(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113459
(43) 공개일자 2024년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/55 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 37/06* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/55 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7013994
(22) 출원일자(국제) 2022년10월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/077847
(87) 국제공개번호 WO 2023/057588
국제공개일자 2023년04월13일
(30) 우선권주장
21306399.3 2021년10월06일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
일투 파마
프랑스 75013 파리 뤼 데 레뀔레뜨 14
아시스땅스 퍼블리끄-오삐또 드 빠리
프랑스 75012 파리 불바르 디드로 55
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
크라츠망 다비
프랑스 75013 파리 뤼 뒤 타쥬 11
뎨드기 알랭
프랑스 75001 파리 뤼 드 리볼리 138
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 15 항

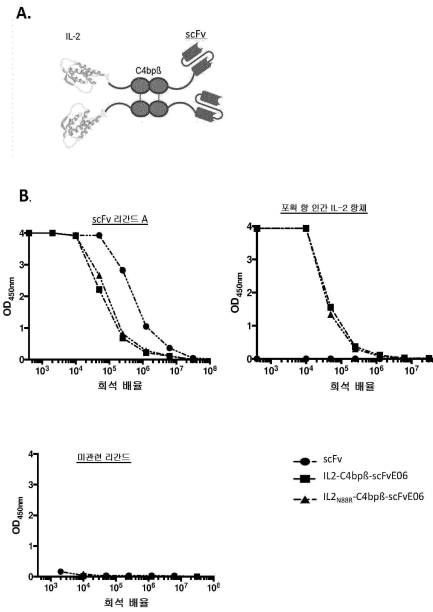
(54) 발명의 명칭 **염증 조직에 대한 표적화 특이성을 갖는 인터루킨 2 키메라 구성체**

(57) 요 약

본 발명은 i) 인터루킨 2 (IL2) 모이어티, 및 ii) 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합하는 표적화 모이어티를 포함하는, 표적화된 키메라 구성체에 관한 것이다. 표적화 모이어티는 바람직하게 산화 단백질 또는 산화 지질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 scFv이고, 융합 단백질을 염증 조직으로 표적화한다. 키메라 구성체는 바

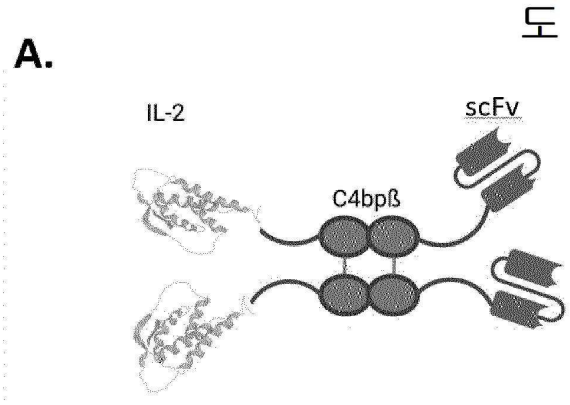
(뒷면에 계속)

대 표 도



람직하게 이량체 단백질을 형성할 수 있는, C4b-결합 단백질 (C4BP)의 베타 사슬을 더 포함한다.

도 1



(52) CPC특허분류
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 37/06 (2018.01)
C07K 14/472 (2013.01)
C07K 16/244 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
(71) 출원인
인스티튜트 내셔널 드 라 싼테 에 드 라 리셰르셰 메디칼르 (인 썸)
프랑스, 파리 75013, 뤼에 드 톨비아크 101
쏘흐본느 유니베흐시테
프랑스 75006 파리 뤼 드 르'에꼴르 드 메드씬느 21

(72) 발명자
바스케스 또마
프랑스 93100 몽트뢰유 아브뉘 뒤 프레지당 윌슨 100
빌리알 니꼴라
프랑스 75016 파리 뤼 데 사블롱 28

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) 적어도 하나의 인터루킨 2 (IL2) 모이어티; 및

ii) 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합하는, 적어도 하나의 표적화 모이어티

를 포함하는, 키메라 구성체.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적화 모이어티는 프로-염증성 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합하는 것인 키메라 구성체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 표적화 모이어티는 산화-특이적 에피토프 (OSE)에 결합하는 것인 키메라 구성체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표적화 모이어티는 (i) 말론디알데히드 (MDA) 에피토프, (ii) 2-(ω-카르복시에틸) 피롤 (CEP) 에피토프, (iii) 4-히드록시노네날 (4-HNE) 에피토프, 또는 (iv) 산화 인지질 (OxPL), 예컨대 포스포콜린-함유 산화 인지질 (PC-OxPL), 산화 포스파티딜에탄올아민 (OxPE), 산화 포스파티딜세린 (OxPS) 또는 산화 카디올리핀 (OxCL), 바람직하게 포스포콜린-함유 산화 인지질 (PC-OxPL)에 결합하는 것인 키메라 구성체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표적화 모이어티는 항체 또는 항체 단편, 예컨대 단쇄 가변 단편 (scFv)이고, 바람직하게 표적화 모이어티는 E06 항체 또는 E06 항체 단편, 예컨대 E06 scFv; LR04 항체 또는 LR04 항체 단편, 예컨대 LR04 scFv; NA17 항체 또는 NA17 항체 단편, 예컨대 NA17 scFv; E014 항체 또는 E014 항체 단편, 예컨대 E014 scFv; MDA2 항체 또는 MDA2 항체 단편, 예컨대 MDA2 scFv; IK17 항체 또는 IK17 항체 단편, 예컨대 IK17 scFv; LR01 항체 또는 LR01 항체 단편, 예컨대 LR01 scFv; 및 이의 기능성 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키메라 구성체.

청구항 6

제5항에 있어서, 표적화 모이어티는

- SEQ ID NO:12로 표시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:12와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (VH) 도메인; 및

- SEQ ID NO:11로 표시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:11과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (VL) 도메인

을 포함하는, E06 scFv 또는 이의 변이체인 키메라 구성체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 IL-2 모이어티는 인간 IL-2 또는 이의 상동성 변이체이고, 변이체는 인간 야생형 IL-2와 적어도 85% 아미노산 동일성을 갖고, 바람직하게 변이체는 인간 야생형 IL-2와 적어도 90% 아미노산 동일성을 갖는 인간 IL-2의 활성 유사체이고, 상기 IL-2 모이어티는 바람직하게 SEQ ID NO: 2의 위치 N88에 치환, 여전히 바람직하게 치환 N88R 또는 N88D를 포함하는 IL2 뮤테인인, 키메라 구성체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, IL2 모이어티 및 표적화 모이어티는 인 프레임 (in frame)으로

또는 아미노산 링커, 바람직하게 폴리G 링커를 통해서 융합되는 것인 키메라 구성체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 키메라 구성체는 이량체 단백질을 형성할 수 있는 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체를 더 포함하고, 바람직하게 C4BPβ의 단편은 C4BPβ의 아미노산 잔기 194 내지 252 또는 N-말단에서 최대로 아미노산 135까지 연장된 C4BPβ의 보다 긴 단편을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 키메라 구성체.

청구항 10

제9항에 있어서,

a) 단편의 아미노산의 25% 미만, 바람직하게 10% 미만이 절단 또는 치환되었고, 위치 202 및 216에 위치된 시스테인을 비롯하여 각 시스테인의 상류 및 하류의 적어도 3개 아미노산은 보존된 것인, C4BPβ의 단편의 변형된 서열; 또는

b) 이량체화를 담당하는 시스테인은 바람직하게 알라닌, 발린, 페닐알라닌, 프롤린, 메티오닌, 이소류신, 류신 및 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 단편의 다른 아미노산은 시스테인으로 치환되는 것인, C4BPβ의 단편의 변형된 서열; 또는

c) 이량체화를 담당하는 시스테인 사이에, 베타 사슬에 대해 이종성인 서열의 삽입에 의해 변형되는 C4BPβ의 단편의 서열; 또는

d) 이량체화를 담당하는 시스테인 사이에서 아미노산을 절단하여 변형되는 C4BPβ의 단편의 서열

을 포함하는 C4BPβ의 기능성 변이체를 포함하는 것인 키메라 구성체.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, IL-2 모이어티는 C4BPβ 또는 상기 이의 단편의 N-말단에서 융합되고, C4BPβ 또는 상기 이의 단편의 C-말단은 바람직하게 표적화 모이어티에 연결되는 것인 키메라 구성체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항의 키메라 구성체를 코딩하는 핵산.

청구항 13

제12항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 14

제12항의 핵산 또는 제13항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 15

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 자가면역 및/또는 염증성 질환의 치료에서 사용을 위한 것인 키메라 구성체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 염증 조직에 특이성을 제공하는 표적화 모이어티 및 IL2를 포함하는 키메라 구성체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인터루킨-2 (IL2 또는 IL-2)는 면역계의 핵심 측면을 조절하는 사이토카인이다. IL2는 암뿐만 아니라, 자가면역 및/또는 염증성 질환의 환자에서 면역 반응을 상승시키려는 시도에 사용되어 왔다. IL2는 항원-활성화

된 T 세포의 클론 확장을 포함하여, 면역 반응을 촉진시키고, CD4+ T-헬퍼 (Th)1 및 Th2 세포의 발생을 구동시키며, 최종적으로 CD8+ 세포독성 T 림프구 (CTL)를 분화시키고, CD4+ Th17 및 T-여포성 헬퍼 (Tfh) 세포의 발생에 대항하는, 강력한 T 세포 성장 인자이다. IL2는 또한 T 세포 기억 회상 반응을 형성한다.

[0003] 저용량의 IL2는 자기-조직의 자가면역-유사 공격과 연관된 원치않는 면역 반응을 억제하기 위해 내성을 선택적으로 상승시키는데 사용되어 왔다. 따라서, 지금까지의 경험에 따르면 이러한 요법은 자가-공격성 T 세포의 재활성화 징후없이, 안전한 한편, 조절성 T 세포 (Treg)가 거의 모든 환자에서 증가되고, 임상적 개선이 동반된다.

[0004] 그럼에도 불구하고, 치료제로서 IL2는 개선될 수 있다. 특히, IL2를 관심 조직으로 표적화함으로써, 치료 효능을 개선시키고, 그리하여 관심 조직에서, 국소적으로 농도를 증가시키는 것이 바람직하다. 또한, IL-2에 반응하여 활성화될 수 있는 림프구 개체군의 편재성과 관련된 잠재적 "표적-이탈 (off-target)" 효과를 제한하기 위해 표적화 특이성을 갖는 IL2 구성체를 제공할 필요가 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 염증성 조직에 대한 표적화 특이성을 갖는 IL2 키메라 구성체를 제공한다.

[0006] 본 발명자는 이러한 표적화된 키메라 구성체가 IL2 치료의 효능을 유의하게 개선시킨다는 것을 놀랍게도 확인하였다. 특히, 본 발명자는 본 발명의 표적화된 키메라 구성체의 사용이 염증 부위로 동원되는 Treg의 수 증가, 및 Treg의 증식 증가를 야기한다는 것을 확인하였다.

[0007] 특히, 본 발명의 키메라 구성체는 (i) 적어도 하나의 인터루킨 2 모이어티; 및 ii) 산화 단백질 또는 산화 지질, 예컨대 프로-염증성 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합하는, 적어도 하나의 표적화 모이어티를 포함한다.

[0008] 바람직한 구현예에서, 표적화 모이어티는 산화-특이적 에피토프 (OSE)에 결합한다.

[0009] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 (i) 말론디알데히드 (MDA) 에피토프, (ii) 2-(ω-카르복시에틸) 피롤 (CEP) 에피토프, (iii) 4-히드록시노네날 (4-HNE) 에피토프, 또는 (iv) 산화 인지질 (OxPL), 예컨대 포스포콜린-함유 산화 인지질 (PC-OxPL), 산화 포스파티딜에탄올아민 (OxPE), 산화 포스파티딜세린 (OxPS) 또는 산화 카디올리핀 (OxCL), 바람직하게 포스포콜린-함유 산화 인지질 (PC-OxPL)에 결합한다.

[0010] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 항체 또는 항체 단편, 예컨대 단쇄 가변 단편 (scFv)이다.

