐 유형 X) 및 매트릭신으로부터 선택적으로 선택되는 ECM 항원에 결합할 수 있다.

[0397] 44. 실시형태 43에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 넥틴(*예*: 넥틴 4)과 결합할 수 있다.

[0398] 45. 실시형태 43에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 콜라겐(*예*: 콜라겐 X)에 결합할 수 있다.

[0399] 46. 실시형태 35 내지 41 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자에 결합할 수 있다.

[0400] 47. 실시형태 46에 있어서, IL2 전구단백질의 항원은 T 세포 공동 자극 단백질이다.

[0401] 48. 실시형태 47에 있어서, T 세포 공동자극 단백질이 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 또는 B7-H3인 IL2 전구단백질.

[0402] 49. 실시형태 48에 있어서, IL2 전구단백질의 T 세포 공동 자극 단백질은 B7-H3이다.

[0403] 50. 실시형태 35 내지 41 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 면역관문 억제제에 결합할 수 있다.

[0404] 51. 실시형태 50에 있어서, IL2 전구단백질의 면역관문 억제제는 CTLA-4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, 또는 CHK2이다.

[0405] 52. 실시형태 51에 있어서, 관문 억제제가 PDL1인 IL2 전구단백질.

[0406] 53. 실시형태 51에 있어서, 관문 억제제가 PD1인 IL2 전구단백질.

[0407] 54. 실시형태 51에 있어서, 관문 억제제가 LAG3인 IL2 전구단백질.

[0408] 55. 실시형태 35 내지 41 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있다.

[0409] 56. 실시형태 55에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 AFP, ALK, BAGE 단백질, BIRC5(서바이빈), BIRC7, β-카테닌, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, 탄산무수화효소 IX, 캐스페이스-8, CALR, CEACAM5(암종배아항원 또는 CEA로도 알려짐), CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, 사이클린-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질(*예*: GAGE-1 또는 -2), GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE 단백질(*예*: MAGE-1, -2, -3, -4, -6, 및 -12), MART-1, 메소텔린, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLH1), RAGE 단백질, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, Thompson-nouvelle 항원(Tn), TRP-1, TRP-2, 티로시네이스 및 우로플라킨-3에 결합할 수 있다.

[0410] 57. 실시형태 56에 있어서, IL2 전구단백질의 TAA는 EGFR이다.

[0411] 58. 실시형태 56에 있어서, IL2 전구단백질의 TAA는 HER2이다.

[0412] 59. 실시형태 56에 있어서, IL2 전구단백질의 TAA는 EPCAM이다.

[0413] 60. 실시형태 56에 있어서, IL2 전구단백질의 TAA는 CEACAM5이다.

[0414] 61. 실시형태 56에 있어서, IL2 전구단백질의 TAA는 CD20이다.

[0415] 62. 실시형태 1 내지 61 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 Fc 영역은 동종이량체이다.

[0416] 63. 실시형태 1 내지 61 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질의 Fc 영역은 이종이량체이다.

[0417] 64. 실시형태 1 내지 63 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 다음을 포함한다.

[0418] (a) N-말단에서 C-말단 순서로 다음을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬:

[0419] (i) 제1 Fc 도메인;

[0420] (ii) 제1 링커;

[0421] (iii) 제1 IL2 부분;

[0422] (iv) 제2 링커; 및

[0423] (v) 제1 IL2Rα 부분; 및

[0424] (b) 제2 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 부분을 포함한다;

[0425] (i) 제2 Fc 도메인;

[0426] (ii) 제3 링커;

[0427] (iii) 제2 IL2 부분;

[0428] (iv) 제4 링커; 및

[0429] (v) 제2 IL2Rα 부분.

[0430] 65. IL2 전구단백질으로서, 선택적으로 실시형태 1 내지 64 중 어느 하나의 IL2 전구단백질이되, IL2 전구단백질은 다음과 같다.

[0431] (a) 회합하여 Fc 영역을 형성할 수 있는 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인;

[0432] (b) Fc 도메인에 C-말단의 비절단성 또는 프로테아제 절단성인 2개의 링커;

[0433] (c) 제1 및 제3 링커의 C-말단의 두 IL2 부분;

[0434] (d) IL2 부분에 C-말단의 프로테아제-절단성인 2개의 추가 링커; 및

[0435] (e) 제2 및 제4 링커의 C-말단의 두 IL2Rα 부분.

[0436] 66. 실시형태 1 내지 63 중 어느 하나에 따른 IL2 전구단백질로서,

[0437] (a) 제1 폴리펩티드 사슬은 제1 Fc 도메인, 이어서 프로테아제-절단성 링커인 제1 링커, 제1 IL2 부분, 제2 링커, 제1 IL2Rα 부분을 포함하고; 및

[0438] (b) 제2 폴리펩티드 사슬은 제2 Fc 도메인, 이어서 프로테아제-절단성 링커인 제3 링커, 제2 IL2 부분, 제4 링커, 제2 IL2Rα 부분을 포함한다.

[0439] 67. 실시형태 1 내지 63 중 어느 하나에 따른 IL2 전구단백질로서,

[0440] (a) 제1 폴리펩티드 사슬은 제1 Fc 도메인, 이어서 비절단성 링커인 제1 링커, 제1 IL2 부분, 제2 링커, 제1 IL2Rα 부분을 포함하고; 및

[0441] (b) 제2 폴리펩티드 사슬은 제2 Fc 도메인, 이어서 비절단성 링커인 제3 링커, 제2 IL2 부분, 제4 링커, 제2 IL2Rα 부분을 포함한다.

[0442] 68. 실시형태 1 내지 63 중 어느 하나에 따른, 도 1a에 도시된 구성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0443] 69. 실시형태 1 내지 63 중 어느 하나에 따른, 도 2a에 도시된 구성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0444] 70. IL2 전구단백질으로서, 선택적으로 실시형태 1 내지 64 중 어느 하나의 IL2 전구단백질이되, IL2 전구단백질은 다음과 같다.

[0445] (a) N-말단에서 C-말단 순서로 다음을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬:

[0446] (i) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제1 아미노산 서열;

[0447] (ii) (1) 제1 아미노산 서열을 제3 아미노산 서열에 연결하기 위한 절단성 링커/절단 가능한 수단, 선택적으로, 절단성 링커/절단 가능한 수단은 표 B 또는 표 D에 제시된 하나 이상의 서열을 포함하는 제2 아미노산 서열

을 포함하거나 이로 구성되며; 또는 (2) 제1 아미노산 서열을 제3 아미노산 서열에 연결하기 위한 비절단성 링커/비절단성 수단, 선택적으로, 비절단성 링커/비절단성 수단은 표 E에 제시된 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0448] (iii) 서열번호:7과 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 제3 아미노산 서열;

[0449] (iv) 표 B에 제시된 서열을 포함하는 제4 아미노산 서열; 및

[0450] (v) 서열번호 8, 9 및 10 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제5 아미노산 서열; 및

[0451] (b) N-말단에서 C-말단 순서로 다음을 포함하는 제2 폴리펩티드 사슬:

[0452] (i) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제6 아미노산 서열;

[0453] (ii) (1) 제6 아미노산 서열을 제8 아미노산 서열에 연결하기 위한 절단성 링커/절단 가능한 수단, 선택적으로, 절단성 링커/절단 가능한 수단은 표 B 또는 표 D에 제시된 하나 이상의 서열을 포함하는 제7 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며; 또는 (2) 제6 아미노산 서열을 제8 아미노산 서열에 연결하기 위한 비절단성 링커/비절단성 수단, 선택적으로, 비절단성 링커/비절단성 수단은 표 E에 제시된 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0454] (iii) 서열번호:7과 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 제8 아미노산 서열;

[0455] (iv) 표 B에 제시된 서열을 포함하는 제9 아미노산 서열; 및

[0456] (v) 서열번호:8, 9, 또는 10과 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 제10 아미노산 서열.

[0457] 71. 실시형태 70에 있어서, 제1 폴리펩티드가 제1 아미노산 서열의 N-말단에 서열 번호:11, 12, 13 또는 14 중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제11 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

[0458] 72. 실시형태 71에 있어서, IL2 전구단백질의 제11 아미노산 서열이 서열 번호: 11의 아미노산 서열이다.

[0459] 73. 실시형태 71에 있어서, IL2 전구단백질의 제11 아미노산 서열이 서열 번호: 12의 아미노산 서열이다.

[0460] 74. 실시형태 71에 있어서, IL2 전구단백질의 제11 아미노산 서열이 서열 번호: 13의 아미노산 서열이다.

[0461] 75. 실시형태 71에 있어서, IL2 전구단백질의 제11 아미노산 서열이 서열 번호: 14의 아미노산 서열이다.

[0462] 76. 실시형태 70 내지 75 중 어느 하나에 있어서, 제2 폴리펩티드가 제1 아미노산 서열의 N-말단에 서열 번호:11, 12, 13 또는 14중 어느 하나와 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 제12 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

[0463] 77. 실시형태 76에 있어서, IL2 전구단백질의 제12 아미노산 서열이 서열 번호: 11의 아미노산 서열이다.

[0464] 78. 실시형태 76에 있어서, IL2 전구단백질의 제12 아미노산 서열이 서열 번호: 12의 아미노산 서열이다.

[0465] 79. 실시형태 76에 있어서, IL2 전구단백질의 제12 아미노산 서열이 서열 번호: 13의 아미노산 서열이다.

[0466] 80. 실시형태 76에 있어서, IL2 전구단백질의 제12 아미노산 서열이 서열 번호: 14의 아미노산 서열이다.

[0467] 81. 실시형태 70 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 제1 아미노산 서열이 서열 번호:1, 2, 3, 4, 5 또는 6 중 어느 하나와 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0468] 82. 실시형태 70 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 제1 아미노산 서열이 서열 번호:1, 2, 3, 4, 5 또는 6 중 어느 하나의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0469] 83. 실시형태 82에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 아미노산 서열이 서열 번호: 5의 아미노산 서열이다.

[0470] 84. 실시형태 82에 있어서, IL2 전구단백질의 제1 아미노산 서열이 서열 번호: 6의 아미노산 서열이다.

[0471] 85. 실시형태 70 내지 84 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제1 아미노산 서열의 길이가 350개 이하의 아미노산이다.

[0472] 86. 실시형태 70 내지 84 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제1 아미노산 서열의 길이가 330개 이하의 아미노산이다.

[0473] 87. 실시형태 70 내지 86 중 어느 하나에 있어서, 제6 아미노산 서열이 서열 번호:1, 2, 3, 4, 5 또는 6 중

어느 하나와 적어도 약 98%의 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0474] 88. 실시형태 70 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 제6 아미노산 서열이 서열 번호:1, 2, 3, 4, 5 또는 6 중 어느 하나의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0475] 89. 실시형태 88에 있어서, IL2 전구단백질의 제6 아미노산 서열이 서열 번호: 5의 아미노산 서열이다.

[0476] 90. 실시형태 88에 있어서, IL2 전구단백질의 제6 아미노산 서열이 서열 번호: 6의 아미노산 서열이다.

[0477] 91. 실시형태 70 내지 90 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제6 아미노산 서열의 길이가 350개 이하의 아미노산이다.

[0478] 92. 실시형태 70 내지 90 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제6 아미노산 서열의 길이가 330개 이하의 아미노산이다.

[0479] 93. 실시형태 70 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 제2 아미노산 서열이 표 B에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

[0480] 94. 실시형태 93에 있어서, 제2 아미노산 서열이 서열 HPVGLLAR(서열 번호: 163)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0481] 95. 실시형태 93에 있어서, 제2 아미노산 서열이 서열 VPLSLYSG(서열 번호: 159)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0482] 96. 실시형태 93에 있어서, 제2 아미노산 서열이 서열 ISSGLLS(서열 번호: 370)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0483] 97. 실시형태 93에 있어서, 제2 아미노산 서열이 서열 PLGLWSQ(서열 번호: 115)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0484] 98. 실시형태 70 내지 93 중 어느 하나에 있어서, 제2 아미노산 서열이 표 D에 제시된 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0485] 99. 실시형태 98에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS(서열 번호: 199)인 IL2 전구단백질.

[0486] 100. 실시형태 98에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS(서열 번호: 203)인 IL2 전구단백질.

[0487] 101. 실시형태 98에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGHPVGLLARGGGS(서열 번호: 285)인 IL2 전구단백질.

[0488] 102. 실시형태 98에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GISSGLLSGRSDNHG(서열 번호: 282)인 IL2 전구단백질.

[0489] 103. 실시형태 98에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGSISSGLLSGRSDNHGGGS(서열번호: 283)인 IL2 전구단백질.

[0490] 104. 실시형태 98에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGISSGLLSGRSDNHGGGS(서열 번호: 284)인 IL2 전구단백질.

[0491] 105. 실시형태 98에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS(서열 번호: 221)인 IL2 전구단백질.

[0492] 106. 실시형태 70 내지 92에 있어서, IL2 전구단백질은 제2 아미노산 서열이 표 E에 제시된 아미노산 서열이다.

[0493] 107. 실시형태 106에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 $(GGGGS)_n$이고, 여기서 n은1, 2, 3, 4 또는 5(서열 번호: 357)인 IL2 전구단백질.

[0494] 108. 실시형태 93 내지 107 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제2 아미노산 서열의 길이가 25개 이하의 아미노산이다.

[0495] 109. 실시형태 93 내지 107 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제2 아미노산 서열의 길이가 15개 이하의 아미노산이다.

[0496] 110. 실시형태 93 내지 107 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제2 아미노산 서열의 길이가 6개 이하의 아미노산이다.

[0497] 111. 실시형태 70 내지 110 중 어느 하나에 있어서, 제7 아미노산 서열이 표 B에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 IL2 전구단백질.

[0498] 112. 실시형태 111에 있어서, 제7 아미노산 서열이 서열 HPVGLLAR(서열 번호: 163)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0499] 113. 실시형태 111에 있어서, 제7 아미노산 서열이 서열 VPLSLYSG(서열 번호: 159)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0500] 114. 실시형태 111에 있어서, 제7 아미노산 서열이 서열 ISSGLLS(서열 번호: 370)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0501] 115. 실시형태 111에 있어서, 제7 아미노산 서열이 서열 PLGLWSQ(서열 번호: 115)를 포함하는 IL2 전구단백질.