[0011] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 E06 항체 또는 E06 항체 단편, 예컨대 E06 scFv; LR04 항체 또는 LR04 항체 단편, 예컨대 LR04 scFv; NA17 항체 또는 NA17 항체 단편, 예컨대 NA17 scFv; E014 항체 또는 E014 항체 단편, 예컨대 E014 scFv; MDA2 항체 또는 MDA2 항체 단편, 예컨대 MDA2 scFv; IK17 항체 또는 IK17 항체 단편, 예컨대 IK17 scFv; LR01 항체 또는 LR01 항체 단편, 예컨대 LR01 scFv; 및 이의 기능성 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0012] 바람직한 구현예에서, 표적화 모이어티는 E06 항체 또는 E06 항체 단편, 예컨대 E06 scFv, 또는 이의 기능성 변이체이다. 특정 구현예에서, E06 scFv는

[0013] - SEQ ID NO:12로 표시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:12와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (VH) 도메인; 및

[0014] - SEQ ID NO:11로 표시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:11과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (VL) 도메인

[0015] 을 포함한다.

[0016] 특정 구현예에서, IL-2 모이어티는 인간 IL-2 또는 이의 상동성 변이체이고, 변이체는 인간 야생형 IL-2와 적어도 85% 아미노산 동일성을 갖고, 바람직하게 변이체는 인간 야생형 IL-2와 적어도 90% 아미노산 동일성을 갖는 인간 IL-2의 활성 유사체이고, 상기 IL-2 모이어티는 바람직하게 SEQ ID NO: 2의 위치 N88에 치환, 여전히 바람직하게 치환 N88R 또는 N88D를 포함하는 IL2 뮤테인이다.

[0017] 특정 구현예에서, IL2 모이어티 및 표적화 모이어티는 인 프레임 (in frame)으로 또는 아미노산 링커, 바람직하게 폴리G 링커를 통해서 융합된다.

[0018] 특정 구현예에서, 상기 키메라 구성체는 이량체 단백질을 형성할 수 있는 C4b-결합 단백질의 베타 사슬(C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체를 더 포함한다.

[0019] 특정 구현예에서, C4BPβ의 단편은 C4BPβ의 아미노산 잔기 194 내지 252 또는 N-말단에서 최대로 아미노산 135까지 연장된 C4BPβ의 더 긴 단편을 포함하거나, 또는 그로 이루어진다.

[0020] 특정 구현예에서, 키메라 구성체는

[0021] a) 단편의 아미노산의 25% 미만, 바람직하게 10% 미만이 절단 또는 치환되었고, 위치 202 및 216에 위치된 시스테인을 비롯하여 각 시스테인의 상류 및 하류의 적어도 3개 아미노산은 보존된 것인, C4BPβ의 단편의 변형된 서열; 또는

[0022] b) 바람직하게 알라닌, 발린, 페닐알라닌, 프롤린, 메티오닌, 이소류신, 류신 및 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 단편의 다른 아미노산은 시스테인으로 치환되는 것인, C4BPβ의 단편의 변형된 서열; 또는

[0023] c) 이량체화를 담당하는 시스테인 사이에, 베타 사슬에 대해 이종성인 서열의 삽입에 의해 변형되는 C4BPβ의 단편의 서열; 또는

[0024] d) 이량체화를 담당하는 시스테인 사이에서 아미노산을 절단하여 변형되는 C4BPβ의 단편의 서열

[0025] 을 포함하는 C4BPβ의 기능성 변이체를 포함한다.

[0026] 특정 구현예에서, IL-2 모이어티는 C4BPβ 또는 상기 이의 단편의 N-말단에서 융합되고, C4BPβ 또는 상기 이의 단편의 C-말단은 바람직하게 표적화 모이어티에 융합된다.

[0027] 특정 구현예에서, 키메라 구성체는 이량체 형태이고, 단량체는 C4BPβ의 2개 시스테인 사이에서 공유 결합에 의해 회합된다. 동종이량체 및 이종이량체는 하기에서 보다 상세하게 설명된다.

[0028] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 키메라 구성체를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 핵산을 포함하는 벡터, 및 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 또한 자가-면역 및/또는 염증성 질환의 치료에서 사용을 위한, 본 발명의 키메라 구성체에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] **도 1: 표적화 융합 단백질의 기능적 디자인의 시험관내 평가.**

각각의 표적화 융합 단백질을 코딩하는 이식유전자를 함유하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 안정한 HEK 293T 세포주는 48시간 동안 혈청-무함유 배지에서 배양되었다.

A) 표적화 융합 단백질의 디자인.

B) 효소-연결 면역흡착 어세이 (ELISA)에 의한 안정한 HEK 293T 세포 상청액 중 표적화 융합 단백질 검출.

C) 농축 및 여과된 상청액을 사용하여, IL2-C4bpβ-scFv 및 IL2N88R-C4bpβ-scFv는 1차 다클론 항-인간 IL-2 항체 또는 1차 단일클론 항-히스티딘 항체를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 특징규명되었다.

D) 표적화 융합 단백질의 기능적 활성은 유세포측정법을 사용하여 인간 CD4+ 조절 T 세포, CD4+ 통상의 T 세포, CD8+ T 세포 및 NK 세포에서 STAT5 인산화 (pSTAT5) 반응의 평가를 통해 평가되었다.

도 2: 대장염 염증 실험 모델에서 표적화 융합 단백질의 치료적 효과.

A) 6주령 내지 8주령 C57BL/6 (Jrj) 암컷 마우스 (n=6)는 복강내 경로를 통해서 IL2, scFvE06, IL2-C4bpβ-scFvE06 또는 $IL2_{N88R}$-C4bpβ-scFvE06을 코딩하는 AAV가 5.10^{10} 내지 5.10^{11} vg (바이러스 게놈)로 주사되었거나 또는 6일 동안 물에 희석된 덱스트란 술페이트 소듐 (2%)의 경구 투여를 통한 면역화 전에 7일 동안 미처치된 채로 남겨졌다. AAV 주사 이후 7일에 말초 혈액 중 CD4+ Treg 및 CD25 MFI, CD4+ Tconv CD25+ 및 NK 세포의 면역모니터링 분석을 수행하였다 (B).

임상 질환 평가는 체중 감소 (C), 대변 굳기 (D), 출혈 (E) 및 질환 활성 지수 (F)를 기반으로 한다. 상완 및 대동맥 주위 림프절에서 인테그린 α4β7 (G) 및 Ki67 (H)을 발현하는 Treg의 면역모니터링 분석. 통계

적 유의성은 GraphPad Prism 버전 6.00을 사용한 AUC의 계산 후 상이한 처치 그룹 간에 평가되었고, 만-위트니 (Mann-Whitney) 검정 (평균 비교, 독립 검정, 비모수 검정, 양측 P 값)을 사용해 계산되었으며, P < 0.05 (*)가 통계적 유의성으로 간주되었다 (** P <0.01, ***P<0.001). 모든 그래프에서, 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다.

도 3 은 IL2 또는 IL2-C4bpβ-scFvE06의 단일 주사 이후 마우스에서 약동학을 기록한 그래프이다.

도 4 는 DSS-유도된 대장염 마우스 모델에서 면역화학 염색의 사진 모음이다. IL-2-C4bpβ-scFvE06이 처치된 마우스만이 결장에서 IL2 및 6X-His 태그 둘 모두의 검출이 확인되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] *정의*

[0032] 치료하려는 **"대상체"** 또는 **"환자"**는 임의의 포유동물, 바람직하게 인간일 수 있다. 인간 대상체는 어린이, 성인, 또는 노인일 수 있다.

[0033] 용어 **"치료하는"** 또는 **"치료"**는 질환에서의 임의의 개선을 의미한다. 적어도 하나의 증상의 완화, 또는 질환의 중증도 또는 발병의 감소를 포함한다. 질환이 염증성 및/또는 자가면역 장애인 경우에, 이 용어는 보다 특히 급성 에피소드 (발적)의 위험, 발생, 또는 중증도의 감소를 포함한다. 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 질환 진행의 감소를 포괄한다. 특히, 본 발명은 질환 진행의 예방 또는 둔화를 포괄한다. 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 특히 무증상이지만, "위험성이 있는"으로 진단된 대상체에서, 질환 개시의 지연 또는 위험의 감소를 통한, 예방적 치료를 더 포괄한다.

[0034] **"조절성 T 세포"** 또는 **"Treg"**는 면역억제 활성을 갖는 T 림프구이다. 천연 Treg는 CD4+CD25+Foxp3+ 세포인 것을 특징으로 한다. Treg는 염증성 질환의 제어에서 주요한 역할을 하지만, 이러한 질환에서 그들의 작용 방식은 충분히 알려져 있지 않다. 사실, 대부분의 염증성 질환에서, Treg 고갈은 질환을 악화시키는 한편 Treg 첨가는 이를 감소시킨다. 대부분의 Treg는 CD4+ 세포이지만, 또한 억제 활성을 갖는 CD8+ Foxp3+ T 림프구의 드문 개체군도 존재한다.

[0035] 본 출원의 문맥 내에서, **"이펙터 T 세포" (또는 "Teff")** 는 하나 이상의 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하고, 이펙터 기능 (예를 들어, 세포독성 활성, 사이토카인 분비 등)을 수행하는, Treg 이외의 통상적인 T 림프구 (때때로 문헌에서 Tconv라고도 함)를 의미한다. 본 발명에 따른 인간 Teff의 주요 개체군은 CD4+ T 헬퍼 림프구 (예를 들어, Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh) 및 CD4+ 또는 CD8+ 세포독성 T 림프구를 포함하고, 그들은 자기 또는 비-자기-항원에 특이적일 수 있다. Teff는 Foxp3+ 조절성 CD8+ T 세포를 포함하지 않는다.

[0036] 본 출원의 문맥 내에서, **"T 여포성 헬퍼 세포" (또는 "Tfh")** 는 BcL6, CXCR5 및 PD1을 발현하고, Foxp3- 이고, B 세포 도움을 제공하는, T CD4+ 림프구를 의미한다.

[0037] 본 출원의 문맥 내에서, **"T 여포성 조절 세포" (또는 "Tfr")** 는 CD4+CXCR5+PD-1+Bc16+Foxp3+CD25- T 림프구를 의미한다.

[0038] 항체는 다른 물질에 결합하는 것에 비해서 더 큰 치환성, 화합성으로, 보다 쉽게, 및/또는 더 긴 기간 동안 결합하는 경우에 표적 항원에 **"특이적으로 결합한다"**. "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 배타적 결합을 반드시 요구하지 않는다 (그러나 포함할 수는 있음). 반드시는 아니지만, 일반적으로, 결합에 대한 언급은 우선적 결합을 의미한다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 당분야에 공지되어 있고, 어떠한 것도 본 개시의 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0039] **"항체 단편"** 은 항체의 일부분만을 포함하고, 일부분은 전형적으로 온전한 항체에 존재할 때 그 일부분과 정상적으로 연관된 기능의 적어도 하나, 보다 일반적으로 대부분 또는 전부를 유지한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 일 구현예에서, 항체 단편은 본래 항체의 항원 결합 부위를 포함하고, 따라서 항원에 결합하는 능력을 유지한다. 다른 구현예에서, 항체 단편, 예를 들어, Fc 영역을 포함하는 것은 본래 항체에 존재할 때 Fc 영역과 정상적으로 연관된 생물학적 기능 중 적어도 하나, 예컨대 FcRn 결합, 항체 반감기 조절, ADCC 기능 및 보체 결합을 유지한다.

[0040] 항원-결합 영역 또는 항원-결합 단편은 중쇄의 VH 및 CH1 도메인과 쌍형성된 완전한 경쇄 각각으로 이루어지고, **"Fab (Fragment antigen binding) 단편"**이라고 불리는, 항체의 Y-형상 구조의 팔부에 상응한다. Fab 단편

은 사슬간 디술피드 결합의 아미노 말단 측면 상에서, 힌지 영역의 항체 분자를 절단하고, 따라서 2개의 동일한 항원-결합 팔부를 방출하는 파파인 분해에 의해 천연 면역글로불린 분자로부터 최초로 생성되었다. 다른 프로테아제, 예컨대 펩신도 사슬간 디술피드 결합의 카르복시-말단 측면 상이지만, 역시 힌지 영역의 항체 분자를 절단하여, 2개의 동일한 Fab 단편으로 이루어지고 디술피드 결합을 통해 연결된 채로 남겨진 단편을 방출하며; **F(ab')2** 단편의 디술피드 결합의 감소로 **Fab' 단편**이 생성된다.

[0041] VH 및 VL 도메인에 상응하는 항원 결합 영역의 일부는 **Fv (Fragment variable) 단편**이라고 하며; 항원-결합 부위 (파라토프라고도 함)를 형성하는, CDR (상보성 결정 영역)을 함유한다.

[0042] 이펙터 분자 또는 세포에 대한 결합을 담당하는 항체의 이펙터 영역은 Y-형 구조의 줄기부에 상응하고, 중쇄의 쌍형성된 CH2 및 CH3 도메인 (항체 부류에 따라서, CH2, CH3 및 CH4 도메인)을 함유하고, **Fc (Fragment crystallisable region) 영역**이라고 한다.

[0043] **"단쇄 Fv"** 또는 **"scFv"** 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성할 수 있게 하는, VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. 링커는 일반적으로 가요성을 위한글리신을 비롯하여, 가용성을 위한 세린 또는 트레오닌이 풍부하고, VH의 N-말단을 VL의 C-말단에 연결시킬 수 있거나, 또는 그 반대일 수도 있다. 이러한 scFv 단편은 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, 본래 항체의 특이성을 유지한다.

[0044] 서열 목록은 하기 서열을 표시한다:

[0045] SEQ ID NO: 1은 야생형 인간 IL2 (신호 펩티드를 포함한, 253개 아미노산)이다.

[0046] SEQ ID NO: 2는 성숙한 야생형 인간 IL2 (신호 펩티드 없이, 233개 아미노산)이다.

[0047] SEQ ID NO: 3은 C4BP 베타 사슬 (1-252)이다.

[0048] SEQ ID NO: 4는 C4BP 베타 사슬의 단편 194-252이다.

[0049] SEQ ID NO: 5는 C4BP 베타 사슬의 단편 137-252이다.

[0050] SEQ ID NO: 6은 신호 펩티드를 포함한, C4bpβ의 C-말단 영역에 융합된 인간 IL-2의 아미노산 서열 (Hi2cb)이다.

[0051] SEQ ID NO: 7은 신호 펩티드를 포함한,C4bpβ의 C-말단 영역에 융합된 돌연변이된 IL-2 (N88R)의 아미노산 서열 (Hi2mcb)이다.

[0052] SEQ ID NO: 8은 GGGGS 패턴 (링커)이다.

[0053] SEQ ID NO: 9는 신호 펩티드없는 C4bpβ의 C-말단 영역에 융합된 인간 IL-2의 아미노산 서열 (Hi2cb)이다.

[0054] SEQ ID NO: 10은 신호 펩티드없는 C4bpβ의 C-말단 영역에 융합된 돌연변이된 IL-2 (N88R)의 아미노산 서열 (Hi2mcb)이다.

[0055] SEQ ID NO: 11은 E06 scFv VL 도메인의 서열이다.

[0056] SEQ ID NO: 12는 E06 scFv VH 도메인의 서열이다.

[0057] SEQ ID NO: 13은 E06 scFv의 서열 (HIS 태그없음)이다.

[0058] SEQ ID NO: 14는 링커 GGGGSGGGGSGGGGS이다.

[0059] SEQ ID NO: 15는 표적화 융합 단백질 IL-2-C4bpβ-scFvE06의 서열 (신호 펩티드없음, HIS 태그없음)이다.

[0060] SEQ ID NO: 16은 표적화 융합 단백질 IL-2-C4bpβ-scFvE06의 서열 (펩티드 서열있음, HIS 태그없음)

[0061] SEQ ID NO: 17은 표적화 융합 단백질 IL-2N88R-C4bpβ-scFvE06의 서열 (신호 펩티드없음, HIS 태그없음)이다.

[0062] SEQ ID NO: 18은 표적화 융합 단백질 IL-2N88R-C4bpβ-scFvE06의 서열 (신호 펩티드있음, HIS 태그없음)이다.

[0063] SEQ ID NO: 19는 표적화 융합 단백질 IL-2-C4bpβ-scFvE06의 서열 (신호 펩티드 있음, HIS 태그있음)이다.

[0064] SEQ ID NO: 20은 표적화 융합 단백질 IL-2N88R-C4bpβ-scFvE06의 서열 (신호 펩티드 있음, HIS 태그있음)이다.

[0065] 본 발명의 키메라 구성체는 (i) 적어도 하나의 인터루킨 2 모이어티; 및 ii) 적어도 하나의 표적화 모이어티를 포함한다.

[0066] *IL-2 모이어티*

[0067] 본 명세서에서 사용되는, 인터루킨-2 (IL-2)는 포유동물 야생형 인터루킨-2, 및 이의 변이체를 포괄한다. 바람직하게, IL-2는 인간 IL-2, 또는 이의 변이체이다.

[0068] IL-2의 활성 변이체는 문헌에 개시되어 있다. 천연 IL-2의 변이체는 이의 단편, 유사체, 및 유도체일 수 있다. "단편"이란 폴리펩티드 서열의 일부분만을 포함하는 폴리펩티드를 의도한다. "유사체"는 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 또는 결실을 갖는 천연 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 뮤테인 및 슈도펩티드는 유사체의 특정예이다. "유도체"는 예컨대 글리코실화, 인산화, 다른 폴리펩티드 또는 분자와 융합, 중합 등, 또는 IL-2의 성질 (예를 들어, 안정성, 특이성 등)을 개선시키기 위한 화학적 또는 효소적 변형 또는 첨가를 통한, 임의의 변형된 천연 IL-2 폴리펩티드 또는 이의 단편 또는 유사체를 포함한다. 활성 변이체의 IL-2 모이어티는 일반적으로 기준 IL-2 폴리펩티드, 예를 들어, 성숙한 야생형 인간 IL-2의 아미노산 서열과 적어도 75%, 바람직하게 적어도 80%, 85%, 보다 바람직하게 적어도 90% 또는 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는, "야생형 IL-2"는 천연 인간 IL-2의 정상적으로 발생되는 133개 아미노산 서열을 포함하는, 천연 또는 재조합의, IL-2를 의미하고, 이의 아미노산 서열은 [Fujita, et. al., PNAS USA, 80,7437-7441 (1983)]에 기술되어 있다. SEQ ID NO: 2 (133개 아미노산)는 추가의 20개 N-말단 아미노산으로 이루어지는 신호 펩티드가 적은 인간 IL-2 서열이다. SEQ ID NO:1 (153개 아미노산)은 신호 펩티드를 포함하는 인간 IL-2 서열이다.

[0070] 본 명세서에서 사용되는, "IL-2 뮤테인"은 인간 성숙한 인터루킨-2 단백질에 대해 특이적 아미노산 치환이 이루어진 폴리펩티드를 의미한다. 아미노산의 모든 번호매김은 달리 표시하지 않으면, SEQ ID NO: 2의 인간 성숙한 인터루킨-2 단백질에 대한 것이다.

[0071] 일부 구현예에서, 위치 125의 시스테인이 중성 아미노산 예컨대 세린 (C125S), 알라닌 (C125A), 트레오닌 (C125T) 또는 발린 (C125V)으로 치환된다.

[0072] 예를 들어, O-글리코실화 부위의 제거는 활성 변이체가 포유동물 세포 예컨대 CHO 또는 HEK 세포에서 발현될 때 보다 균질한 생성물을 생성시킨다.

[0073] 일정 구현예에서 활성 변이체는 인간 IL-2의 잔기 3에 상응하는 위치에서 IL-2의 O-글리코실화 부위를 제거한 추가적인 아미노산 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서 인간 IL-2의 잔기 3에 상응하는 위치에서 IL-2의 O-글리코실화 부위를 제거한 상기 추가적인 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 예시적인 아미노산 치환은 T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K, 및 T3P를 포함한다. 특정한 구현예에서, 상기 추가적인 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환 T3A이다.

[0074] · *T-reg 세포 증식, 생존, 활성화 및/또는 기능을 선택적으로 촉진하는 활성 IL-2 변이체는 염증성 및/또는 자가면역 장애를 치료하는데 특히 유용하다.*

[0075] "선택적으로 촉진하다"란, 활성 변이체가 T-reg 세포의 활성을 촉진하지만, 비-조절성 T 세포의 활성을 촉진하는 능력은 제한되었거나 또는 결여된 것을 의미한다. T-reg 세포 증식, 생존, 활성화 및/또는 기능을 선택적으로 촉진하는 활성 변이체를 스크리닝하기 위한 어세이가 추가로 본 명세서에 기술된다. 변이체 IL-2 폴리펩티드가 활성인지 여부를 결정하기 위한 방법이 당분야에서 이용가능하다. 예를 들어, WO2016/014428을 참조한다. 활성 변이체는 Treg를 자극하는 것에 비해서 Teff를 더 자극하지 않는 정도까지, 야생형 IL-2 또는 알데스루킨 (이하 정의됨)과 비교했을 때 Treg를 자극하는 개선된 능력, 또는 유사한 능력, 또는 심지어 감소된 능력을 갖는 변이체를 포함하여, Treg를 자극하는 능력을 나타내는 변이체로서 정의된다. 후보 분자가 T 세포, 특히 Treg, 또는 NK 세포를 자극하는지 여부를 시험하기 위한 방법이 역시 공지되어 있다. 변이체는 이펙터 T 세포 (예컨대 CD8+ T 세포), CD4+Foxp3+ Treg, 또는 NK 세포를 자극하는 그들 능력에 대해 시험될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 활성 변이체는 야생형 IL2 또는 알데스루킨과 비교하여, NK 세포를 자극하는 능력의 감소를 보인다. STAT5 인산화 모니터링은 [Yu et al, Diabetes 2015;64:2172-2183]에 기술된 바와 같이, Teff에 비해 Treg를 우선적으로 자극하는 그들 능력에 대해 변이체를 평가하는 단순한 방식이다. 특정 구현예에서, 변이체는 소정 수준의 STAT5 인산화가 Teff를 포함한, 다른 면역 세포에 대한 것에 비해서

Treg에 대해 적어도 10배 열등한 용량에 의해 획득될 때 특히 유용하다.

[0076] 상기 활성 변이체는 Treg 세포의 생존, 증식, 활성화 및/또는 기능을 우선적으로 유도하는 신호전달 사건을 유도한다. 일정 구현예에서, IL-2 변이체는 Treg 세포에서, STAT5 인산화 및/또는 IL-2R 하류의 신호전달 분자 중 하나 이상, 예를 들어, p38, ERK, SYK 및 LCK의 인산화를 자극하는 능력을 유지한다. 다른 구현예에서, IL-2 변이체는 Treg 세포에서, Treg 세포 생존, 증식, 활성화 및/또는 기능에 중요한, 예컨대 FOXP3, Bcl-2, CD25 또는 IL-10과 같은, 단백질 또는 유전자의 전사 또는 단백질 발현을 자극하는 능력을 유지한다. 다른 구현예에서, IL-2 변이체는 CD25+ T 세포의 표면 상에서 IL-2/IL-2R 복합체의 세포내이입을 자극하는 능력의 감소를 나타낸다. 다른 구현예에서, IL-2 변이체는 PI3-키나제 신호전달의 자극의 비효율, 감소 또는 부재, 예컨대, AKT 및/또는 mTOR (mammalian target of rapamycin)의 인산화의 비효율, 감소 또는 부재를 입증한다.

또 다른 구현예에서, IL-2 변이체는 Treg 세포에서 STAT5 인산화 및/또는 IL-2R 하류의 하나 이상의 신호전달 분자의 인산화를 자극하는 야생형 IL-2의 능력을 유지하지만, FOXP3- CD4+ 또는 CD8+ T 세포 또는 NK 세포에서 STAT5, AKT 및/또는 mTOR 또는 IL-2R 하류의 다른 신호전달 분자의 인산화의 비효율, 감소, 또는 부재를 입증한다. 다른 구현예에서, IL-2 변이체는 FOXP3- CD4+ 또는 CD8+ T 세포 또는 NK 세포의 생존, 성장, 활성화 및/또는 기능을 자극할 수 없거나 또는 비효율적이다.