[0502] 116. 실시형태 70 내지 111 중 어느 하나에 있어서, 제7 아미노산 서열이 표 D에 제시된 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0503] 117. 실시형태 116에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS(서열 번호: 199)인 IL2 전구단백질.

[0504] 118. 실시형태 116에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS(서열 번호: 203)인 IL2 전구단백질.

[0505] 119. 실시형태 116에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGHPVGLLARGGGS(서열 번호: 285)인 IL2 전구단백질.

[0506] 120. 실시형태 116에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GISSGLLSGRSDNHG(서열 번호: 282)인 IL2 전구단백질.

[0507] 121. 실시형태 116에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGSISSGLLSGRSDNHGGGS(서열번호: 283)인 IL2 전구단백질.

[0508] 122. 실시형태 116에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGISSGLLSGRSDNHGGGS(서열 번호: 284)인 IL2 전구단백질.

[0509] 123. 실시형태 116에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS(서열 번호: 221)인 IL2 전구단백질.

[0510] 124. 실시형태 70 내지 110에 있어서, IL2 전구단백질은 제7 아미노산 서열이 표 E에 제시된 아미노산 서열이다.

[0511] 125. 실시형태 124에 있어서, 제2 아미노산 서열이 아미노산 서열 $(GGGGS)_n$이고, 여기서 n은1, 2, 3, 4 또는 5(서열 번호: 357)인 IL2 전구단백질.

[0512] 126. 실시형태 111 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 제7 아미노산 서열의 길이가 25개 이하의 아미노산인 IL2 전구단백질.

[0513] 127. 실시형태 111 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 제7 아미노산 서열의 길이가 15개 이하의 아미노산인 IL2 전구단백질.

[0514] 128. 실시형태 111 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 제7 아미노산 서열의 길이가 6개 이하의 아미노산인 IL2 전구단백질.

[0515] 129. 실시형태 70 내지 128 중 어느 하나에 있어서, 제3 아미노산 서열이 서열 번호: 7과 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0516] 130. 실시형태 70 내지 128 중 어느 하나에 있어서, 제3 아미노산 서열이 서열 번호: 7의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0517] 131. 실시형태 70 내지 130 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제3 아미노산 서열의 길이가 150개 이하의 아미노산이다.

[0518] 132. 실시형태 70 내지 130 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제3 아미노산 서열의 길이가 135개 이하의 아미노산이다.

[0519] 133. 실시형태 70 내지 132 중 어느 하나에 있어서, 제8 아미노산 서열이 서열번호:7과 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0520] 134. 실시형태 70 내지 132 중 어느 하나에 있어서, 제8 아미노산 서열이 서열번호:7의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0521] 135. 실시형태 70 내지 134 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제8 아미노산 서열의 길이가 150개 이하의 아미노산이다.

[0522] 136. 실시형태 70 내지 134 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제8 아미노산 서열의 길이가 135개 이하의 아미노산이다.

[0523] 137. 실시형태 70 내지 136에 있어서, IL2 전구단백질의 제4 아미노산 서열은 표 B에 제시된 아미노산 서열을 하나 이상 포함한다.

[0524] 138. 실시형태 70 내지 136에 있어서, IL2 전구단백질은 제4 아미노산 서열이 표 D에 제시된 아미노산 서열이다.

[0525] 139. 실시형태 70 내지 138에 있어서, IL2 전구단백질의 제9 아미노산 서열은 표 B에 제시된 아미노산 서열을 하나 이상 포함한다.

[0526] 140. 실시형태 70 내지 139에 있어서, IL2 전구단백질은 제9 아미노산 서열이 표 D에 제시된 아미노산 서열이다.

[0527] 141. 실시형태 70 내지 140 중 어느 하나에 있어서, 제5 아미노산 서열이 서열 번호:8, 9, 또는 10과 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0528] 142. 실시형태 141에 있어서, 제5 아미노산 서열이 서열번호:8의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0529] 143. 실시형태 141에 있어서, 제5 아미노산 서열이 서열번호:9의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0530] 144. 실시형태 141에 있어서, 제5 아미노산 서열이 서열번호:10의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0531] 145. 실시형태 70 내지 144 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제5 아미노산 서열의 길이가 255개 이하의 아미노산이다.

[0532] 146. 실시형태 70 내지 144 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제5 아미노산 서열의 길이가 225개 이하의 아미노산이다.

[0533] 147. 실시형태 70 내지 144 중 어느 하나에 있어서, IL2 전구단백질은 제5 아미노산 서열의 길이가 170개 이하의 아미노산이다.

[0534] 148. 실시형태 70 내지 147 중 어느 하나에 있어서, 제10 아미노산 서열이 서열번호:8, 9, 또는 10과 적어도 약 98% 서열 동일성을 갖는 IL2 전구단백질.

[0535] 149. 실시형태 148에 있어서, 제10 아미노산 서열이 서열번호:8의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0536] 150. 실시형태 148에 있어서, 제10 아미노산 서열이 서열번호:9의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0537] 151. 실시형태 148에 있어서, 제10 아미노산 서열이 서열번호:10의 아미노산 서열인 IL2 전구단백질.

[0538] 152. 실시형태 70 내지 151 중 어느 하나에 있어서, 상기 제10 아미노산 서열은 길이가 255 이하의 아미노산인 IL2 전구단백질.

[0539] 153. 실시형태 70 내지 151 중 어느 하나에 있어서, 상기 제10 아미노산 서열은 길이가 225 이하의 아미노산

인 IL2 전구단백질.

[0540] 154. 실시형태 70 내지 151 중 어느 하나에 있어서, 상기 제10 아미노산 서열은 길이가 170 이하의 아미노산인 IL2 전구단백질.

[0541] 155. 실시형태 70 내지 154 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬에는 상기 제1 아미노산 서열의 C-말단에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0542] 156. 실시형태 70 내지 155 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬에는 상기 제1 아미노산 서열과 상기 제2 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0543] 157. 실시형태 70 내지 156 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬에는 상기 제2 아미노산 서열과 상기 제3 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0544] 158. 실시형태 70 내지 157 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬에는 상기 제3 아미노산 서열과 상기 제4 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0545] 159. 실시형태 70 내지 158 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬에는 상기 제4 아미노산 서열과 상기 제5 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0546] 160. 실시형태 70 내지 159 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬에는 상기 제6 아미노산 서열의 C-말단에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0547] 161. 실시형태 70 내지 160 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬에는 상기 제6 아미노산 서열과 상기 제7 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0548] 162. 실시형태 70 내지 161 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬에는 상기 제7 아미노산 서열과 상기 제8 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0549] 163. 실시형태 70 내지 162 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬에는 상기 제8 아미노산 서열과 상기 제9 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0550] 164. 실시형태 70 내지 163 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드 사슬에는 상기 제9 아미노산 서열과 상기 제10 아미노산 서열 사이에 추가적인 서열이 결여되어 있는 IL2 전구단백질.

[0551] 165. 실시형태 70 내지 164 중 어느 한 실시형태에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드와 상기 제2 폴리펩티드는 동일한 IL2 전구단백질.

[0552] 166. 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태의 IL2 전구단백질을 인코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산.

[0553] 167. 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태의 IL2 전구단백질 또는 실시형태 166의 핵산(들)을 발현하도록 조작된 숙주 세포.

[0554] 168. 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태의 IL2 전구단백질을 생성하는 방법으로서, 실시형태 167의 숙주 세포를 배양하고 이에 의해 발현된 IL2 전구단백질을 회수하는 단계를 포함하는 방법.

[0555] 169. 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태의 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

[0556] 170. 암을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태의 IL2 전구단백질 또는 실시형태 169의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0557] 171. 실시형태 170에 있어서, 상기 IL2 전구단백질이 표적 분자에 결합할 수 있는 적어도 하나의 표적화 부분을 포함하며, 상기 암이 표적 분자, *예를 들어*, 표 I에 제시된 TAA 및 관련 암의 발현과 연관되는 방법.

[0558] 172. 실시형태 171에 있어서, 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질이 생성되는 방법.

[0559] 173. 실시형태 172에 있어서, IL2 단백질이 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 방법.

[0560] 174. IL2 단백질의 국소 전달 방법으로서, 대상체에게 상기 IL2 단백질이 국소 전달될 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태에 따른 IL2 전구단백질(또는 상기 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0561] 175. 실시형태 174에 있어서, IL2 전구단백질이 조직에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0562] 176. 실시형태 175에 있어서, 상기 IL2 전구단백질은 상기 조직에 의해 발현된 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 모이어티를 포함하는 방법.

[0563] 177. 실시형태 175 또는 실시형태 176에 있어서, 조직이 암 조직인 방법.

[0564] 178. 실시형태 177에 있어서, 하나 이상의 표적화 부분은 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 방법.

[0565] 179. 실시형태 174 내지 178 중 어느 하나에 있어서, 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질이 생성되는 방법.

[0566] 180. 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IL2 단백질로 암을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 상기 IL2 단백질이 존재하는 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태에 따른 IL2 전구단백질(또는 상기 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0567] 181. 실시형태 180에 있어서, IL2 전구단백질이 암 조직에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0568] 182. 실시형태 181에 있어서, IL2 전구단백질이 암 조직에 의해 발현되는 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0569] 183. 실시형태 181 또는 실시형태 182 에 있어서, 하나 이상의 표적화 부분은 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 방법.

[0570] 184. 실시형태 180 내지 183 중 어느 하나에 있어서, 암 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질이 생성되는 방법.

[0571] 185. 상기 대상체에게 감소된 전신 노출 및/또는 감소된 전신 독성을 갖는 IL2 요법을 투여하는 방법으로서, 상기 대상체에게 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태에 따른 IL2 전구단백질(또는 상기 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)의 형태로 상기 IL2 요법을 투여하는 단계를 포함하며, 각각은 IL2 요법이 바람직하고/하거나 의도된 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는 방법.

[0572] 186. 실시형태 185에 있어서, IL2 전구단백질이 조직에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0573] 187. 실시형태 186에 있어서, IL2 전구단백질이 조직에 의해 발현되는 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0574] 188. 실시형태 185 내지 187 중 어느 하나에 있어서, 조직이 암 조직인 방법.

[0575] 189. 실시형태 188에 있어서, 하나 이상의 표적화 부분은 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 방법.

[0576] 190. 실시형태 184 내지 189 중 어느 하나에 있어서, 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질이 생성되는 방법.

[0577] 191. 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IL2 단백질로 암을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 상기 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이

상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태에 따른 IL2 전구단백질(또는 상기 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0578] 192. 실시형태 191 에 있어서, IL2 전구단백질이 암 조직에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0579] 193. 실시형태 192 에 있어서, IL2 전구단백질이 암 조직에 의해 발현되는 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0580] 194. 실시형태 191 또는 실시형태 192 에 있어서, 하나 이상의 표적화 부분은 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 방법.

[0581] 195. 실시형태 191 내지 194 중 어느 하나에 있어서, 암 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질이 생성되는 방법.

[0582] 196. 활성화된 IL2 단백질을 암 조직에 표적 전달하는 방법으로서, 대상체에게 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태에 따른 IL2 전구단백질(또는 상기 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 IL2 전구단백질은

[0583] (a) 암 조직에 의해 발현되는 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 모이어티을 포함하며; 및

[0584] (b) IL2 요법이 바람직하고/하거나 의도되는 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 방법.

[0585] 197. 실시형태 196에 있어서, 상기 IL2 전구단백질은 상기 암 조직에 의해 발현된 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 모이어티를 포함하는 방법.

[0586] 198. 실시형태 196 또는 실시형태 197 에 있어서, 하나 이상의 표적화 부분은 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 방법.

[0587] 199. 실시형태 196 내지 198 중 어느 하나에 있어서, 암 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질이 생성되는 방법.

[0588] 200. 표적 조직에서 면역 반응을 국소적으로 유도하는 방법으로서, 상기 표적 조직에서 발현되는 표적 분자를 결합할 수 있는 하나 이상의 표적화 모이어티와 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 실시형태 1 내지 165 중 어느 한 실시형태에 따른 IL2 전구단백질(또는 상기 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 각각은 상기 표적 조직에서 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는 방법.

[0589] 201. 실시형태 200에 있어서, IL2 전구단백질이 표적 조직에서 발현된 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0590] 202. 실시형태 200 또는 실시형태 201 에 있어서, 표적 조직이 암 조직인 방법.

[0591] 203. 실시형태 200 내지 202 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 표적화 부분은 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA")에 결합할 수 있는 방법.

[0592] 204. 실시형태 200 내지 203 중 어느 하나에 있어서, 표적 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IL2 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IL2 부분을 포함하는 활성화된 IL2 단백질이 생성되는 방법.

[0593] 205. 실시형태 204에 있어서, IL2 단백질이 표적 조직에서 적어도 하나의 세포 유형에 대해 면역 반응을 유도하는 방법.

[0594] 206. 실시형태 170 내지 205 중 어느 하나에 있어서, 투여가 비국소적인 방법.

[0595] 207. 실시형태 206에 있어서, 투여가 전신인 방법.

[0596] 208. 실시형태 206에 있어서, 투여가 피하인 방법.

[0597] **실시예**

[0598] **1. 실시예 1: IL2 전구단백질의 생산**

[0599] 표적화 부분, Fc 도메인, IL2 및 IL2Rα 부분, 절단성 및/또는 비절단성 링커를 포함하는 IL2 전구단백질을 인코딩하는 작제물을 DNA 단편으로 합성하고 적합한 발현 벡터에 복제 하였다. 작제물의 N 말단에 쥐과 불활성 티로신-단백질 키나제 막관통 수용체 ROR1(mROR1)로부터의 29개 아미노산 신호 서열을 첨가하였다. 모든 IL2 전구단백질은 신호 서열을 포함하는 전단백질로 발현되었다. 성숙 단백질을 제조하도록 세포내 가공에 의해 신호 서열을 절단하였다.