[0077] 모든 경우에, 이들 변이체는 그들 생물학적 활성을 결정하는데 보편적으로 사용될 수 있는 CTLL-2 또는 HT-2와 같은 세포주를 자극하는 능력을 갖는다. 예를 들어, IL-2의 생물학적 활성은 그의 성장이 IL-2에 의존적인 HT-2 세포주 (클론 A5E, ATCC® CRL-1841™)에 대해 수행되는 세포-기반 어세이에 의해 결정될 수 있다. 일정 범위의 시험 인터루킨-2 생성물의 존재 하에서 세포 성장은 IL-2 국제 표준 (WHO 2nd International Standard for INTERLEUKIN 2 (인간, rDNA 유래) NIBSC 코드: 86/500)에 기록된 성장과 비교된다. 세포 성장은 [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸리움 (내부 염, MTS)의 첨가 및 활성 생존 세포에 의한 이의 포르마잔으로의 전환 이후에 측정된다. 이어서 포르마잔 농도는 490 nm에서 분광광도법으로 측정된다.

[0078] IL-2 변이체의 예는 예를 들어, EP109748, EP136489, US4,752,585; EP200280, EP118617, WO99/60128, EP2288372, US9,616,105, US9,580,486, WO2010/085495, WO2016/164937에 개시된다.

[0079] 예를 들어, 일정 돌연변이는 IL-2 수용체 (IL-2Rβ/CD122 및/또는 IL-2Rɣ/CD132)의 신호전달 사슬에 대한 친화성의 감소 및/또는 IL-2 수용체의 1개 또는 2개 모두의 서브유닛으로부터 신호전달 사건을 유도하는 능력의 감소를 야기할 수 있다. 다른 돌연변이는 CD25 (IL-2Rα)에 대해 더 높은 친화성을 부여할 수 있다. 양쪽 경우에서, 이들 돌연변이는 Treg의 생존, 증식, 활성화 및/또는 기능을 우선적으로 유도하는 활성 변이체를 정의한다. 이러한 성질은 표면 플라스몬 공명을 사용해 모니터링될 수 있다.

[0080] 유용한 변이체의 특정 예는 야생형 IL-2에 따라 번호매김된, 위치 D20, N30, Y31, K35, V69, Q74, N88, V91, 또는 Q126에 적어도 하나의 아미노산 치환이 확인된 IL-2 뮤테인을 포함하고, 선택된 아미노산이 SEQ ID NO:2의 야생형 IL-2의 성숙한 서열에서 아미노산이 정상적으로 발생되는 위치를 참조하여 확인된다는 것을 의미한다.

[0081] 바람직한 IL-2 뮤테인은 위치 D20H, D20I, D20Y, N30S, Y31H, K35R, V69AP, Q74, N88R, N88D, N88G, N88I, V91K, 또는 Q126L에 적어도 하나의 치환을 포함한다.

[0082] 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인 분자는 V91K 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인 분자는 N88D 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인 분자는 N88R 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인 분자는 H16E, D84K, V91N, N88D, V91K, 또는 V91R, 이의 임의 조합의 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 이들 IL-2 뮤테인 분자는 또한 본 명세서에 기술된 바와 같이 위치 125에 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인 분자는 T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20H, D20I, D20Y, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, R81A, R81G, R81 S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88I, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91 S, I92K, I92R, E95G, 및 Q126으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인 분자의 아미노산 서열은 C125A 또는 C125S 치환 및 T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88F, N88I, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R,

E95G, Q126I, Q126L, 및 Q126F로부터 선택되는 하나의 치환을 갖는 성숙한 IL-2 서열로 기재된 아미노산 서열과 상이하다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인 분자는 C125A 또는 C125S 치환 및 D20H, D20I, D20Y, D20E, D20G, D20W, D84A, D84S, H16D, H16G, H16K, H16R, H16T, H16V, I92K, I92R, L12K, L19D, L19N, L19T, N88D, N88R, N88S, V91D, V91G, V91K, 및 V91S로부터 선택되는 하나의 치환을 갖는 성숙한 IL-2 서열로 기재된 아미노산 서열과 상이하다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인은 N88R 및/또는 D20H 돌연변이를 포함한다.

[0083] 이들 치환은 단독으로 또는 서로 조합하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 뮤테인은 각각의 이들 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 뮤테인은 이들 돌연변이 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 또는 8개를 포함한다.

[0084] 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인은 N88R 또는 N88D 돌연변이, 바람직하게 N88R을 포함한다. 일부 구현예에서, IL-2 뮤테인은 C125A 또는 C125S 돌연변이를 포함한다. 이들 치환은 단독으로 또는 서로 조합하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 뮤테인은 이들 돌연변이 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 또는 8개를 포함한다. 일부 구현예에서, 뮤테인은 각각의 이들 치환을 포함한다.

[0085] 특정 구현예에서, IL-2 모이어티는 알데스루킨이다. 알데스루킨은 Proleukin®의 활성 성분이다. 알데스루킨은 성숙한 인간 IL-2 (SEQ ID NO: 2)의 서열과 비교하여 2개 아미노산 변형: 첫번째 아미노산 (알라닌)의 결실 및 위치 125의 시스테인의 세린으로의 치환을 포함하는 성숙한 인간 IL-2의 변이체이다.

[0086] IL-2의 다른 위치에 보존성 변형 및 치환 (즉, 뮤테인의 2차 또는 3차 구조에 대해 최소 효과를 갖는 것들)이 포괄된다. 이러한 보존성 치환은 Dayhoff가 [The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978)]에 기술한 것들, 및 Argos가 [EMBO J., 8: 779-785 (1989)]에 기술한 것들을 포함한다. 예를 들어, 하기 그룹 중 하나에 속하는 아미노산은 보존성 변화를 의미한다: -ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr; -cys, ser, tyr, thr; -val, ile, leu, met, ala, phe; -lys, arg, his; -phe, tyr, trp, his; 및 -asp, glu.

[0087] IL-2R의 α 서브유닛에 대한 결합을 파괴하는 돌연변이를 갖는 변이체는, 이들 돌연변이체가 Treg를 자극하는 감소된 능력을 가질 수 있으므로, 바람직하지 않다.

[0088] · *Teff 세포 증식, 생존, 활성화 및/또는 기능을 촉진하는 활성 IL-2 변이체는 암의 치료에서 유용할 수 있다.*

[0089] 이러한 IL-2의 활성 변이체는 각각 야생형 IL-2 폴리펩티드와 비교하여, IL-2 수용체 (CD25)의 α-서브유닛에 대한 돌연변이체 IL-2 폴리펩티드의 친화성을 없애거나 또는 감소시키고, 중간-친화성 IL-2 수용체에 대한 돌연변이체 IL-2 폴리펩티드의 친화성을 보존하는 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 이러한 성질은 표면 플라스몬 공명을 사용해 모니터링될 수 있다.

[0090] 바람직한 활성 변이체는 F42A, K43N, Y45A, 및/또는 E62A 치환(들)을 포함하는 IL-2 뮤테인을 포함한다.

[0091] 활성 변이체 예컨대 CD25에 대해 감소된 친화성을 갖는 인간 IL-2 (hIL-2)의 돌연변이체는 예를 들어, 아미노산 위치 35, 38, 42, 43, 45, 62 또는 72 또는 이의 조합 (인간 IL-2 서열 SEQ ID NO: 2에 대한 번호매김)에서 아미노산 치환에 의해 생성될 수 있다. 예시적인 아미노산 치환은 K35E, K35A, R38A, R38E, R38N, R38F, R38S, R38L, R38G, R38Y, R38W, F42L, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, K43E, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, E62G, E62A, E62S, E62T, E62Q, E62E, E62N, E62D, E62R, E62K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, 및 L72K를 포함한다. 본 발명을 위한 키메라 구성체에서 유용한 특정 활성 변이체는 인간 IL-2, 또는 이의 조합의 잔기 42, 45, 또는 72에 상응하는 아미노산 위치에 아미노산 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서 상기 아미노산 돌연변이는 F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, 및 L72K의 군으로부터 선택되는 아미노산 치환, 보다 특히 F42A, Y45A 및 L72G의 군으로부터 선택되는 아미노산 치환이다. 이들 활성 변이체는 중간-친화성 IL-2 수용체에 대해서 실질적으로 유사한 결합 친화성을 나타내고, IL-2 돌연변이체의 야생형 형태와 비교하여 IL-2 수용체의 α-서브유닛 및 고-친화성 IL-2 수용체 (IL2Rαβγ)에 대해서 실질적으로 감소된 친화성을 갖는다.

[0092] 유용한 활성 변이체의 다른 특징은 IL-2 수용체-보유 T 및/또는 NK 세포의 증식을 유도하는 능력, IL-2 수용체-보유 T 및/또는 NK 세포에서 IL-2 신호전달을 유도하는 능력, NK 세포에 의한 2차 사이토카인으로서 인터페론 (IFN)-γ를 생성시키는 능력, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에 의한 2차 사이토카인 - 특히 IL-10 및 TNF-α -의 정교화를 유도하는 감소된 능력, 조절성 T 세포를 활성화시키는 감소된 능력, T 세포에서 아폽토시스를 유도하는

감소된 능력, 및 생체내에서 감소된 독성 프로파일을 포함할 수 있다.

[0093] 특정 활성 변이체는 IL-2 수용체의 α-서브유닛에 대한 활성 변이체의 친화성을 없애거나 또는 감소시키지만, 중간 친화성 IL-2 수용체에 대한 활성 변이체의 친화성은 보존하는 3개 아미노산 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서 상기 3개 아미노산 돌연변이는 인간 IL-2의 잔기 42, 45 및 72에 상응하는 위치에 있다. 일 구현예에서 상기 3개 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일 구현예에서 상기 3개 아미노산 돌연변이는 F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, 및 L72K의 군으로부터 선택되는 아미노산 치환이다. 특정한 구현예에서 상기 3개 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환 F42A, Y45A 및 L72G (SEQ ID NO: 2의 인간 IL-2 서열에 대해 번호매김됨)이다.

[0094] 일정 구현예에서 상기 아미노산 돌연변이는 IL-2 수용체의 α-서브유닛에 대한 돌연변이체 IL-2 폴리펩티드의 친화성을 적어도 5-배, 특히 적어도 10-배, 보다 특히 적어도 25-배까지 감소시킨다. IL-2 수용체의 α-서브유닛에 대한 활성 변이체의 친화성을 감소시키는 하나 초과의 아미노산 돌연변이가 존재하는 구현예에서, 이들 아미노산 돌연변이의 조합은 IL-2 수용체의 α-서브유닛에 대한 활성 변이체의 친화성을 적어도 30-배, 적어도 50-배, 또는 심지어 적어도 100-배까지 감소시킬 수 있다. 일 구현예에서 상기 아미노산 돌연변이 또는 아미노산 돌연변이의 조합은 IL-2 수용체의 α-서브유닛에 대한 활성 변이체의 친화성을 제거하여서 표면 플라스몬 공명에 의해 어떠한 결합도 검출불가하게 된다.

[0095] 중간-친화성 수용체에 대한 실질적으로 유사한 결합, 즉, 상기 수용체에 대한 돌연변이체 IL-2 폴리펩티드의 친화성의 보존은 중간-친화성 IL-2 수용체에 대한 IL-2 돌연변이체의 야생형 형태의 친화성의 약 70% 초과를 나타낼 때 획득된다. 본 발명에서 유용한 활성 변이체는 이러한 친화성의 약 80% 초과, 및 심지어 약 90% 초과를 나타낼 수 있다.

[0096] IL-2의 O-글리코실화의 제거와 조합하여 IL-2 수용체의 α-서브유닛에 대한 IL-2의 친화성의 감소는 개선된 성질을 갖는 IL-2 단백질을 생성시킨다.

[0097] 특정한 구현예에서, 활성 변이체는 활성화된 T 림프구 세포의 증식, 활성화된 T 림프구 세포의 분화, 세포독성 T 세포 (CTL) 활성, 활성화된 B 세포의 증식, 활성화된 B 세포의 분화, 자연 살해 (NK) 세포의 증식, NK 세포의 세포독성 활성, NK 세포의 분화, 활성화된 T 세포 또는 NK 세포에 의한 사이토카인 분비, 및 NK/림프구 활성화된 사멸자 (LAK) 항종양 세포독성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포 반응을 유발할 수 있다.

[0098] 일부 구현예에서, 이들 활성 변이체는 또한 본 명세서에 기술된 바와 같이 위치 125에 치환을 포함한다.

[0099] ***표적화 모이어티***

[0100] 키메라 구성체는 IL-2를 염증성 조직으로 표적화할 수 있는, 표적화 모이어티를 더 포함한다.

[0101] 특히, 표적화 모이어티는 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합한다. 본 발명의 문맥에서, 산화 단백질 또는 산화 지질은 염증성 조직에서 발견된다. 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 염증의 원인이 되거나 또는 염증 반응에 관여되는, 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합한다. 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 산화 손상 및 염증에 의해 유도되고/되거나 그의 원인이 되는 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합한다.

[0102] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 프로-염증성 산화 단백질 또는 산화 지질에 결합한다. "프로-염증성"이란 염증의 양성 매개인자인 산화 단백질 또는 지질을 의미한다. 예를 들어, 프로-염증성 단백질 또는 지질은 염증성 사이토카인(들)의 분비 및/또는 이펙터 세포 예컨대 단핵구 및 마크로파지의 동원을 유도할 수 있다. 염증성 사이토카인은 면역 세포 예컨대 헬퍼 T 세포 (Th) 및 마크로파지로부터 분비되는 신호전달 분자 유형, 및 염증을 촉진하는 다른 일정 세포 유형이다. 그들은 인터루킨-1 (IL-1), IL-12, 및 IL-18, 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 인터페론 감마 (IFNγ), 또는 과립구-마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF)를 포함한다.

[0103] 특정 구현예에서, 산화 단백질 또는 산화 지질은 무균 염증에 관여되거나 또는 촉발시킨다. "무균 염증"은 임의의 미생물 부재 하에서 발생되고, 조직 손상에 반응하여 국소적으로 방출되는 손상-연관 분자 패턴 (DAMP)에 반응하여 유발되는 염증이다. DAMP는 일반적으로 면역계에 의해 감지되지 않지만, 조직 손상 시에 변경된 자기-분자로 방출되거나 또는 변형되는 세포내 및 세포외 숙주-유래 분자이다. 병원체-유도 염증과 유사하게, 무균 염증은 패턴 인식 수용체 (PRR)에 의한 DAMP의 인식을 통한 선천성 면역 반응의 활성화에 의해 촉발되어서, 사이토카인 및 케모카인의 증강된 분바를 야기한다. 막-결합된 PRR, 예컨대 Toll-유사 수용체

(TLR), 및 세포내 PRR, 예컨대 인플라마솜은 무균 염증의 핵심 매개인자이다. 인터루킨-1 (IL-1) 패밀리에 속하는 사이토카인은 무균 염증의 중요한 구동인자로 제안되었었다. 초기 손상 부위에서 증가된 사이토카인 및 케모카인은 궁극적으로 면역 세포, 예컨대 호중구 및 마크로파지의 증강된 동원을 야기한다. 무균 염증의 해결은 조직 복구 및 항상성의 재확립으로 이어져야만 한다. 미해결된 무균 염증은 중증 의학적 상태, 예컨대 자가면역 질환, 통풍, 알츠하이머 질환, 및 죽상동맥 경화증의 발생에 연루된다.

[0104] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 "산화-특이적 에피토프" (OSE)에 결합한다. 상기 산화-특이적 에피토프 (OSE)는 상기 정의된 바와 같이, 산화 단백질 또는 산화 지질에 존재한다.

[0105] 세포는 그의 생물학적 효과가 생산된 양에 의존적인 반응성 산소 종 (ROS)을 생산한다. 저농도에서, ROS는 증식, 분화 및 세포 물질대사에 관여되지만, 고농도에서, 미생물 제거를 촉진하는 호중구 세포외 트랩 (NET)의 형성에 관여된다. 일정 외생성 및 내생성 자극, 예컨대 염증에 반응하여, 이러한 균형이 파괴될 수 있고, DNA, RNA, 단백질 및 지질의 비가역적 변경을 초래하는 산화적 스트레스에 참여하는 ROS의 축적으로 이어질 수 있다. 산화적 스트레스의 주요한 결과는 지질 과산화로서, 이는 다수의 고도로 반응성인 분해 산물을 생성시키고, 이어서 지질, 아포단백질 및 단백질과 반응하여서, 안정한 공유 부가물을 형성하고, **"산화-특이적 에피토프" (OSE)**를 생성한다. OSE는 단백질과 공유적으로 회합되거나 또는 단리된 지질로서 인식될 수 있다. OSE의 예는 산화 인지질 (OxPL)을 포함한다. 고찰 및 예를 위해서, 예를 들어, 다음의 문헌을 참조한다: Binder et al, (2016) Nat Rev Immunol,16(8):485-97. OSE는 예컨대 산화된 포스파티딜콜린, 산화 카디올리핀 (OxCL), 산화 포스파티딜세린 (OxPS) 및 산화 포스파티딜에탄올아민 (OxPE)과 같은, 절두된 인지질을 갖는 단백질의 변형에 의해 생성될 수 있다. OSE의 다른 예는 말론디알데히드 (MDA) 에피토프, 2-(ω-카르복시에틸) 피롤 (CEP) 에피토프 및 4-히드록시노네날 (4-HNE) 에피토프를 포함한다.

[0106] OSE는 산화된 지단백질 및 죽은 세포 및 순환성 미세입자의 표면에서 보고되었고, 강건한 프로-염증성 반응을 촉발시키는 그들 능력이 입증되었다 (Tsiantoulas et al. (2015). Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies1. J. Lipid Res. 56, 440-448). 특히, PAMP ("Pathogen-Associated Molecular Pattern")로서 여겨지는, OSE의 PRR ("Pattern Recognition Receptor")에 의한 인식은 프로-염증성 사이토카인의 발현 및 세포 이펙터 예컨대 단핵구 및 마크로파지의 활성화를 유도하게 된다 (Miller et al. (2011). Oxidation-Specific Epitopes are Danger Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. Circ. Res. 108, 235-248.).

[0107] 염증 상태에서 그들 축적으로 인해서, OSE-변형된 단백질 또는 지질은 IL-2 모이어티를 염증성 조직으로 표적화하기 위해, 표적으로서 사용될 수 있다.

[0108] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 OSE에 결합하고, OSE는 말론디알데히드 (MDA) 에피토프; 2-(ω-카르복시에틸) 피롤 (CEP) 에피토프; 4-히드록시노네날 (4-HNE) 에피토프, 산화 인지질 (OxPL), 포스포콜린-함유 산화 인지질 (PC-OxPL), 산화 포스파티딜에탄올아민 (OxPE), 산화 포스파티딜세린 (OxPS) 또는 산화 카디올리핀 (OxCL)이다.

[0109] 바람직한 구현예에서, 표적화 모이어티는 산화 인지질 (OxPL)에 결합한다.

[0110] 바람직하게, 표적화 모이어티는 포스포콜린-함유 산화 인지질 (PC-OxPL)에 결합한다. 포스포콜린 헤드기를 갖는 산화 인지질은 고도로 프로-염증성 및 프로-죽종형성성인 것으로 확인되었고, 산화적 손상 및 염증에 의해 유도되어 그를 전파한다. 그들은 죽상 동맥 경화증, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 신병증, 다발성 경화증을 포함한 CNS 질환, 및 다양한 급성 및 만성 폐질환을 포함한, 광범위 염증성 질환에 존재한다.

[0111] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 항체 또는 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편이다.

[0112] 바람직한 구현예에서, 표적화 모이어티는 scFv 단편이다. 실제로, scFv 단편은 Fc 도메인이 결여되므로, 침묵화된 이펙터 기능을 갖는다.

[0113] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 E06 항체 또는 E06 항체 단편, 예컨대 E06 scFv; LR04 항체 또는 LR04 항체 단편, 예컨대 LR04 scFv; NA17 항체 또는 NA17 항체 단편, 예컨대 NA17 scFv; E014 항체 또는 E014 항체 단편, 예컨대 E014 scFv; MDA2 항체 또는 MDA2 항체 단편, 예컨대 MDA2 scFv; IK17 항체 또는 IK17 항체 단편, 예컨대 IK17 scFv; 및 LR01 항체 또는 LR01 항체 단편, 예컨대 LR01 scFv로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0114] 바람직한 구현예에서, 표적화 모이어티는 E06 항체 또는 E06 항체 단편, 예컨대 E06 항체의 Fab, Fab',

F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편, 또는 이의 기능성 변이체이다. E06은 산화된 포스포콜린 (PC) 헤드기에 결합하지만 정상 인지질에 결합하지 않는 아포리포단백질 E-결핍 마우스 (apoE-/-)로부터 클로닝된 천연 IgM 자가항체이다 (Friedman et al. (2001) Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids: Importance of Schiff base formation and Aldol condensation. J Biol Chem.;277:7010-7020). 흥미롭게도, E06은 B-1 세포 기원이고, 병독성 폐렴구균 감염에 대해 최적 보호를 제공하는 것으로 보고된 고전적인 "천연" 쥐 T15 항-PC 항체와 구조적으로 그리고 기능적으로 동일하다.

[0115] 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체이다.

[0116] 용어 "기능성 변이체" 또는 "유도체"는 항체 또는 이의 단편의 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않고, 하나 또는 몇개 아미노산의 결실, 치환 또는 삽입으로 표시되는 부모 서열과 상이한 서열을 의미한다. 바람직하게, 기능성 변이체는 천연 서열과 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 나타낸다.
항체 또는 이의 단편의 기능성 변이체는 기준 항체에 대해서 유사한 항원-결합 친화성을 보유한다 (예를 들어, 1 x 10-7 M, 10-8 M 미만, 바람직하게 1 x 10-9 또는 1 x 10-10 M 미만의 KD를 가짐). 결합 친화성은 용어 ka (결합 속도 상수), kd (해리 속도 상수), 또는 KD (평형 해리)로 정의된다. 전형적으로, 특히 결합은 항체에 대해 사용될 때 10-7 M 미만, 바람직하게 10-8 M 미만, 예를 들어, 10-9 M 또는 10-10 M 미만의 친화성 (KD) 값으로 이의 표적(들)에 특이적으로 결합 ("인식")하는 항체를 의미한다. 더 낮은 KD 값은 더 높은 결합 친화성 (즉, 더 강력한 결합)을 나타내므로, 10-9의 KD 값은 10-8의 KD 값에 비해서 더 높은 결합 친화성을 의미한다.

[0117] 특정 구현예에서, E06 scFv는

[0118] - SEQ ID NO:12로 표시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:12와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 가변 중쇄 (VH) 도메인; 및

[0119] - SEQ ID NO:11로 표시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:11과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 가변 경쇄 (VL) 도메인

[0120] 을 포함한다.

[0121] 특정 구현예에서, E06 scFv의 VH 도메인 및 VL 도메인은 아미노산 링커를 통해서 융합된다. 용어 "링커"는 5 내지 80개 아미노산, 바람직하게 5 내지 30개, 여전히 바람직하게 10 내지 20개 아미노산을 포함하는 (폴리)펩티드를 의미한다. 적합한 링커는 당분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 링커는 GGGGS (SEQ ID NO: 8) 반복부를 포함한다. 소형, 비극성 (예를 들어, Gly) 또는 극성 (예를 들어, Ser 또는 Thr) 아미노산으로 구성된 링커는 가요성을 제공하고, 연결되는 기능성 도메인의 이동성을 허용한다. 바람직한 구현예에서, 링커는 SEQ ID NO: 14의 링커이거나 또는 SEQ ID NO:14와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 링커이다.

[0122] 특정 구현예에서, E06 scFv 단편은 SEQ ID NO: 13으로 표시되는 바와 같은 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:13과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0123] 다른 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 LR04 항체 또는 LR04 항체 단편, 예컨대 LR04 항체의 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편, 또는 이의 기능성 변이체이다. LR04는 죽종형성성 식이 중인 쥐 Ldlr-/- 비장으로부터 클로닝된 MDA 에피토프에 대한 단일클론 IgM 항체이다 (Amir et al. Peptide mimotopes of malondialdehyde epitopes for clinical applications in cardiovascular disease. J Lipid Res. 2012;53:1316-1326).

[0124] 다른 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 NA17 항체 또는 NA17 항체 단편, 예컨대 NA17 항체의 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편, 또는 이의 기능성 변이체이다. NA17은 B-1 세포 재구성된 Rag1-/- 마우스의 비장으로부터 클로닝된, MDA--특이적 천연 mAb이다 (Chou et al. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. J Clin Invest. 2009;119(5):1335-1349).