[0600] 작제물은 제조사의 프로토콜에 따라 Expi293F™세포(ThermoFisher)에서 일시적으로 발현되었다. HiTrap™ Protein G HP 또는 MabSelect SuRe pcc 칼럼(Cytiva)을 갖는 ProteinMaker 시스템(Protein BioSolutions, Gaithersburg, MD)을 사용하여 Expi293F 상청액에서의 단백질을 정제하였다. 단일 단계 용출 후, 항체를 중화시키고, 5% 글리세롤이 포함된 인산염 완충 식염수(PBS)의 최종 완충액으로 투석하고, 분취하여 -80℃에서 보관하였다.

[0601] 생성된 작제물에 의해 암호화된 IL2 전구단백질의 개요는 아래 표 1에서 제공된다. 표 1은 각 IL2 전구단백질의 단일 절반 항체를 설명하며, 여기서 각 IL2 전구단백질은 2개의 동일한 절반 항체를 포함한다.

표 12

[0602]

표 1
IL2 전구단백질

#	구조
1	Fab - Fc(IgG4s)-3xG4S-hIL2-4XG4S-hIL2Rα(22-186)
2	Fab - Fc(IgG4s)-3XG4S-hIL2-PCL(34aa)-hIL2Rα(22-186)
3	Fab - Fc(IgG4s)-3xG4S-hIL2-2XG4S-hIL2Rα(22-186)
4	Fab - Fc(IgG4s)-3xG4S-hIL2-3XG4S-hIL2Rα(22-186)
5	Fab - Fc(IgG4s)-4xG4S-hIL2-3XG4S-hIL2Rα(22-186)
6	Fab - Fc(IgG4s)-5xG4S-hIL2-3XG4S-hIL2Rα(22-186)
7	Fab - Fc(IgG4s)-5xG4S-hIL2-5XG4S-hIL2Rα(22-186)
8	Fab - Fc(IgG4s)-1xG4S-hIL2-1XG4S-hIL2Rα(22-186)
9	Fab - Fc(IgG4s)-1xG4S-hIL2-2XG4S-hIL2Rα(22-186)
10	Fab - Fc(IgG4s)-1xG4S-hIL2-3XG4S-hIL2Rα(22-186)
11	Fab - Fc(IgG4s)-2xG4S-hIL2-2XG4S-hIL2Rα(22-186)
12	Fab - Fc(IgG4s)-PCL(15AA)-hIL2-PCL(21AA)-hIL2Rα(22-186)
13	Fab - Fc(IgG4s)-PCL(15AA)-hIL2-PCL(15AA)-hIL2Rα(22-186)
14	Fab - Fc(IgG4s)-3xG4S-hIL2-PCL(15AA)-hIL2Rα(22-186)
15	Fab - Fc(IgG4s)-3xG4S-hIL2-PCL(20AA)-hIL2Rα(22-186)
16	Fab - Fc(IgG4s)-2xG4S-hIL2-PCL(15AA)-hIL2Rα(22-186)
17	Fab - Fc(IgG4s)-1xG4S-hIL2-PCL(15AA)-hIL2Rα(22-186)
18	Fab - Fc(IgG4s)-PCL(15AA)-hIL2-PCL(15AA)-hIL2Rα(22-186)
19	Fab - Fc(IgG4s)-PCL(15AA)-hIL2-PCL(15AA)-hIL2Rα(22-186)
20	Fab - Fc(IgG4s)-PCL(15AA)-hIL2-PCL(15AA)-hIL2Rα(22-186)
21	Fab - Fc(IgG4s)-PCL(8AA)-hIL2-PCL (8AA)-hIL2Rα(22-186)
22	Fab - Fc(IgG4s)-PCL(15AA)-hIL2-PCL(20AA)-hIL2Rα(22-186)

[0603] **2. 실시예 2: EGFR 표적화된 IL2 전구단백질의 항종양 활성**

[0604] EGFR 표적화된 IL2 전구단백질의 항종양 활성은 MC38 종양 모델에서 평가 되었다. 간단히 말해서, 7×10^5 MC38 종양 세포를 0일차에 인간화된 EGFR 단백질을 발현하는 8-10주령 암컷 마우스의 오른쪽 뒷 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 접종된 마우스는 평균 종양 크기가 90㎜^{3}에 도달한 9일차에 치료 그룹으로 무작위로 배정되었다. 각 무작위 그룹의 마우스는 9일차 및 12일차에 총 2회의 복강내 주사를 맞았다. 종양 크기는 디지털 캘리퍼를

사용하여 주 2회 측정했으며 종양 크기는 길이x너비^2/2로 계산하였다. 각 치료 그룹에서 종양 이식후 평균 종양 부피(mm^3 -/+ SEM)는 도 3a에 나와 있다. 각 치료 그룹의 개별 종양 성장 곡선은 도 3b 내지 도 3e에 나와 있습니다.

[0605] 각 치료 그룹의 종양 성장 곡선을 평균화 했을 때, 절단성 링커가 있는 EGFR 표적화된 IL2 전구단백질 작제물은 비절단성 링커가 있는 표적화된 IL2 전구단백질 작제물과 절단성 링커가 있는 비표적화된 IL2 전구단백질 모두 및 동종형 대조군에 비해 종양 성장을 더 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.(도 3a; 화살표는 치료일을 나타낸다. 각 치료 그룹의 개별 종양 성장 곡선은 도 3b 내지 도 3e에 도시되어있다. 전반적으로, 이러한 결과는 TAA 표적화 및 절단성 링커 모두가 EGFR 표적화된 IL2 전구단백질 작제물의 *생체내* 항종양 효능을 크게 향상시켰음을 시사한다.

[0606] **3. 실시예 3: PD1-표적화된 IL2 전구단백질의 항종양 활성**

[0607] PD1 표적화된 IL2 전구 단백질의 항종양 활성은 MC38 종양 모델에서 평가 되었다. 0일차에, 3 x 10^5개의MC38 종양 세포(ACL8874)를 인간화 PD1을 발현하는 8~10주령 암컷 마우스의 오른쪽 뒷옆구리에 피하 이식하였다. 종양 접종된 마우스는 평균 종양 크기가 $90mm^3$에 도달한 9일차에 치료 그룹으로 무작위로 배정되었다. 각 무작위 그룹의 마우스는 9일차 및 12일차에 할당된 전구단백질 1.5mg/kg 총 2회 복강내 주사로 투여받았다. 종양 크기는 디지털 캘리퍼를 사용하여 주 2회 측정했으며 종양 크기는 길이x너비^2/2로 계산하였다. 각 치료 그룹의 평균 종양 부피(mm^3 -/+ SEM)를 투여 후 그래프로 표시했다(도 4a).

[0608] 각 치료 그룹의 종양 성장 곡선을 평균화했을 때, 절단성 링커가 있는 PD1 표적화된 IL2 전구단백질 작제물로 치료한 종양 접종 마우스는 종양 성장이 감소한 반면, 절단성 링커가 있는 비표적화된 IL2 전구단백질 또는 동종형 대조군으로 치료한 마우스는 종양 성장 억제가 나타나지 않았다(도 4a). 각 치료 그룹의 개별적인 종양 성장 곡선은 동종형으로 치료한 마우스 중 어느 것도 종양 억제를 나타내지 않았음을 나타냈다(도 4b). 유사하게, 비표적화된 IL2 전구단백질로 치료한 마우스 중 어느 것도 종양 억제를 나타내지 않았다(도 4c). 그러나 PD1-표적화된 IL2 전구단백질로 치료한 5마리의 마우스 중 4마리는 평가 기간 동안 종양이 없었다(도 4d).

[0609] 동종형 대조군 또는 비표적화된 IL2 전구단백질과 비교했을때, 절단성 링커가 있는 PD1 표적화된 IL2 전구단백질은 종양이 완전히 퇴행한 치료된 마우스에서 더 높은 빈도로 강력한 종양 성장 억제를 나타냈으며, 이는 TCA 표적화가 절단성 링커가 있는 PD1 표적화된 IL2 전구단백질의 *생체내* 항종양 효능을 향상시켰음을 입증한다.

[0610] **4. 실시예 4: 절단성 링커를 포함하는 IL2 전구 단백질의 절단성 평가**

[0611] IL2 전구단백질의 프로테아제-절단성 링커가 재조합 프로테아제에 의한 소화에 접근 가능한지 평가하기 위해 mAb-PCL(15AA)-IL2-PCL(15AA)-IL2Rα 및 mAb-PCL(15AA)-IL2-PCL(20AA)-IL2Rα 두 가지 작제물을 선택하고 재조합 인간 프로테아제를 사용하여 소화되도록 하였다. 간단히 말해서, 각 작제물은 제조사의 프로토콜에 따라 분석 완충액에서 200 ng의 uPA(R&D Cat # 1310-SE)와 함께 37℃에서 24시간 동안 배양되었다. 소화 되지 않은 대조군은 프로테아제를 첨가하지 않고 동일한 기간 동안 동일한 조건에서 배양하였다. 소화 후, 환원제를 포함한 SDS 샘플 로딩 완충액을 각 샘플에 첨가하였다. 다음으로 샘플을 끓여서 SDS PAGE용 인비트로젠 4-20% 트리스-글리신 겔에서 실행하였다. 그 후 iBLot 2 건식 전이 방법을 사용하여 단백질을 PVDF 막으로 옮겼다. 그 후 막을 비오티닐화된 항-hIL2(R&D Cat # BAF202)로 조사한 다음 스트렙타비딘-HRP로 검출하였다(Cytiva(Cat # RPN1231)).

[0612] uPA를 사용한 IL2 전구단백질의 프로테아제 소화는 두 IL2 전구단백질 모두에서 유리 IL2의 방출을 가져왔지만, IL2와 IL2Rα 도메인 사이에 20AA 링커를 포함하는 IL2 전구단백질 작제물은 IL2와 IL2Rα 사이에 15AA 링커를 포함하는 작제물에 비해 더 완전한 링커 소화 및 IL2 방출을 나타냈다.(도 5a 및 도 5b). 이러한 관찰은 프로테아제 소화 정도가 프로테아제-절단성 링커의 길이에 달려 있음을 시사한다.

[0613] **5. 실시예5: 종양 표적화된 IL2 전구단백질의 *시험관내* 활성**

[0614] 프로테아제-절단성 또는 비-절단성 링커를 포함하는 프로테아제-소화 및 비소화 IL2 전구단백질의 *시험관 내* 활성은 섹션 9.5.1.2에 기술된 바와 같이 루시퍼라제 리포터 검정을 통해 평가되었으며 섹션 9.5.1.1에 기술된대로 생성된 조작된 리포터 세포주 중 하나를 사용하였다.

[0615] **5.1. 방법**

[0616] 5.1.1. YT/STAT5-Luc 리포터 세포의 조작

[0617] 인간 T/NK 유사 백혈병 YT 세포주를 신호 변환기 및 전사 활성화인자 5(STAT5) 구동 루시퍼라제 리포터 작제물로 전기천공하고 2mM L-글루타민/페니실린/스트렙토마이신 + 20% 소 태아 혈청(FBS) + 200 μg/ml 히그로마이신이 보충된 Iscove의 변형 Dulbecco 배지에서 유지하였다. IL2에 대한 높은 반응성을 갖는 단일 세포 클론을 식별하여 YT/STAT5-Luc c1.4로 이름을 변경하였다. 이 클론에서 CRISPR-Cas9 기술을 사용하여 IL2Rα(CD25)를 녹아웃하였으며, 간단히 CD25 KO라고 하는 생성된 세포주 YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO는 유세포 분석으로 검증되었다.

[0618] 그 후 인간 IL2Rα를 CD25 KO 세포주(수탁 번호 NP_000408.1의 아미노산 M1-I272)에 안정적으로 재도입하고 생성된 세포주 CD25 OE를 유세포 분석으로 검증하고 2 mM L-글루타민/페니실린/스트렙토마이신 + 20% FBS + 200 μg/ml 히그로마이신 + 15 μg/mL 블라스티시딘이 보충된 Iscove의 변형 Dulbecco 배지에서 유지하였다.

[0619] YT 세포는 내인성으로 PD1을 발현하므로, CD25 KO 및 CD25 OE 세포는 CRISPR/Cas9 기술을 사용하여 PD1 발현을 녹아웃하도록 조작되었으며, 생성된 세포주인 CD25 KO/PD1 KO 및 CD25 OE/PD1 KO는 유세포 분석을 통해 검증되었다.

[0620] 5.1.2. 루시퍼라제 리포터 분석

[0621] 스크리닝 하루 전에 조작된 YT/STAT5-Luc 리포터 세포인 CD25 KO/PD1 KO 및 CD25 OE/PD1 KO를 2mM L-글루타민/페니실린/스트렙토마이신 + 10% FBS이 보충된 RPMI1640 배지에 3 x 10^5세포/mL로 희석하였다.

[0622] IL2 전구단백질은 재조합 인간 uPA(R&D Cat # 1310-SE) 유무에 관계없이 소화 완충액(50mM Tris, 0.01%(v/v) Tween® 20, pH 8.5)에서 밤새 소화되었다. 융합 단백질 200 nM당 20 nM의 효소를 첨가하고 소화시킨 후 생물학적 분석을 위해 분석 배지(2 mM L-글루타민/페니실린/스트렙토마이신 + 10% FBS가 보충된 RPMI1640 배지)로 희석한후 소화시켰다.

[0623] 분석 당일, 세포를 원심분리하고 분석 배지에 재현탁하고 96웰 흰색 편평 바닥 플레이트에 2.5 x 10^4리포터 세포/웰로 플레이팅하고 재조합 IL2, uPA-소화 IL2 전구단백질 또는 소화되지 않은 IL2 전구단백질과 함께 배양하였다. 각 작제물은 11포인트 적정 범위(50 nM 내지 5.12 fM) 및 단백질이 포함되지 않은 12번째 포인트에 걸쳐 연속적으로 희석(1:5)되었다. 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 4시간 30분 동안 배양한 후, 100 μL ONE-Glo™ (Promega) 시약을 웰에 첨가하여 세포를 용해하고 루시퍼라제 활성을 검출하였다. 방출된 빛은 Envision 다중 라벨 플레이트 판독기(PerkinElmer)에서 RLU로 측정되었다.