[0125] 다른 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 E014 항체 또는 E014 항체 단편, 예컨대 E014 항체의 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편, 또는 이의 기능성 변이체이다. E014는 MDA-에피토프에 결합하는 것으로 확인

된, 죽상동맥경화증 Apoe-/- 마우스의 비장으로부터 클로닝된 단일클론 IgM NAb이다 (Palinski et al. (1996). Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. J. Clin. Invest. 98, 800-814).

[0126] 다른 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 MDA2 항체 또는 MDA2 항체 단편, 예컨대 MDA2 항체의 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편, 또는 이의 기능성 변이체이다. MDA2는 MDA-리신 에피토프에 특이적인 쥐 단일클론 IgG 유형 항체이다. 이것은 MDA-LDL, 및 다른 MDA-변형된 단백질에 특이적으로 결합한다 (Rosenfeld et al (1990). Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. Arteriosclerosis.;10:336-349).

[0127] 다른 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 IK17 항체 또는 IK17 항체 단편, 예컨대 IK17 항체의 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편, 또는 이의 기능성 변이체이다. IK17는 MDA-LDL 및 구리 OxLDL에 결합하는 인간 단일클론 IgG 항체 단편이다 (Shaw et al. (2001) Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol.;21:1333-1339). IK17은 MDA-LDL에 대한 높은 혈장 자가항체 적정가를 갖는 관상 동맥 질환을 갖는 환자 유래의 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리되었다. IK17은 인간 자가항체이므로, 개선된 약동학 및 감소된 면역학적 반응을 포함하여, 쥐 항체에 비해 잠재적 장점을 갖는다.

[0128] 다른 특정 구현예에서, 표적화 모이어티는 LR01 항체 또는 LR01 항체 단편, 예컨대 LR01 항체의 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv 단편, 또는 이의 기능성 변이체이다. LR01은 죽상동맥경화증 Ldlr-/- 마우스의 비장으로부터 단리된 배선-코딩된 NAb이다. LR01은 천연 카디오리핀이 아닌 산화 카디오리핀에 대해 유도되는 것으로 확인되었다 (Tuominen et al. (2006). A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 2096-2102).

[0129] ***이량체화 성질을 갖는 선택적 모이어티***

[0130] IL-2 모이어티 및 표적화 모이어티를 포함하는, 본 발명의 키메라 구성체는 다량체화 성질을 갖는 모이어티, 즉 다량체 단백질을 형성할 수 있는 단편 또는 모이어티를 임의로 포함할 수 있다.

[0131] 바람직하게, IL-2 모이어티 및 표적화 모이어티를 포함하는, 본 발명의 키메라 구성체는 이량체화 성질을 갖는 모이어티, 즉, 이량체 단백질을 형성할 수 있는 단편 또는 모이어티를 임의로 포함할 수 있다.

[0132] 예를 들어, 키메라 구성체는 상이한 수의 키메라 구성체를 함유하는, 적어도 하나의 이량체, 예를 들어, 동종이량체 또는 이종이량체, 삼량체, 사량체 또는 임의의 다량체를 형성하는 능력을 갖는 IgG의 Fc 단편, 또는 이의 기능성 변이체를 더 포함할 수 있다.

[0133] 특정 구현예에서, IL-2 모이어티 및 표적화 모이어티를 포함하는, 본 발명의 키메라 구성체는 이량체 단백질을 형성할 수 있는 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체를 임의로 포함할 수 있다.

[0134] *C4BPβ 또는 C4BPβ 단편*

[0135] C4BP 단백질은 응고 및 보체 시스템에 관여된다. C4BP의 주요 형태는 7개의 동일한 75 kD 알파 사슬 및 하나의 45 kD 베타 사슬로 구성된다. 알파 및 베타 사슬은 각각 8개 및 3개 SCR (short consensus repeat) 도메인을 함유하고, 그들 모티프는 많은 보체-조절 단백질에서 발견되며 베타 시트로 구조화되는 50-70개 아미노산으로 구성된다. 인간 C4BP의 베타 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:3으로 표시된다.

[0136] 이러한 폴리펩티드 서열에 상응하는 핵산 서열은 또한 Hillarp 및 Dahlback (1990, PNAS, vol 87, pp 1183-1187)에 의해 기술되어 있다. C4BP 단백질의 중합에서 알파 사슬의 역할은 Kask 등 (Biochemistry 2002, 41, 9349-9357)에 의해 연구되었다. 저자들은 알파 사슬의 C-말단 부분, 특히 이의 나선형 구조 및 2개 시스테인의 존재가 알파 사슬이 이종성 시스템에서 발현될 때 C4BP 단백질의 중합에 필수적이라는 것을 보여주었다.

[0137] 유럽 특허 출원 제2 227 030호는 관심 폴리펩티드와 융합된 C4BP 단백질의 알파 및 베타 사슬의 C-말단 단편을 사용한 이종다량체 재조합 단백질의 생산을 기술한다. 미국 특허 제7,884,190호는 이량체 단백질의 생산을 위해 C4BP 단백질의 알파 사슬과 관련하여 이의 사용과 독립적으로, C4BP 단백질의 베타 사슬의 사용을 기술한

다.

[0138] 본 발명을 수행하기 위해 사용되는 C4BP 단백질은 유리하게 인간 C4BP 단백질이다.

[0139] 바람직한 구현예에서, 키메라 구성체는 적어도 아미노산 194 내지 252 (SEQ ID NO: 4)를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 C4BPβ 사슬의 단편을 포함한다.

[0140] 베타 사슬의 더 긴 단편, 또는 심지어 전체 베타 사슬을 코딩하는 서열이 또한 사용될 수 있다. 일정 적용을 위해서, 응고에 참여하는 S 단백질에 결합할 수 있는 베타 사슬을 코딩하는 서열의 사용을 피하는 것이 바람직하다. 선택된 서열이 베타 사슬의 2개의 처음 SCR 모티프를 함유하는 단편을 코딩하는 경우에, 이들은 바람직하게 S 단백질과 상호작용의 가능성을 차단하기 위해 아미노산의 첨가, 결실 또는 치환에 의해 돌연변이된 버전일 것이다. SCR 모티프 및/또는 [GS] 도메인은 수득된 융합 폴리펩티드의 가요성을 변형, 예를 들어, 증가시키려는 목적으로, 또는 키메라 단백질이 다량체, 특히 이량체를 형성하기에 적합한 입체배열을 채택하도록 허용하기 위해서 첨가될 수 있다.

[0141] N-말단에서 최대로 아미노산 135까지 연장되는 C4BPβ의 더 긴 단편이 사용될 수 있다.

[0142] 특정 구현예에서, C4BPβ 사슬의 단편은 적어도 아미노산 185 내지 252, 180 내지 252, 175 내지 252, 170 내지 252, 165 내지 252, 160 내지 252, 155 내지 252, 150 내지 252, 145 내지 252, 140 내지 252, 또는 135 내지 252 (SEQ ID NO:3에 대함)을 포함할 수 있거나 또는 그로 이루어질 수 있다.

[0143] 특정 구현예에서, C4BPβ 사슬의 단편은 적어도 아미노산 137 내지 252 (SEQ ID NO: 5)를 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0144] C4BPβ의 기능성 변이체가 사용될 수 있다. 기능성 변이체는 상이한 수의 키메라 단백질을 함유하는, 적어도 하나의 이량체, 예를 들어 동종이량체 또는 이종이량체, 삼량체, 사량체 또는 임의의 다량체를 형성하는 능력을 유지하였다.

[0145] 본 발명의 문맥 내에서, 용어 "C4BPβ 사슬의 단편의 기능성 변이체"는 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 첨가에 의해서 베타 사슬의 단편의 서열에 대해 변형된 폴리펩티드 서열을 의미하고, 상기 변형된 서열은 그러나, 본 발명의 방법을 사용해 적어도 이량체 단백질을 형성하는 능력을 유지한다. 보다 정확하게, 단편의 기능성 변이체를 코딩하는 서열을 사용한 이량체 단백질의 생산은 동일한 발현 시스템에서 단편을 코딩하는 천연 서열 (SEQ ID NO: 3, 또는 이의 단편)을 사용해 수득된 것과 적어도 80% 동일할 수 있다 (바람직하게 적어도 90%, 여전히 바람직하게 95%). 바람직하게, 변이체는 이것을 함유하는 융합 단백질의 80% 초과가 본 발명에 따라서 진핵생물 발현 시스템에서 이량체의 형태로 생산되도록 한다.

[0146] 특정 구현예에서, 베타 사슬의 단편의 변이체는 Hillarp 및 Dahlback (1990, PNAS, Vol. 87, pp 1183-1187)이 기술한 바와 같이, 단편을 코딩하는 야생형 서열과 엄격 조건 하에서 혼성화할 수 있는 핵산에 의해 코딩된다.

[0147] 용어 "엄격 조건"은 약 65℃에서, 예를 들어, 6*SSC, 0.5% SDS, 5* 덴하르트 용액 및 100 μg의 비특이적 DNA의 용액 또는 동등한 이온 강도를 갖는 임의의 다른 용액 중에서, 2개의 단일 가닥 DNA 서열의 특이적 혼성화, 및 65℃에서, 예를 들어, 최대로 0.2*SSC 및 0.1% SDS의 용액 또는 동등한 이온 강도를 갖는 임의의 다른 용액 중에서 이후 세척을 허용하는 조건을 의미한다.

[0148] 바람직하게, 상기 야생형 단편의 기능성 변이체를 코딩하고, 상기 단편을 코딩하는 서열과 엄격 조건에서 혼성화하는 뉴클레오티드 서열은 혼성화 부분에서, 단편을 코딩하는 서열의 길이의 적어도 50%, 바람직하게 적어도 80%의 길이를 갖는다. 특정 구현에서, 상기 단편의 기능성 변이체를 코딩하고, 상기 단편을 코딩하는 서열과 엄격 조건 하에서 혼성화하는 뉴클레오티드 서열은 혼성화 부분에서, 상기 단편을 코딩하는 서열과 실질적으로 동일한 길이를 갖는다.

[0149] 추가 구현에서, 기능성 변이체는 이량체화 기능에 본질적이지 않은, 하나 이상의 아미노산이 제거 또는 치환되었고/되었거나 이량체화에 필수적인 하나 이상의 아미노산이 동등한 작용기를 갖는 아미노산으로 치환 (보존성 치환)된 야생형 단편의 변형된 서열이다. 위치 201 및 215에 위치된 2개 시스테인, 및 이들 시스테인 주변의 펩티드 구조는 예를 들어, 각 시스테인의 상류 및 하류의 적어도 3개 아미노산의 보존에 의해서, 이량체화에 필수적인 디술피드 가교의 형성을 허용하도록 보존되는 것이 특히 권장된다. 특히, 기능성 변이체는 이량체화를 담당하는 시스테인 사이에, 베타 사슬의 이종성 서열, 및 특히 C4BP의 알파 사슬의 도메인을 삽입시켜서, 또는, 대조적으로, 동일한 시스테인 사이에 존재하는 일정 아미노산의 제거에 의해서 수득될 수 있다. 대안적으로, 기능성 변이체는 일정 아미노산의 점 변형, 특히 이량체화 과정에 연루되는 것으로 여겨지는 중성 아미

노산 (예를 들어, 아미노산 A, V, F, P, M, I, L 및 W)으로 이량체화를 담당하는 시스테인의 치환 및 동시에 시스테인 간에 현수선내 및/또는 현수선간 디술피드 가교를 형성하는 능력을 보존하도록 시스테인으로 다른 아미노산을 치환시켜서 생산될 수 있다. 따라서 이들 변형은 다량체화 과정, 특히 이량체화에 관여되는 다양한 시스테인 간 거리의 변동을 야기한다.

[0150] 바람직하게, 194 내지 252 단편의 아미노산의 50% 미만, 바람직하게 25% 미만 또는 심지어 10% 미만 (예를 들어, 5개 이하의 아미노산) 또는 5% 미만 (예를 들어, 1 또는 2개 아미노산)이 제거되거나 또는 대체된다.