[0624] 5.2. 결과

[0625] 다양한 종양 표적화 부분(*예*: 항-CA9, 항-EGFR 또는 항-PD1 Fab 부분)을 포함하는 IL2 전구단백질은 먼저 CD25 KO/PD1 KO 세포를 사용하여 평가되었다. 테스트된 모든 작제물에서 각 프로테아제-절단성 링커(PCL)의 길이는 15개 아미노산이다.

[0626] uPA-소화 IL2 전구단백질은 각 경우에서 표적화 부분에 관계없이 재조합 IL2와 관련된 활성과 유사한 리포터 활성을 나타냈다(도 6a 내지 도 6f). 비소화 IL2 전구단백질은 루시퍼라제 활성이 거의 또는 전혀 나타나지 않았다.(도 6a 내지 도 6f). 유사하게, 비절단성 링커를 갖는 IL2 전구단백질은 루시퍼라제 활성을 나타내지 않았다(도 6a 내지 도 6d).

[0627] 다음으로, CD25 OE/PD1 KO 세포를 사용하여 동일한 IL2 전구단백질을 평가하였다. 이 평가에서, 모든 작제물은 검출가능한 루시퍼라제 활성과 연관되어 있다(도 7a 내지 도 7f). 그러나, 프로테아제-절단성 링커를 포함하는 재조합 IL2 및 uPA-소화 IL2 전구단백질은 상대적으로 높고 비슷한 효능을 나타냈는데, 이는 비소화 IL2 전구단백질 또는 비절단성 링커를 포함하는 작제물에서 관찰된 효능보다 훨씬 더 높았다(도 7a 내지 도 7f).

[0628] 종합적으로, 이러한 결과는 IL2 전구단백질이 프로테아제 소화 시 IL2 부분이 방출되지 않는 한 최소한의 활성을 나타냄을 시사한다. 나아가, IL2 전구단백질로부터 방출된 IL2는 재조합 IL2만큼 강력하였다.

[0629] 6. 실시예 6: IL2 전구단백질 활성에 대한 링커 길이의 영향

[0630] 치료 관련 부작용을 줄이려면 IL2 전구단백질이 표적 조직에 도달할 때까지 활성을 최소화하는 것이 중요하다. IL2 전구단백질 활성을 약화시키는 링커 길이의 역할은 조작된 YT/STAT5-Luc 리포터 세포를 사용한 루시퍼라제 리포터 검정으로 평가되었다.

[0631] 2mM L-글루타민/페니실린/스트렙토마이신 + 10% 소 태아 혈청(FBS)이 보충된 RPMI1640 배지를 분석 배지로 사용하여 세포 현탁액 및 단백질 희석액을 준비하였다. 스크리닝 하루 전에 조작된 YT/STAT5-Luc 리포터 세포(CD25 KO/PD1 KO, CD25 KO/PD1 OE, CD25 OE/PD1 OE 및 CD25 OE/PD1 KO)를 3 x 10^5 세포/mL로 희석하였다. 분석 당일, 세포를 원심분리 하고, 분석 배지에 재현탁시키고, 96웰 흰색 편평 바닥 플레이트에 웰당 2.5 x 10^4리포터 세포/웰로 플레이팅하고, 길이가 다른 비절단성 링커가 있는 재조합 IL2 또는 PD1 표적화된 IL2 전구단백질과 함께 배양하였다. 작제물은 11포인트 적정 범위(50 nM 내지 5.12 fM) 및 단백질이 포함되지 않은 12번째 포인트에 걸쳐 연속적으로 희석(1:5)되었다. 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 4시간 30분 동안 배양한 다음, 100 mL ONE-Glo™ (Promega) 시약을 웰에 첨가하여 세포를 용해하고 루시퍼라제 활성을 검출하였다. 방출된 빛은 Envision 다중 라벨 플레이트 판독기(PerkinElmer)에서 RLU로 측정되었다.

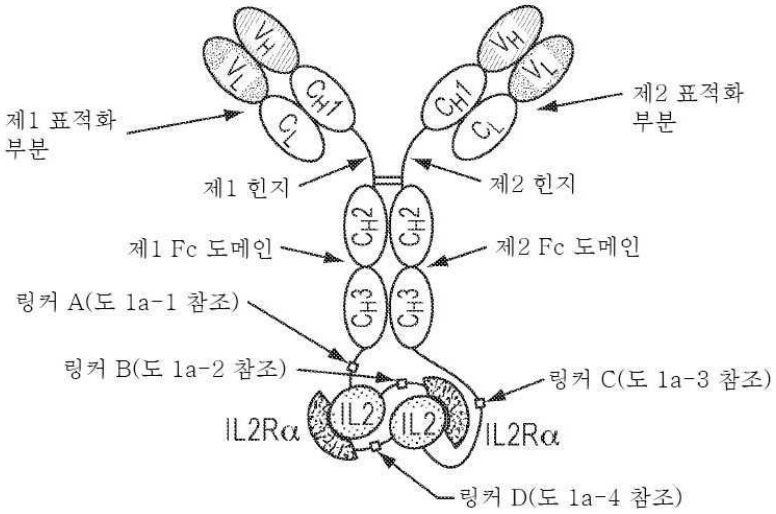
[0632] 일반적으로, 보다 긴 링커 길이를 갖는 IL2 전구단백질은 보다 짧은 링커를 갖는 대응물보다 더 큰 루시퍼라제 활성을 나타냈다(도 8a 내지 도 8d). 이러한 링커 길이 의존적 활성 감쇠는 PD1 OE/CD25 KO 세포에서 가장 두드러졌다(도 8a).

[0633] **참고문헌 인용**

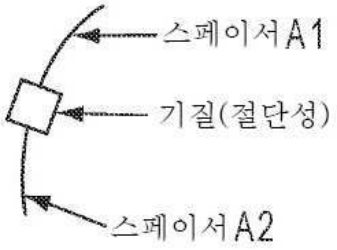
[0634] 본 출원에서 인용된 모든 공개, 특허, 특허 출원 및 기타 문서는 각각의 개별 공개, 특허, 특허 출원 또는 기타 문서가 모든 목적상 참조로 포함되는 것으로 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적상 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 본원에 포함된 참고문헌 중 하나 이상의 교시내용과 본 개시내용 사이의 불일치가 있는 경우에는, 본 명세서가 의도된다.

도면

도면1

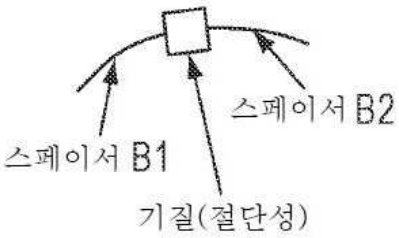


도면1aa



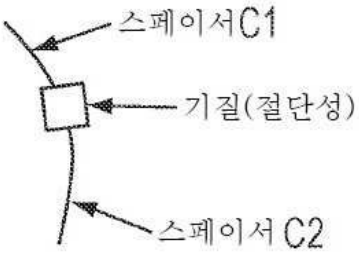
(링커 A)

도면1ab



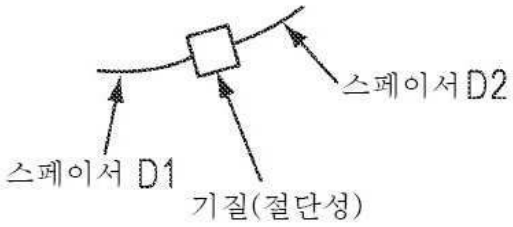
(링커 B)

도면1ac



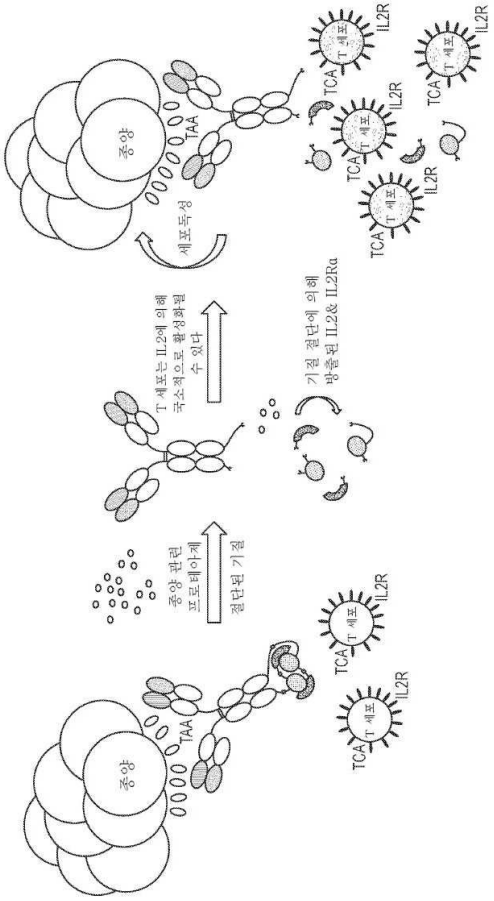
(링커 C)

도면1ad

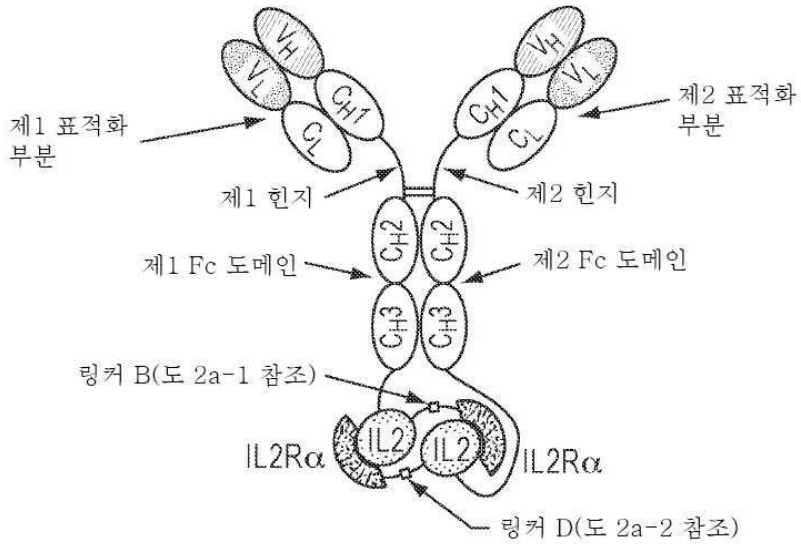


(링커 D)

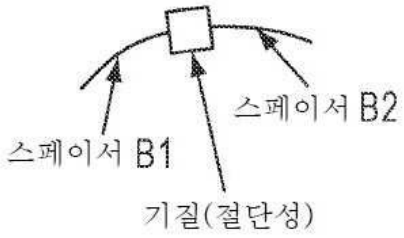
도면1b



도면2a



도면2aa



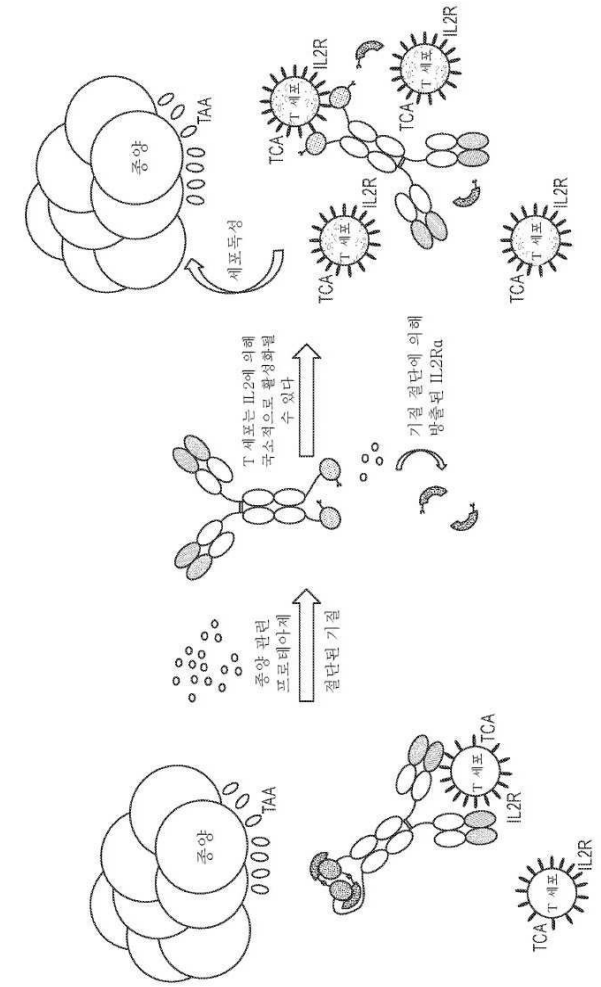
(링커 B)

도면2ab

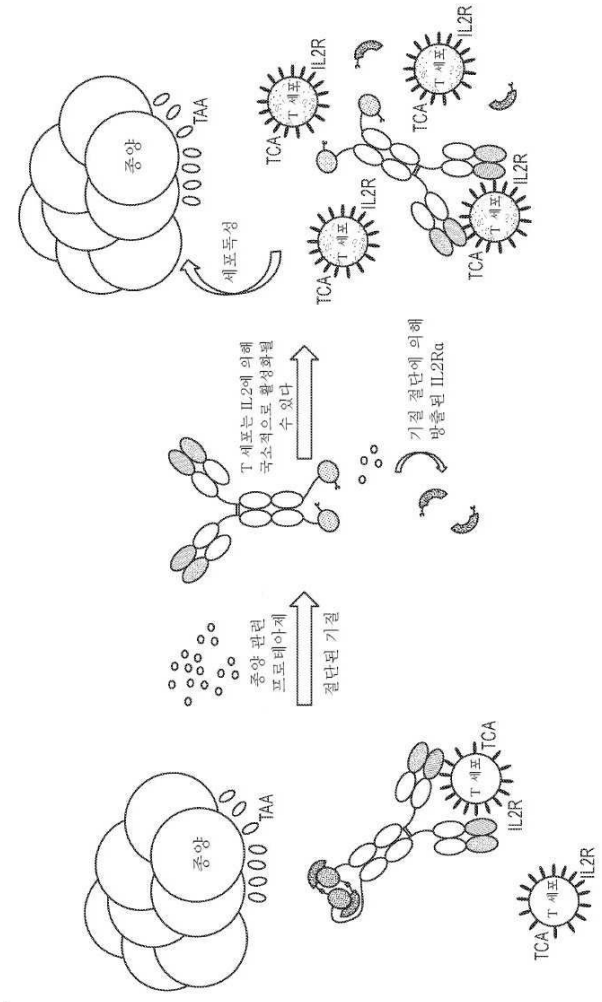


(링커 D)