[0151] 특정 구현예에서, 기능성 변이체는

[0152] a) 단편 (바람직하게 194 - 252 단편)의 아미노산의 25% 미만, 바람직하게 10% 미만이 절단되었거나 또는 치환되었고, 위치 202 및 216 (SEQ ID NO: 3에 대해 번호매김됨)에 위치된 시스테인을 비롯하여 각 시스테인의 상류 및 하류의 적어도 3개 아미노산은 보존된 것인, C4BPβ의 단편 (바람직하게 194 - 252 단편)의 변형된 서열; 또는

[0153] b) 이량체화를 담당하는 시스테인이 바람직하게 알라닌, 발린, 페닐알라닌, 프롤린, 메티오닌, 이소류신, 류신 및 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 단편의 다른 아미노산은 시스테인으로 치환되는 것인, C4BPβ의 단편 (바람직하게 194 - 252 단편)의 변형된 서열; 또는

[0154] c) 이량체화를 담당하는 시스테인 사이에, 베타 사슬에 이종성인 서열의 삽입에 의해 변형된, C4BPβ의 단편 (바람직하게 194 - 252 단편)의 서열; 또는

[0155] d) 이량체화를 담당하는 시스테인 사이의 아미노산을 절단하여 변형된, C4BPβ의 단편 (바람직하게 194 - 252 단편)의 서열

[0156] 을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0157] ***키메라 구성체***

[0158] 바람직하게, 키메라 구성체의 IL2 모이어티 및 표적화 모이어티는 서로 융합된다. IL2 모이어티는 표적화 모이어티의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 바람직한 구현예에서, IL-2 모이어티는 표적화 모이어티의 N-말단에 융합된다. 바람직하게, IL-2 모이어티의 C-말단은 표적화 모이어티의 N-말단에 융합된다.

[0159] IL2 모이어티 및 표적화 모이어티는 인 프레임 (직접적으로) 또는 아미노산 링커, 바람직하게 폴리G 링커를 통해서 융합될 수 있다. 본 발명의 문맥에서, 용어 "링커"는 5 내지 80개 아미노산, 바람직하게 5 내지 30개, 여전히 바람직하게 10 내지 20개 아미노산을 포함하는 (폴리)펩티드를 의미한다. 적합한 링커는 당분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 링커는 GGGGS (SEQ ID NO: 8) 반복부를 포함하지만, 당업자는 일반 권장사항을 따르는 다른 서열 (Argos, 1990, J Mol Biol. 20;211(4):943-58; George R, Heringa J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. Protein Eng. 2002;15:871-879)이 또한 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 소형, 비극성 (예를 들어, Gly) 또는 극성 (예를 들어, Ser 또는 Thr) 아미노산으로 구성된 링커는 가요성을 제공하고, 연결되는 기능성 도메인의 이동성을 허용한다.
바람직한 구현예에서, IL2 모이어티 및 표적화 모이어티는 SEQ ID NO: 14의 링커, 또는 SEQ ID NO:14와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 링커를 통해서 연결된다.

[0160] 특정 구현예에서, 키메라 구성체는 상기 기술된 바와 같이, 예컨대 C4BPβ 또는 이의 기능성 단편과 같이, 이량체화 성질을 갖는 모이어티를 더 포함한다. 이러한 키메라 구성체는 하기에 기술되는 바와 같이, 바람직하게 동종이량체를 형성하거나, 또는 이종이량체를 생산하는데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, (i) IL2 모이어티, (ii) 표적화 모이어티, 및 (iii) 이량체화 성질을 갖는 모이어티는 인 프레임 (직접적으로) 또는 아미노산 링커(들)를 통해서, 서로에 융합된다.

[0161] 바람직한 구현예에서 IL-2 모이어티는 C4BPβ 또는 상기 이의 기능성 단편의 N-말단에서 융합된다. 바람직하게, IL-2 모이어티는 C4BPβ 또는 상기 이의 기능성 단편의 N-말단에서, 아미노산 링커, 바람직하게 폴리G 링커를 통해 융합된다. 일부 구현예에서, IL-2 모이어티는 GGGGS (SEQ ID NO: 8) 반복부를 포함하는 링커를 통해서, 바람직하게 SEQ ID NO: 14의 링커를 통해서, 또는 SEQ ID NO:14와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 링커를 통해서, C4BPβ 모이어티에 융합된다.

[0162] 특정 구현예에서, C4BPβ 모이어티에 융합된 IL-2 모이어티에 상응하는 아미노산 서열 ("IL2-C4BPβ")은 SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:10을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0163] 바람직한 구현예에서 IL-2 모이어티의 C-말단은 C4BPβ 또는 상기 이의 기능성 단편의 C-말단에서 융합되고, C4BPβ 또는 상기 이의 단편의 C-말단은 표적화 모이어티의 N-말단에 연결된다.

[0164] 특정 구현예에서, 키메라 구성체는 N-말단에서 C-말단으로

[0165] - IL-2 모이어티;

[0166] - 임의로 링커; 및

[0167] - 표적화 모이어티를 포함한다.

[0168] 바람직한 구현예에서, 키메라 구성체는 N-말단에서 C-말단으로

[0169] - IL-2 모이어티;

[0170] - 임의로 링커;

[0171] - 예컨대 C4BPβ 또는 이의 기능성 단편과 같은, 이량체화 성질을 갖는 모이어티;

[0172] - 임의로 링커; 및

[0173] - 표적화 모이어티를 포함한다.

[0174] 바람직한 구현예에서, 키메라 구성체는 SEQ ID NO:15 내지 20의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지거나, 또는 SEQ ID NO:15 내지 20과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 바람직한 구현예에서, 키메라 구성체는 SEQ ID NO:15 또는 SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지거나, 또는 SEQ ID NO:15 또는 SEQ ID NO:17과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0175] 다른 특정 구현예에서, 키메라 구성체는 N-말단에서 C-말단으로

[0176] - 표적화 모이어티;

[0177] - 임의로 링커; 및

[0178] - IL-2 모이어티를 포함한다.

[0179] 바람직한 구현예에서, 키메라 구성체는 N-말단에서 C-말단으로

[0180] - 표적화 모이어티;

[0181] - 임의로 링커;

[0182] - 예컨대 C4BPβ 또는 이의 기능성 단편과 같은, 이량체화 성질을 갖는 모이어티;

[0183] - 임의로 링커; 및

[0184] - IL-2 모이어티를 포함한다.

[0185] ***동종이량체 및 이종이량체 구성체***

[0186] 본 명세서는 재조합 이량체 단백질을 제조하기 위한 방법을 기술하고, 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0187] a) i) 적어도 하나의 인터루킨 2 (IL2) 모이어티, ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 모이어티, 예컨대 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체, 및 iii) 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티를 포함하는 융합 폴리펩티드인 키메라 구성체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 벡터로 숙주 세포를 형질감염시키는 단계;

[0188] b) 융합 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 발현하고, 이량체 단백질의 형성을 위한 생체내 2개 융합 폴리펩티드의 공유 회합에 적합한 조건 하에서 형질감염된 세포를 배양하는 단계;

[0189] c) 형성된 이량체 단백질을 회수, 바람직하게 정제하는 단계.

[0190] 형질감염된 세포는 바람직하게 C4BP 단백질의 중합에 관여되는 C4BP 단백질의 알파 사슬의 C-말단 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 임의 핵산을 함유하지 않는다.

[0191] 특정 구현예에서, 본 명세서는 이종이량체를 제조하기 위한 방법을 기술하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0192] a. i. i) 적어도 하나의 인터루킨 2 (IL2) 모이어티, 및 ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 모이어티, 예컨대 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체를 포함하는, 제1 융합 폴리펩티드; 및

[0193] ii. i) 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티, 예컨대 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체, 및 ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 모이어티, 예컨대 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체를 포함하는, 제2 융합 폴리펩티드

[0194] 를 코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 하나 이상의 벡터로 숙주 세포를 형질감염시키는 단계;

[0195] b. 제1 및 제2 융합 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 서열들을 발현하고 이종이량체 단백질의 형성을 위한 생체내 2개 융합 폴리펩티드의 회합에 적절한 조건 하에서 형질감염된 세포를 배양하는 단계;

[0196] c. 형성된 이종이량체 단백질을 회수, 바람직하게 정제하는 단계.

[0197] 특정 구현예에서, 본 명세서는 이종이량체를 제조하기 위한 방법을 기술하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0198] a. i. i) 적어도 하나의 인터루킨 2 (IL2) 모이어티, ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 모이어티, 예컨대 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체, 및 iii) 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티, 예컨대 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체를 포함하는 제1 융합 폴리펩티드; 및

[0199] ii. i) 적어도 하나의 이종성 폴리펩티드로서, 제1 융합 폴리펩티드의 인터루킨 2 (모이어티)와 상이한 것으로 정의되는 것인 이종성 폴리펩티드, ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 모이어티, 예컨대 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체, 및 iii) 임의로 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티 예컨대 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체를 포함하는, 제2 융합 폴리펩티드

[0200] 를 코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 하나 이상의 벡터로 숙주 세포를 형질감염시키는 단계;

[0201] b. 제1 및 제2 융합 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 서열들의 발현 및 이종이량체 단백질의 형성을 위한 생체내 2개 융합 폴리펩티드의 회합에 적합한 조건 하에서 형질감염된 세포를 배양하는 단계;

[0202] c. 형성된 이종이량체 단백질을 회수, 바람직하게 정제하는 단계.

[0203] 바람직하게, 제2 융합 폴리펩티드에서, C4BPβ 또는 상기 단편은 이종성 폴리펩티드의 C-말단부에 융합된다.

[0204] 이종성 폴리펩티드를 언급할 때 용어 "상이한"은 제1 융합 폴리펩티드의 인터루킨 2 (모이어티)의 1차 서열과 적어도 하나의 아미노산이 상이한 1차 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 대안적으로, 용어 "상이한"은 또한 동일한 1차 서열을 갖지만, 예를 들어, 아세틸화, 아미드화, 바이오틴화, 카르복실화, 히드록실화, 메틸화, 인산화 또는 술페이트화의 관점에서, 또는 지질 (이소프레닐화, 팔미토일화, 및 미리스토일화), 글루시드 (글리코실화) 또는 폴리펩티드 (유비퀴틴화)를 첨가하여, 상이한 번역후 변형을 갖는 이종성 폴리펩티드를 포괄한다.

[0205] 바람직한 구현예에서, 이종성 폴리펩티드는 IL2가 아니다.

[0206] 이러한 이종이량체 단백질은 또한 본 발명의 일부이다.

[0207] 특정 구현예에서, 숙주 세포는 2개 융합 폴리펩티드로서, i) 적어도 하나의 인터루킨 2 (IL2) 모이어티, ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체, 및 iii) 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티, 예컨대 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체를 포함하는, 제1 융합 폴리펩티드 A; 및 i) 적어도 하나의 인터루킨 2 (IL2) 모이어티, ii) 이량체 단백

질을 형성할 수 있는 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체, 및 iii) 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티 예컨대 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체를 포함하는, 제2 융합 폴리펩티드 A의 공-발현을 허용한다. 이러한 특정 구현예에서, 2개 융합 폴리펩티드의 공-발현은 또한 동종이량체 A-A의 생산을 허용할 수 있다.

[0208] 특정 구현예에서, 숙주 세포는 2개 융합 폴리펩티드로서, i) 적어도 하나의 인터루킨 2 (IL2) 모이어티, ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체, 및 iii) 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티 예컨대 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체를 포함하는, 제1 융합 폴리펩티드 A; 및 i) 적어도 하나의 이종성 폴리펩티드, ii) 이량체 단백질을 형성할 수 있는 C4b-결합 단백질의 베타 사슬 (C4BPβ) 또는 이의 적어도 하나의 단편 또는 기능성 변이체, 및 iii) 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 표적화 모이어티, 예컨대 E06 scFv 또는 이의 기능성 변이체를 포함하는, 제2 융합 폴리펩티드 B의 공-발현을 허용하고; 이종성 폴리펩티드는 제1 융합 폴리펩티드의 인터루킨 2 (모이어티)와 상이한 것으로 정의된다. 이러한 특정 구현예에서, 2개 융합 폴리펩티드의 공발현은 또한 동종이량체 A-A 및 B-B의 생산 및 이종이량체 A-B의 생산을 허용할 수 있다.