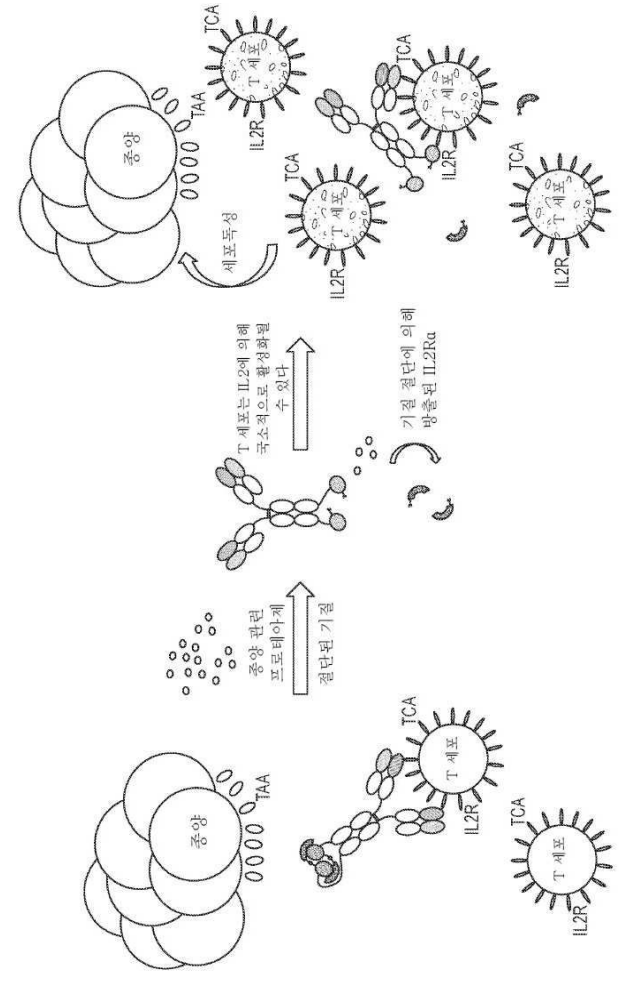
도면2b


종양
TAA
세포독성
TCA
T 세포
IL2R
T 세포는 IL2에 의해
국소적으로 활성화될
수 있다
종양 관련
프로테아제
절단된 기질
기질 절단에 의해
방출된 IL2Rα

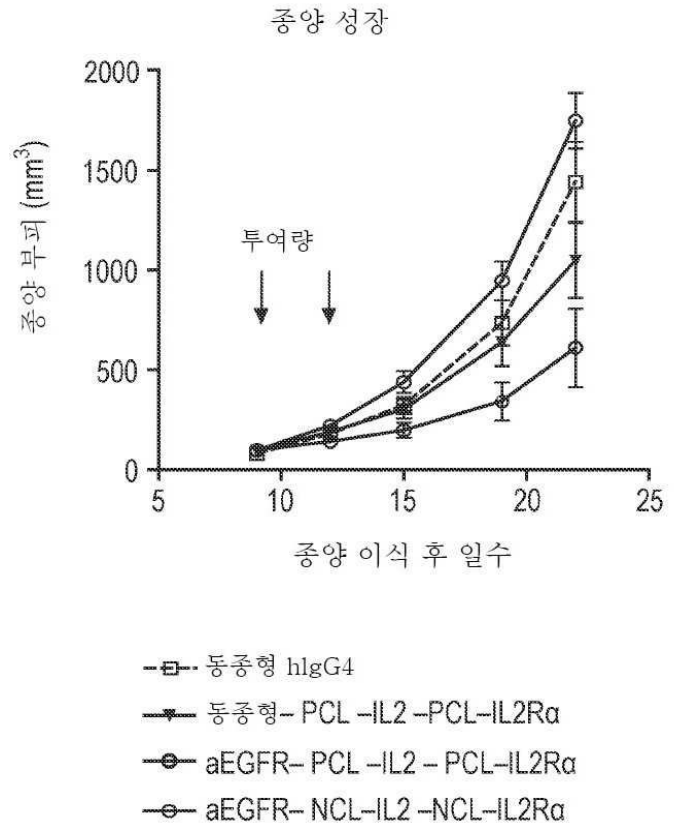
도면2c


종양
TAA
세포독성
TCA
T 세포
IL2R
T 세포는 IL2에 의해
국소적으로 활성화될
수 있다
종양 관련
프로테아제
절단된 기질
기질 절단에 의해
방출된 IL2Rα

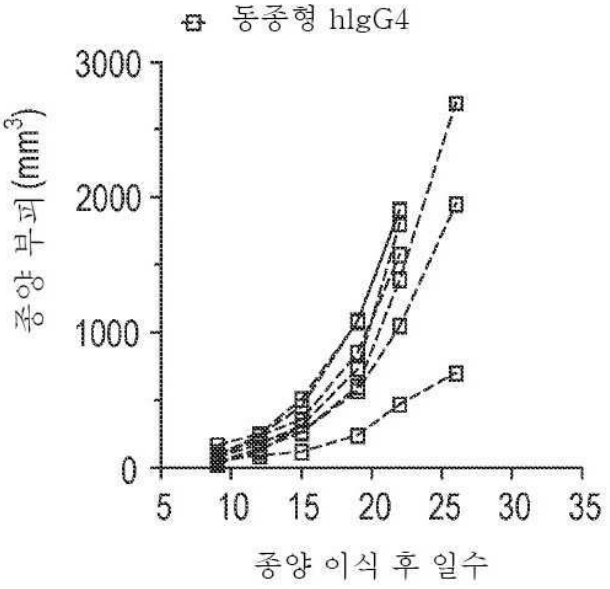
도면2d


종양
TAA
TCA
T 세포
IL2R
세포독성
종양 관련
프로테아제
절단된 기질
T 세포는 IL2에 의해
국소적으로 활성화될
수 있다
기질 절단에 의해
방출된 IL2Rα

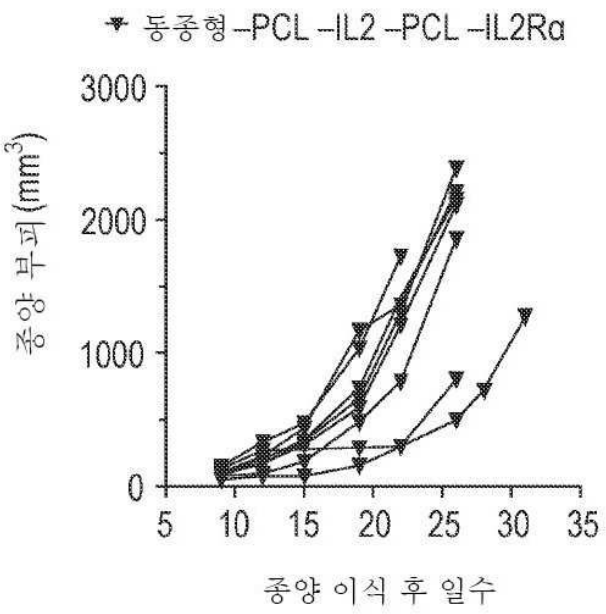
도면3a


종양 성장
종양 부피 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
투여량
5
10
15
20
25
종양 이식 후 일수
동종형 hIgG4
동종형- PCL -IL2 -PCL-IL2Rα
aEGFR- PCL -IL2 - PCL-IL2Rα
aEGFR- NCL-IL2 -NCL-IL2Rα

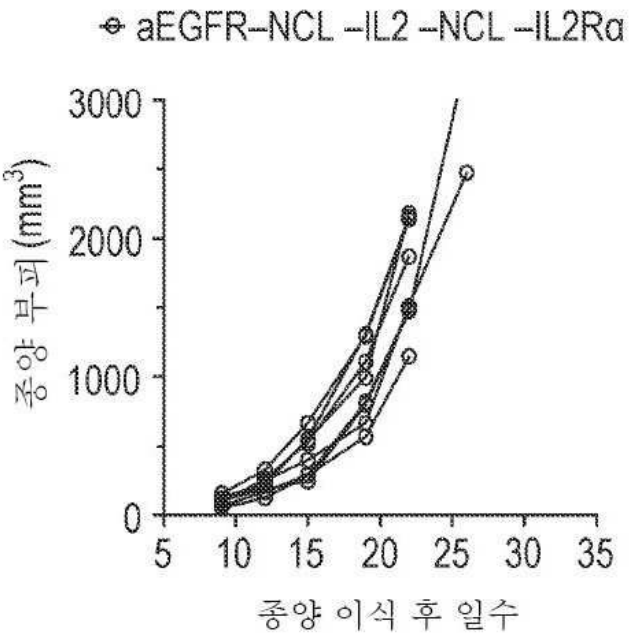
도면3b


동종형 hIgG4
종양 부피 (mm3)
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
종양 이식 후 일수

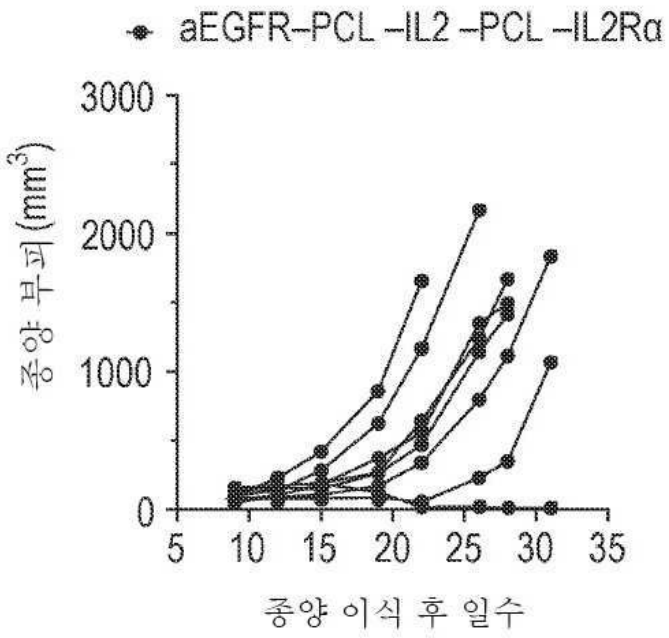
도면3c


동종형-PCL-IL2-PCL-IL2Rα
종양 부피 (mm3)
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
종양 이식 후 일수

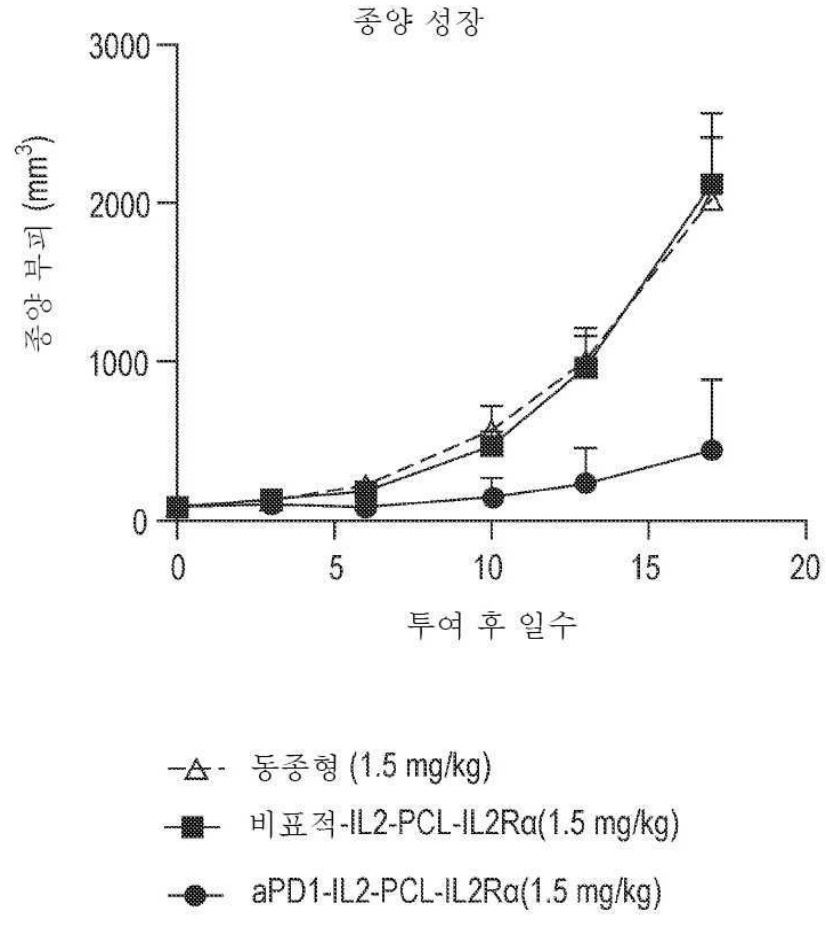
도면3d


aEGFR-NCL-IL2-NCL-IL2Rα
종양 부피 (mm3)
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
종양 이식 후 일수

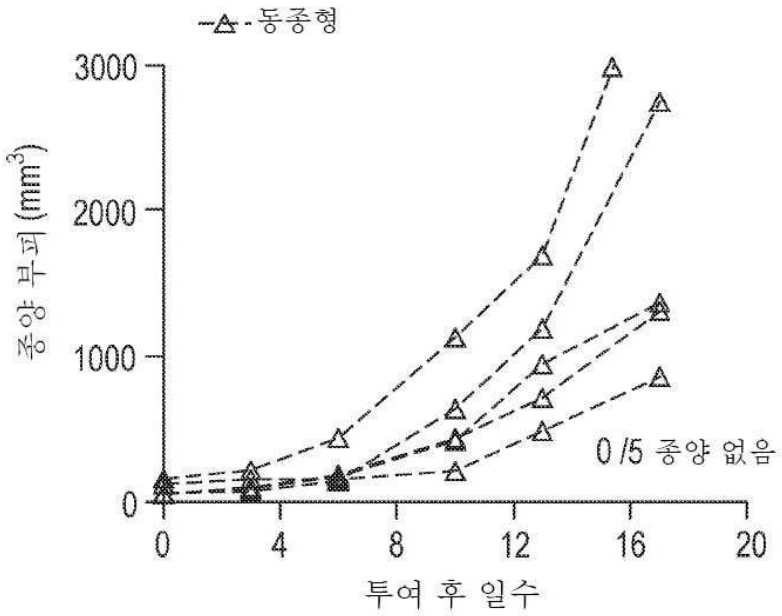
도면3e


aEGFR-PCL-IL2-PCL-IL2Rα
종양 부피 (mm3)
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
종양 이식 후 일수

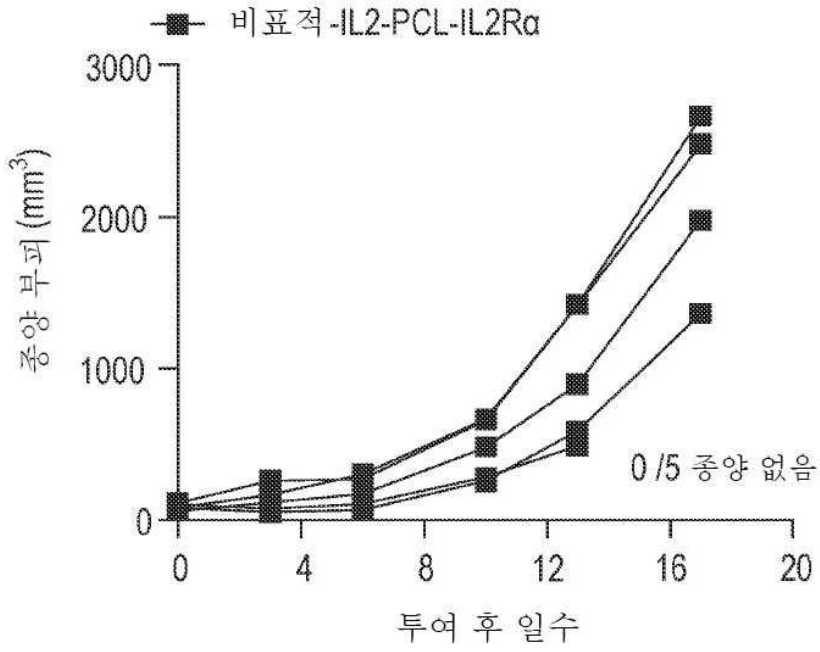
도면4a


종양 성장
종양 부피 (mm3)
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
투여 후 일수
동종형 (1.5 mg/kg)
비표적-IL2-PCL-IL2Rα(1.5 mg/kg)
aPD1-IL2-PCL-IL2Rα(1.5 mg/kg)

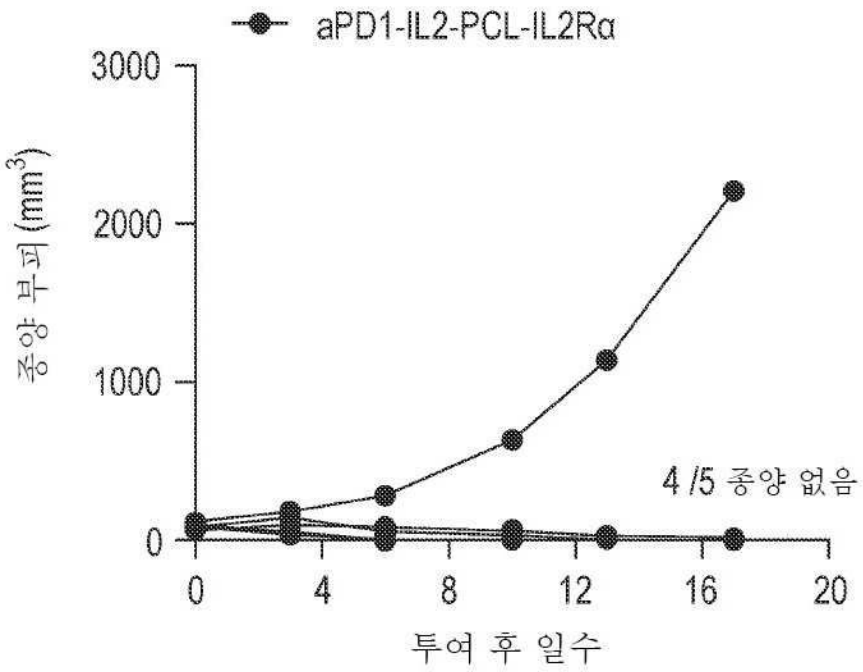
도면4b


동종형
3000
2000
1000
0
종양 부피 (mm3)
0 /5 종양 없음
0
4
8
12
16
20
투여 후 일수

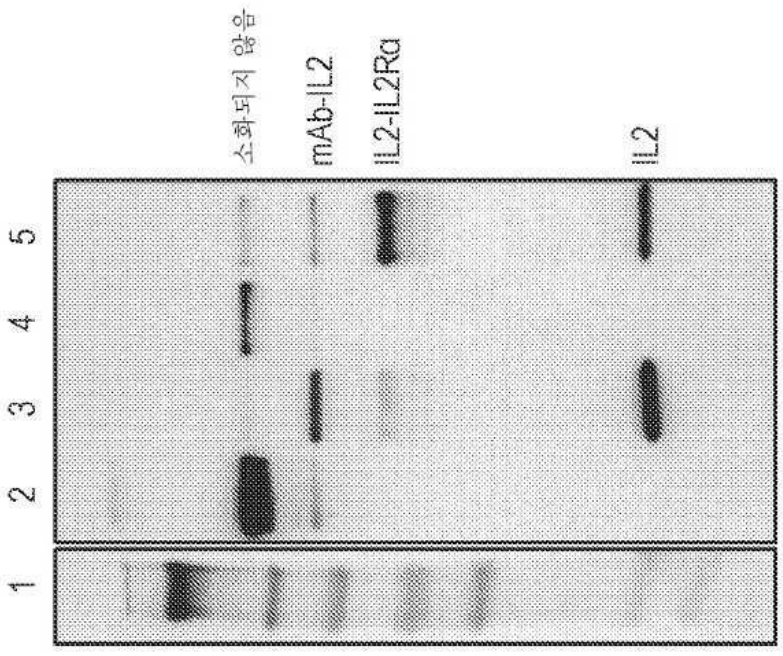
도면4c


비표적-IL2-PCL-IL2Rα
3000
2000
1000
0
종양 부피 (mm3)
0 /5 종양 없음
0
4
8
12
16
20
투여 후 일수

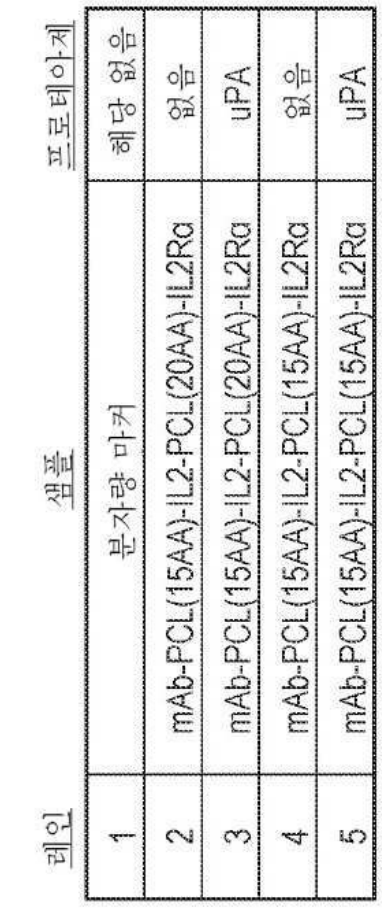
도면4d


aPD1-IL2-PCL-IL2Rα
종양 부피 (mm3)
3000
2000
1000
0
0
4
8
12
16
20
4 /5 종양 없음
투여 후 일수

도면5a

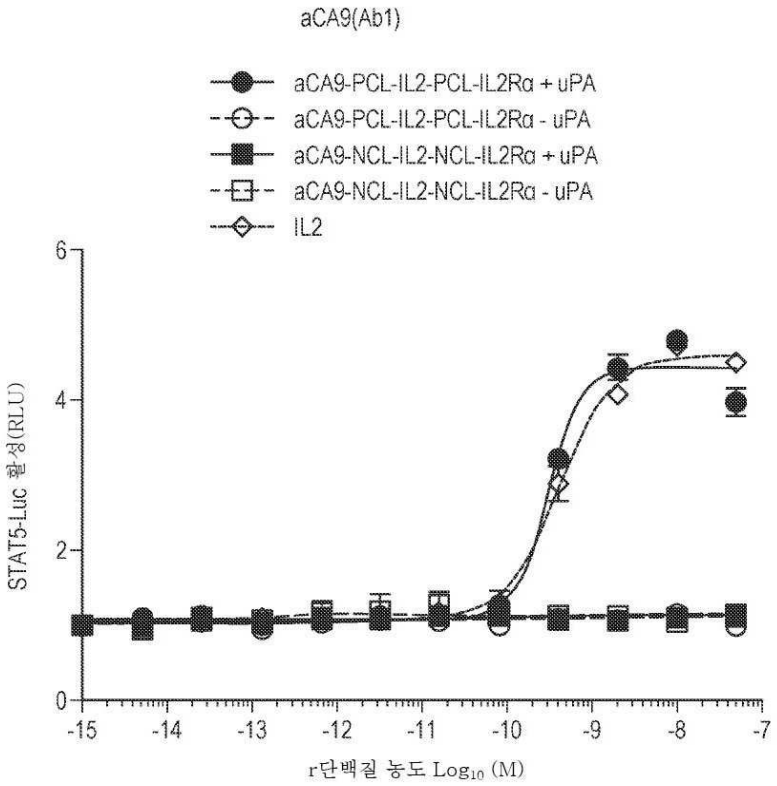

소화되지 않음
mAb-IL2
IL2-IL2Rα
IL2
5
4
3
2
1

도면5b

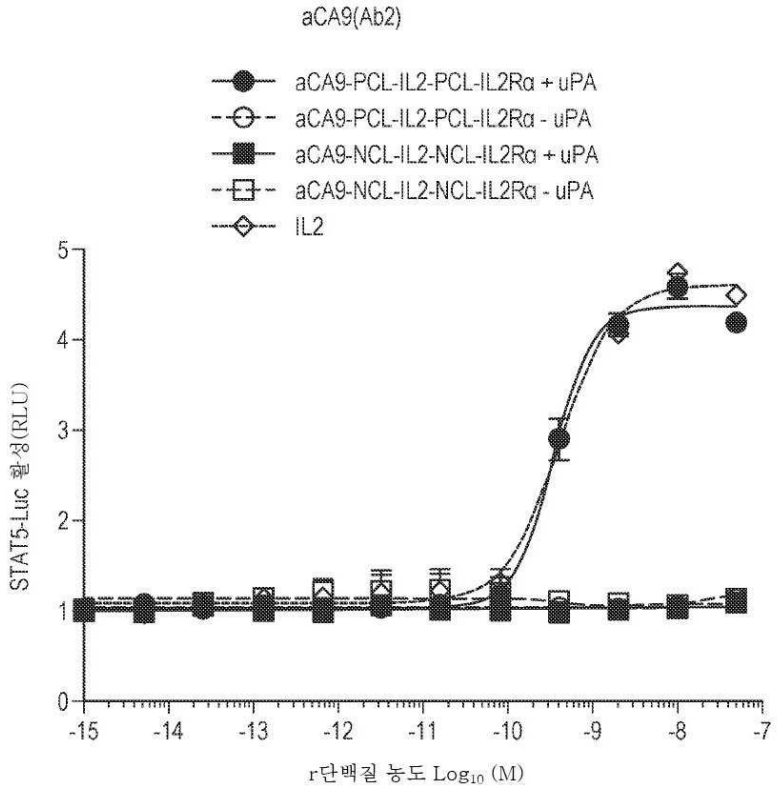


레인	샘플	프로테아제
	분자량 마커	해당 없음
2	mAb-PCL(15AA)-IL2-PCL(20AA)-IL2Rα	없음
3	mAb-PCL(15AA)-IL2-PCL(20AA)-IL2Rα	uPA
4	mAb-PCL(15AA)-IL2-PCL(15AA)-IL2Rα	없음
5	mAb-PCL(15AA)-IL2-PCL(15AA)-IL2Rα	uPA

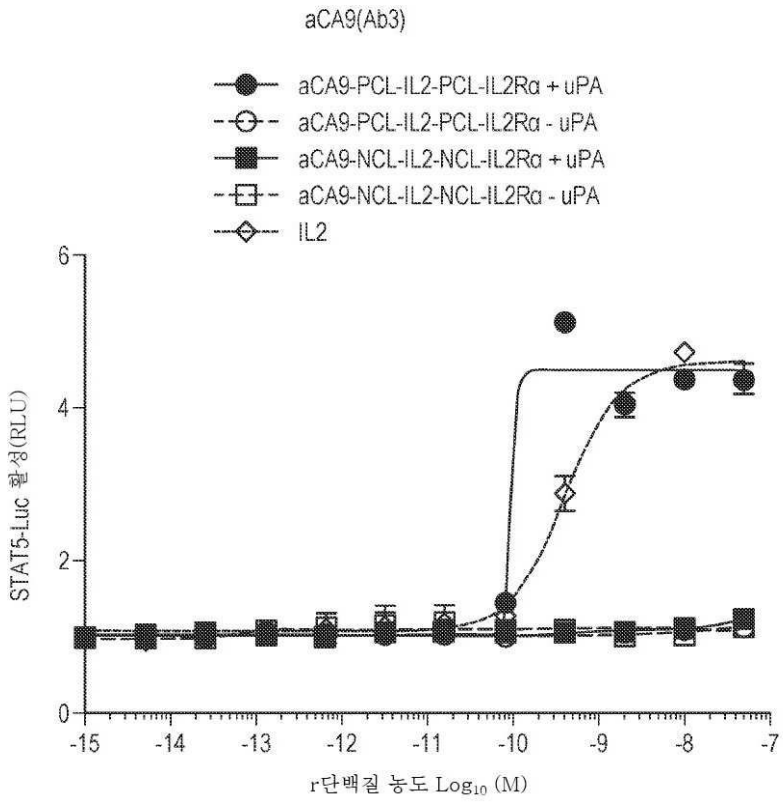
도면6a


aCA9(Ab1)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

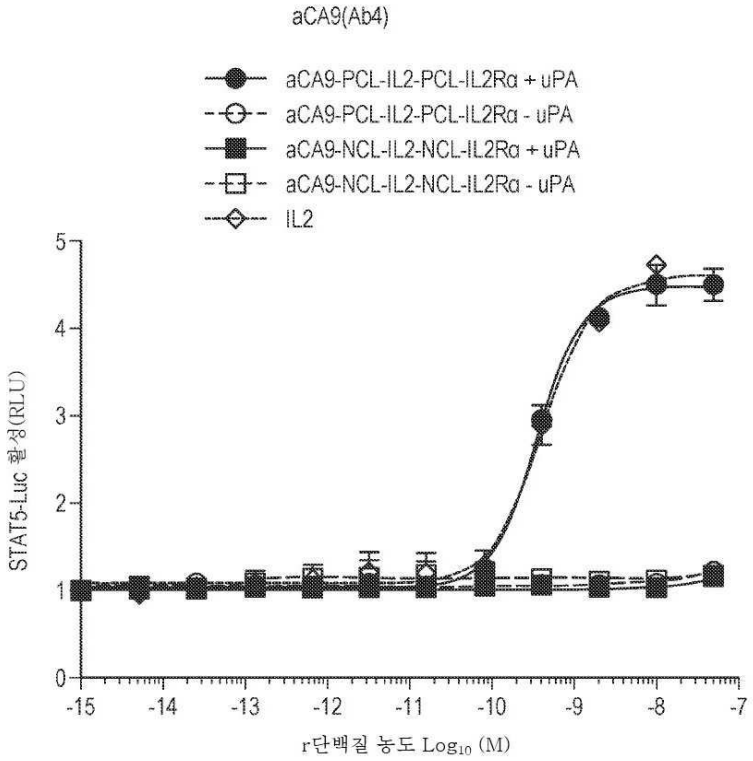
도면6b


aCA9(Ab2)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
1
2
3
4
5
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

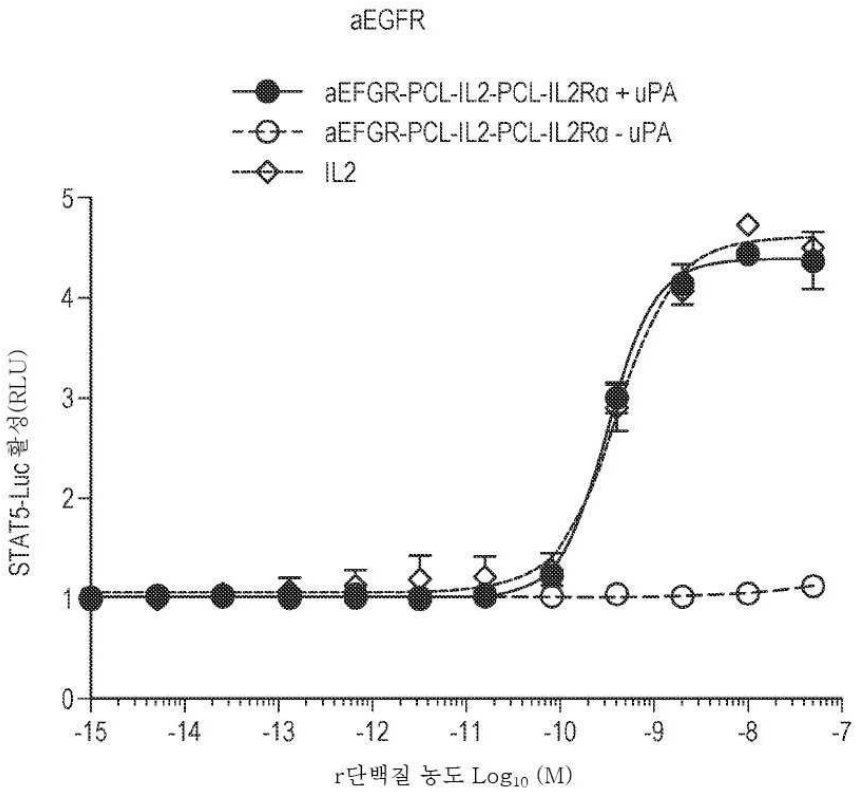
도면6c


aCA9(Ab3)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

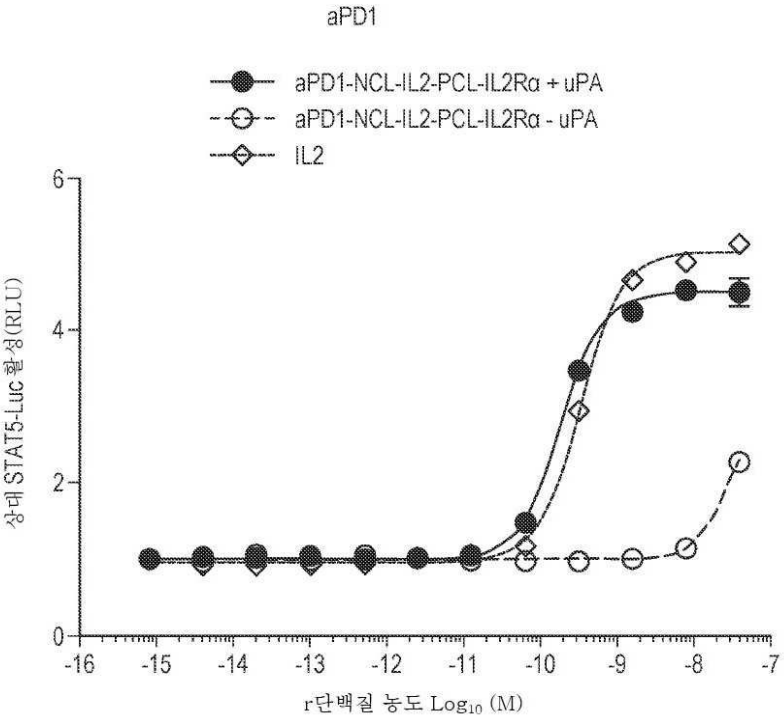
도면6d


aCA9(Ab4)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
1
2
3
4
5
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

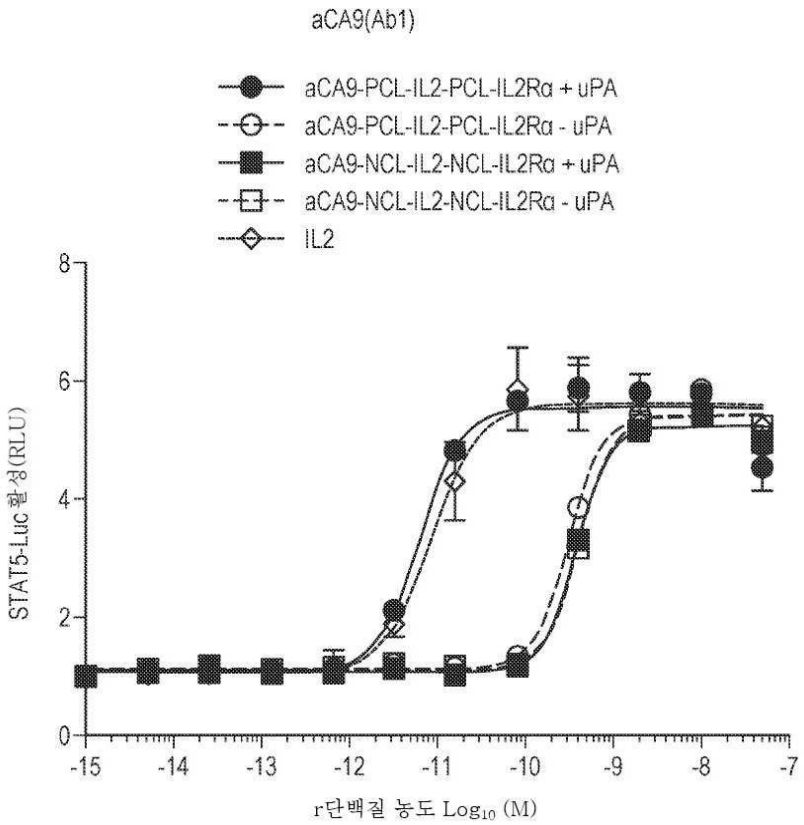
도면6e


aEGFR
aEFGR-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aEFGR-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
1
2
3
4
5
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

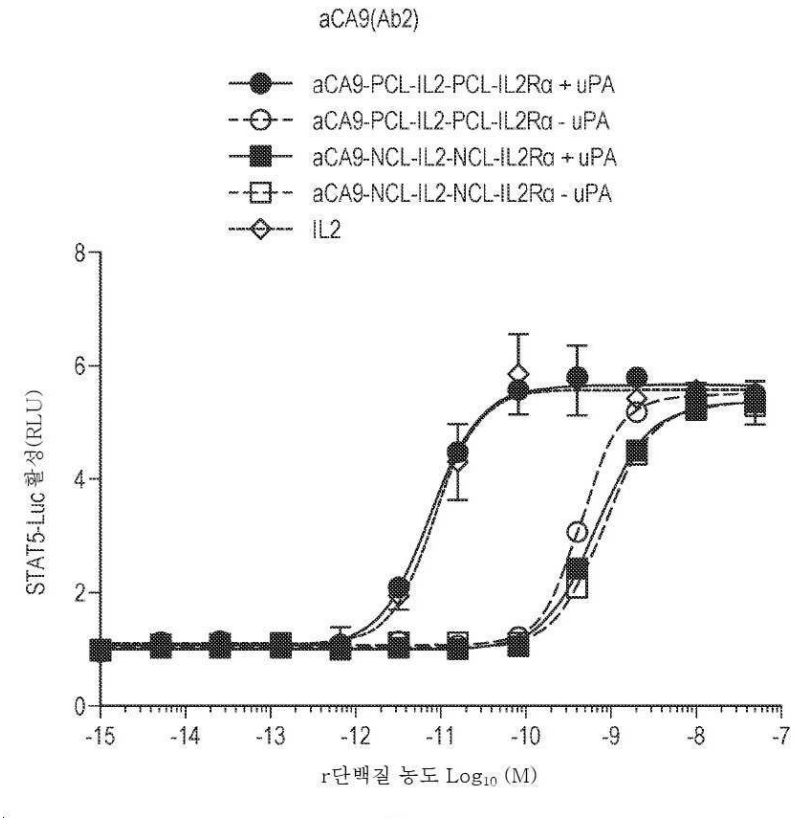
도면6f


aPD1
aPD1-NCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aPD1-NCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
IL2
상대 STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
-16
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

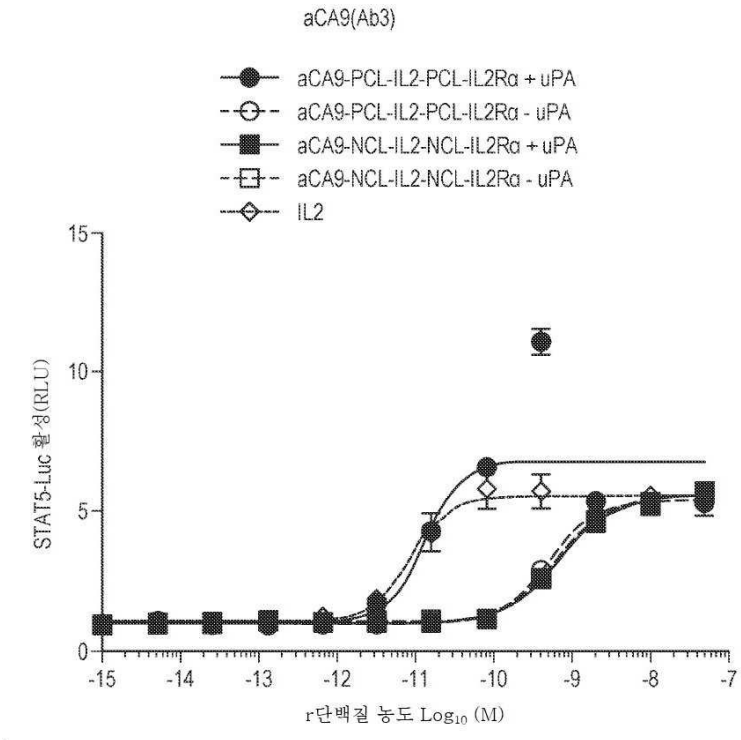
도면7a


aCA9(Ab1)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
8
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

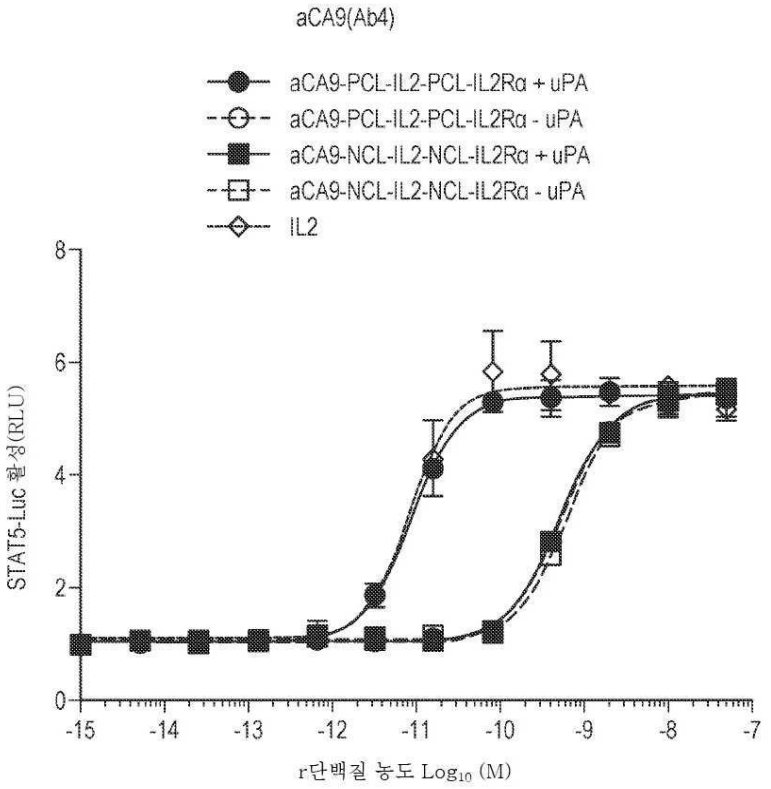
도면7b


aCA9(Ab2)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
r단백질 농도 Log10 (M)

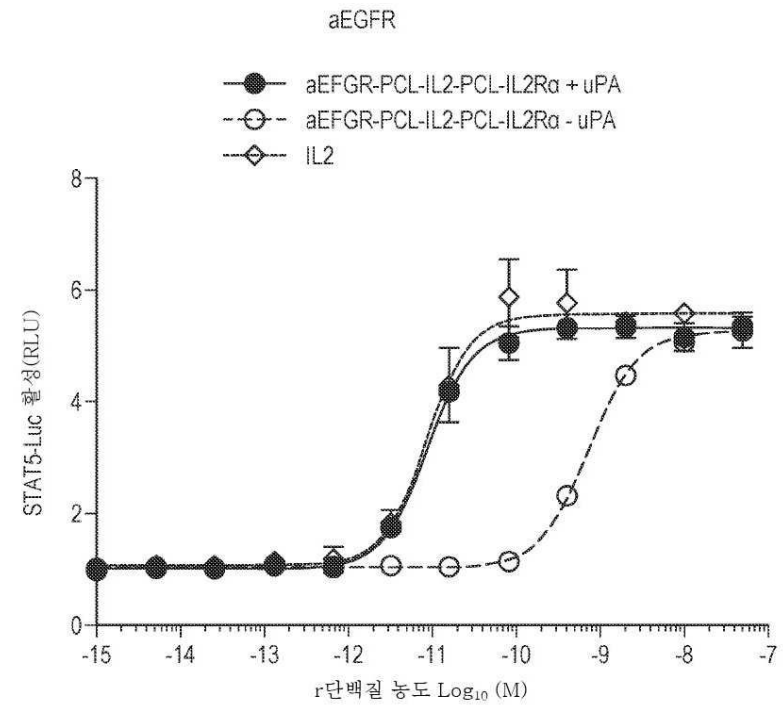
도면7c


aCA9(Ab3)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
r단백질 농도 Log10 (M)

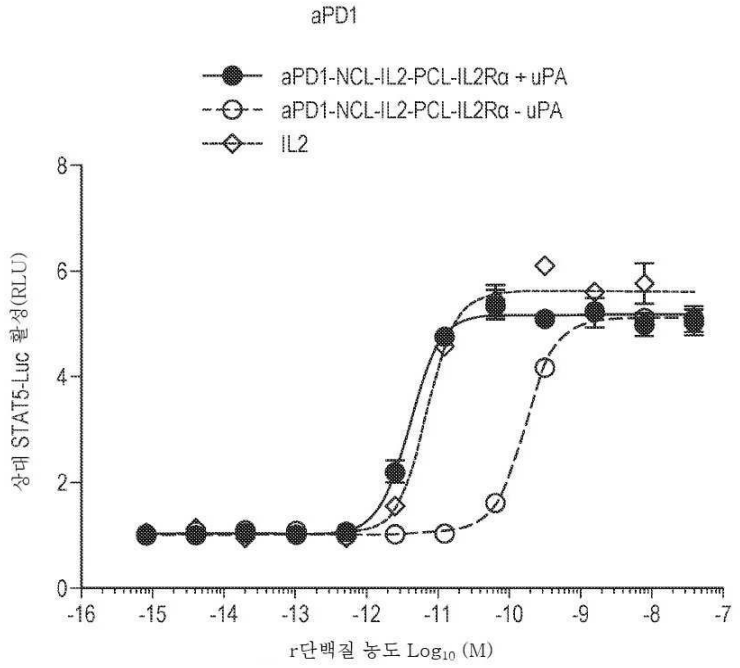
도면7d


aCA9(Ab4)
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aCA9-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα + uPA
aCA9-NCL-IL2-NCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
8
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

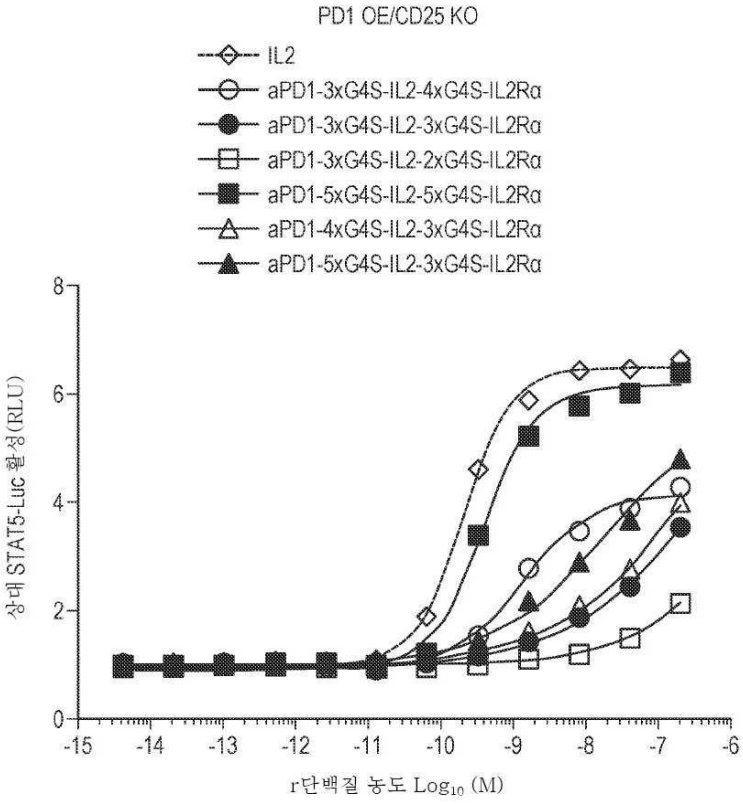
도면7e


aEGFR
aEFGR-PCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aEFGR-PCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
IL2
STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
8
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r단백질 농도 Log10 (M)

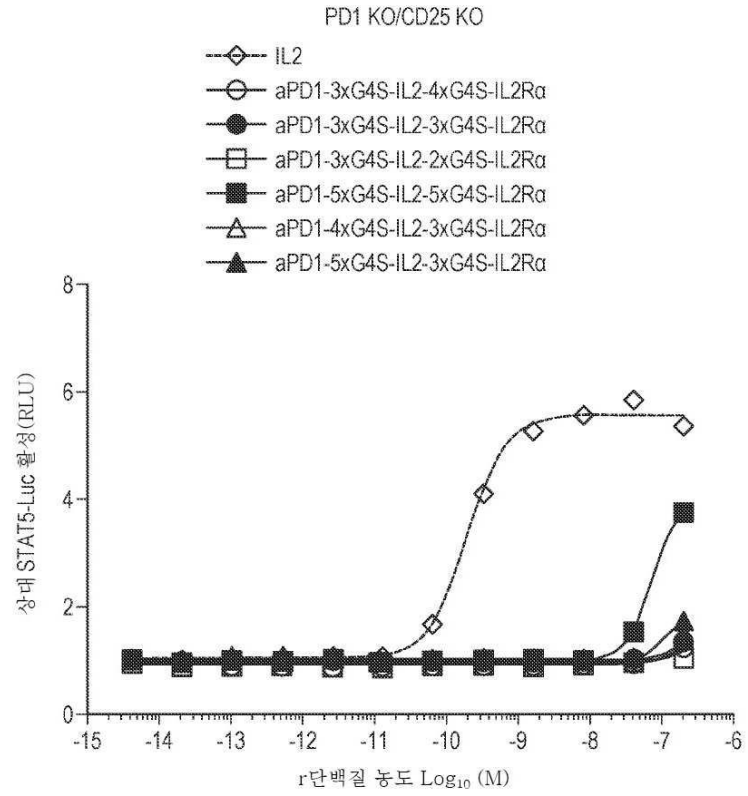
도면7f


aPD1
aPD1-NCL-IL2-PCL-IL2Rα + uPA
aPD1-NCL-IL2-PCL-IL2Rα - uPA
IL2
상대 STAT5-Luc 활성(RLU)
r단백질 농도 Log10 (M)

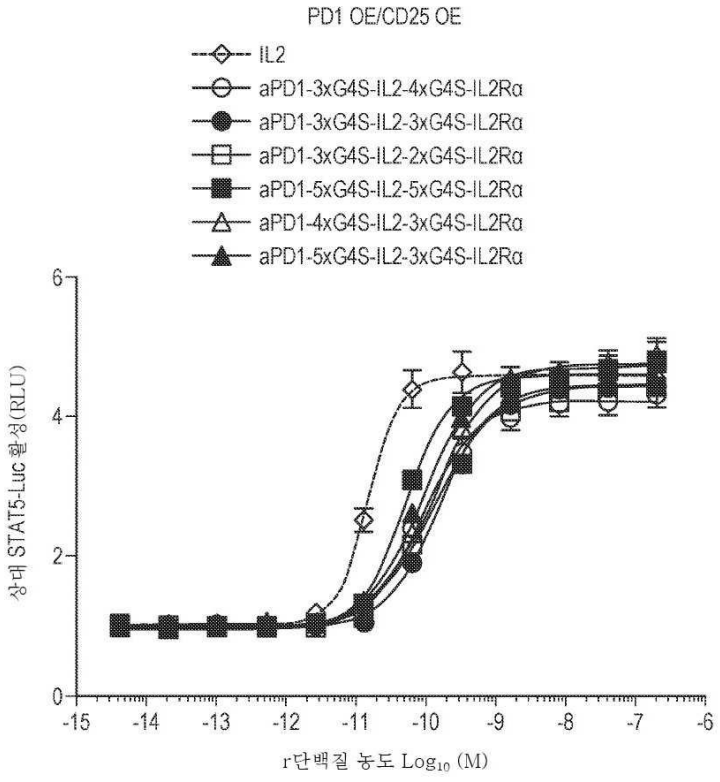
도면8a


PD1 OE/CD25 KO
IL2
aPD1-3xG4S-IL2-4xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-2xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-5xG4S-IL2Rα
aPD1-4xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
상대 STAT5-Luc 활성(RLU)
r단백질 농도 Log10 (M)

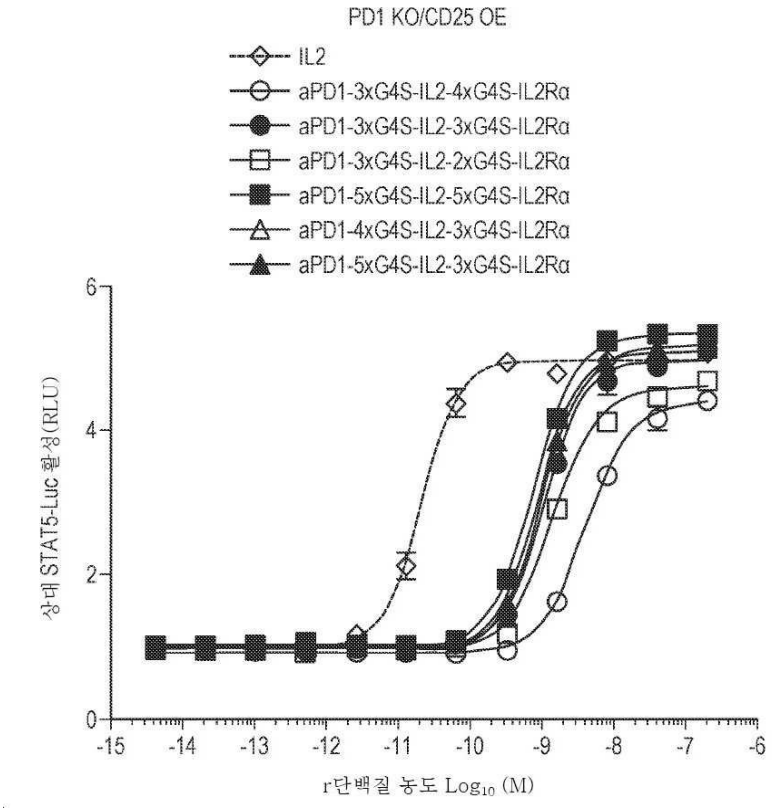
도면8b


PD1 KO/CD25 KO
IL2
aPD1-3xG4S-IL2-4xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-2xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-5xG4S-IL2Rα
aPD1-4xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
상대 STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
8
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
r단백질 농도 Log10 (M)

도면8c


PD1 OE/CD25 OE
IL2
aPD1-3xG4S-IL2-4xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-2xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-5xG4S-IL2Rα
aPD1-4xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
상대 STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
r단백질 농도 Log10 (M)

도면8d


PD1 KO/CD25 OE
IL2
aPD1-3xG4S-IL2-4xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-3xG4S-IL2-2xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-5xG4S-IL2Rα
aPD1-4xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
aPD1-5xG4S-IL2-3xG4S-IL2Rα
상대 STAT5-Luc 활성(RLU)
0
2
4
6
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
r단백질 농도 Log10 (M)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.