[0209] 또한 상기 정의된 바와 같은 이량체 또는 이종이량체 단백질의 합성을 허용하고, 상기 정의된 제조 방법의 단계 a)를 수행하여 수득가능한 재조합 진핵생물 세포를 제공한다. 숙주 세포에서의 생산에 대한 보다 상세한 사항은 하기에 기술된다.

[0210] ***제조 방법***

[0211] 융합 단백질, 및 동종이량체 또는 이종이량체의 형태인, 키메라 구성체는 RNA 분자에 의해서 또는 적합한 발현 벡터에서 DNA 재조합 기술에 의해서 생산될 수 있다.

[0212] 발현 벡터는 구성체가 도입되는 숙주 세포의 기능에 따라서 선택된다. 바람직하게, 발현 벡터는 진핵생물 세포에서 발현을 허용하는 벡터, 특히 염색체 벡터 또는 에피솜 벡터 또는 바이러스 유도체, 특히 플라스미드, 효모 염색체, 또는 바이러스, 예컨대 배큘로바이러스, 파포바이러스 또는 SV40, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 또는 이의 조합으로부터 유래되는 벡터, 특히 파지미드 및 코스미드로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 곤충 세포를 감염시킬 수 있는, 배큘로바이러스의 발현을 허용하는 벡터이다.

[0213] 필요한 경우에, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 또한 바람직하게 이의 5' 부분에, 융합 폴리펩티드의 분비를 위한 신호 펩티드를 코딩하는 서열을 포함한다. 통상적으로, 신호 펩티드의 서열은 소수성 아미노산 (Phe, Leu, Ile, Met 및 Val)이 풍부한, 15 내지 20개 아미노산의 서열이다.

[0214] 벡터는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 발현에 필요한 모든 서열을 포함한다. 특히, 구성체를 도입시키려는 숙주 세포의 기능에 따라서 선택되는, 적합한 프로모터를 포함한다.

[0215] 본 발명의 문맥 내에서, 용어 "숙주 세포"는 세포에 대해 이종성이고, 형질감염 방법에 의해 세포의 게놈에 도입된 핵산에 의해 운반되는 유전자를 발현할 수 있는 세포를 의미한다.

[0216] 바람직하게, 숙주 세포는 진핵생물 세포이다. 진핵생물 숙주 세포는 특히 효모 세포 예컨대 에스. 세레비지아에 (S. cerevisiae), 사상성 진균 세포 예컨대 아스퍼질러스 (Aspergillus) sp, 곤충 세포, 예컨대 드로소필라 (Drosophila)의 S2 세포 또는 스포돕테라 (Spodoptera)의 sf9, 포유동물 세포, 및 식물 세포로부터 선택된다. 특히 언급될 수 있는 포유동물 세포는 포유동물 세포주 예컨대 CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, HepG2 또는 L(TK-) 세포이다. 바람직한 구현에서, 상기 숙주 세포는 진핵생물 세포주, 바람직하게 Sf9 곤충 세포로부터 선택된다. sf9 곤충 세포에서 재조합 이량체 단백질을 제조하기 위한 방법은 미국 특허 제7,884,190호에 기술된다. 이종성 핵산을 발현하는 세포의 생산을 위해 당업자에게 공지된 임의의 형질감염 방법이 방법의 단계 (a)를 수행하는데 사용될 수 있다. 형질감염 방법은 예를 들어, 다음의 문헌에 기술된다: Sambrook et al, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

[0217] 대안적으로, 키메라 구성체는 화학 펩티드 합성에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 올바른 디술피드 가교를 갖는 단백질의 완전한 서열을 산출하도록 이후에 조립되는 보다 짧은 펩티드의 병행 합성을 통해서 생산될 수 있다. IL-2의 합성은 예를 들어, 그 개시가 본 명세서에 참조로 편입되는, 하기 문헌에 예시되어 있다: Asahina et al., Angewandte Chemie International Edition, 2015, Vol.54, Issue 28, 8226-8230.

[0218] 다른 구현예에서, 키메라 단백질은 상기 키메라 단백질을 코딩하는 핵산을 대상체에게 투여한 후에, 생체내에서

발현될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 핵산은 RNA 또는 바이러스 벡터, 예컨대 아데노바이러스-연관 바이러스 (AAV)에 의해 운반된다.

[0219] ***제제 및 투여 경로***

[0220] 또한 바람직하게 약학적으로 허용가능한 비히클, 담체 또는 부형제와 회합되어 (예를 들어, 용액, 현탁액, 또는 혼합물 중에), 본 명세서에 기술된 바와 같은 키메라 구성체, 핵산, 벡터 또는 단백질을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0221] 적합한 부형제는 임의의 등장성 용액, 염수 용액, 완충 용액, 서방형 제제 등을 포함한다. 액상, 동결건조, 또는 분무-건조 조성물이 당분야에 공지되어 있고, 수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액으로서 제조될 수 있다. 바람직하게 약학 조성물은 적절한 안정화제, 완충제, 증량제, 또는 조합을 포함한다.

[0222] 약학 조성물은 다른 활성 성분을 추가로 함유할 수 있거나, 또는 임의의 다른 활성 성분과 조합하여 투여될 수도 있다.

[0223] 약학 조성물은 비경구, 예를 들어, 피내, 피하, 또는 비내 경로를 포함하는, 임의의 편리한 경로를 사용해 투여될 수 있다. 피하 경로가 바람직하다. 경구, 설하 또는 구강 투여가 또한 포괄된다.

[0224] 피하 주사에 적합한 제제의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO2017/068031에 기술된다.

[0225] ***자가-면역 및/또는 염증성 장애의 치료***

[0226] 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 자가-면역 및/또는 염증성 장애, 예컨대 전신 홍반성 루푸스, I형 당뇨병, HCV-관련 혈관염, 포도막염, 근염, 전신 혈관염, 건선, 알레르기, 천식, 크론병, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 죽상 동맥 경화증, 자가면역 갑상선 질환, 자가-염증성 질환, 알츠하이머병 및 근위축성 측삭 경화증을 포함한, 신경-퇴행성 질환, 급성 및 만성 이식편 대 숙주 질환, 자연 유산 및 동종이식 거부증; 고형 장기 이식 거부, 혈관염, 염증성 장 질환 (IBD), 및 알레르기성 천식; 척추관절염 또는 강직성 척추염; 쇼그렌 증후군, 전신 경화증, 원형 탈모증, 또는 궤양성 대장염을 치료하는 방법에서 유용하다.

[0227] 또한, Treg 조직 재생 성질의 활성화가 바람직한 병태, 예컨대 근육 질환, 신경퇴행, 심장 또는 다른 조직 경색에서 적합하다.

[0228] 바람직한 구현예에서, 본 명세서는 자가-면역 및/또는 염증성 장애의 치료 방법을 기술하고, 방법은 조성물을 1주에 1회 또는 2회, 또는 심지어 1개월에 1회 또는 2회, 바람직하게 피하 경로를 통해 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 30 MIU/일 미만, 바람직하게 20 MIU/일 미만의 용량이 바람직하고, 유리하게 10 MIU/일 미만, 또는 1 MIU/일과 8 MIU/일 사이의 용량이다. 다른 특정 구현예에서, 1 MIU/일과 5 MIU/일 사이의 용량, 바람직하게 0.1 내지 3.5 MIU/일의 용량이 사용된다.

[0229] 일반적으로, Treg 수의 1.2-배, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 5-배 증가를 허용하는 용량이 바람직하다. IL-2 양의 표준 척도는 국제 단위 (IU)로서, 기술적으로 고정된 중량이 아니라, 세계 보건 기구 (World Health Organization) (WHO)가 결정한, 특정 세포 증식 어세이에서 고정된 생물학적 효과를 생성하는 양이다. 이유는 i) 중량은 분자의 정확한 서열 및 이의 글리코실화 프로파일에 따라서 가변적이고, ii) 중요한 것은 분자의 중량이 아니라, 활성이기 때문이다.

[0230] 구제 단위의 원칙은 정확하게 임의의 IL-2 분자를 비교할 수 있는 표준을 제공하는 것이다 (야생형 또는 활성 변이체 서열을 포함하여, 그들 서열, 또는 그들 출처와 무관함).

[0231] 실제로, WHO는 이의 역가에 의해 정의되는 IL-2의 소정 조제물의 용량 (역시 상기 IL-2의 서열 또는 출처와 무관)을 결정하기 위한 기준으로서 제공되고 보정된 IL-2 분자를 함유하는 앰플을 제공한다. 예를 들어, IL-2의 소정 조제물의 용량을 결정하기 위해서, 후보 IL-2 조제물의 생물학적 활성은 IL-2 의존적 세포주, 예컨대 CTLL-2를 사용한 표준 세포 증식 어세이에서 측정되고, 표준의 생물학적 활성과 비교된다. 세포는 상이한 용량의 표준 존재 하에서 성장된다. IL-2의 용량-반응 효과가 확립되는데, 여기서 IL-2의 용량은 IU로서 X 축 상에 그래프화되고, 증식의 측정 (pr)은 Y 축에 표시된다. 미지 활성의 임의의 IL-2 생성물의 활성을 결정하기를 원할 때, 생성물은 IL-2 의존적 세포를 성장시키는데 사용되고, 증식을 측정한다. 이어서 pr 값은 Y 축에 그래프화되고, 그 값으로부터, X 축에 평행한 선이 그려진다. 이 선과 용량 반응선의 교차점으로부터, Y 축에 평행한 선이 그려진다. X 축과 이의 교차점은 IU로서 후보 IL-2 생성물의 활성을 제공한다.

[0232] WHO 표준 앰플의 임의 변화는 국제 단위 또는 임의의 IL-2 조제물의 용량 결정에 영향을 미치지 않는다.

[0233] 제1 표준 (WHO 국제 표준 코드86/504, 1987년)은 Jurkat 세포로부터 유래되는 정제된 글리코실화 IL-2를 함유하였고, 100 IU/앰풀의 역가가 임의로 배정되었다. 제1 국제 표준 (IS)의 재고가 부족해 지면서, WHO를 이를 대체해야만 했다. WHO는 이번에는 이. 콜라이를 사용해 생산된, 다른 보정된 IL-2 앰풀을 제공하였다. 제2 표준 앰풀은 앰풀 당 210 IU의 생물학적 활성을 함유하였다. 표준 앰풀의 변화는 IU 변화를 의미하지 않는다. 따라서, 시험 IL-2 조제물의 용량 결정은 기준으로서, 제1 표준 앰풀 또는 제2 표준 앰풀, 또는 이후 표준 앰풀을 사용하건 간에 가변적이지 않다.

[0234] 일 구현예에서, 3일 마다 1회 내지 3개월 마다 1회 투여 단계를 포함하는, 만성 투여가 실행된다. 이러한 투여 순서는 필요하다면 반복될 수 있다.

[0235] 다른 구현예에서, IL-2는 3일 내지 3개월, 바람직하게 1주 내지 4주 동안 지속될 수 있는 투여 중단 이후에 반복될 수 있는 주기로, 1주 내지 2주 동안 2일마다 제공된다.

[0236] 다른 구현예에서, 치료는 유도 과정으로도 지정되는 제1 과정, 및 유지 과정인 제2 과정을 포함할 수 있다.

[0237] 특정 구현예에서, 치료는 적어도 제1 과정을 포함할 수 있는데, 약학 조성물은 적어도 약 연속 2일 또는 3일 동안, 바람직하게 연속 3일 내지 7일 동안, 여전히 바람직하게 연속 4일 내지 5일 동안 1일 1회 투여되고, 바람직하게 예를 들어 약 6일 또는 약 1주 내지 약 4주 이후에, 유지 용량이 후속된다.

[0238] 유지 용량은 전형적으로 적어도 1개월, 바람직하게 적어도 약 3개월, 여전히 바람직하게 적어도 약 6개월 동안 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 유지 용량은 약 3개월과 약 12개월 사이, 바람직하게 약 6개월과 약 12개월 사이에 투여된다.

[0239] 바람직한 구현예에서, 유지 치료는 1주에 1회 또는 2회, 또는 1주 또는 2주마다, 또는 1개월에 1회의 약학 조성물의 투여로 이루어진다.

[0240] 바람직한 구현예에서, 유지 치료는 적어도 1개월, 바람직하게 약 3개월 내지 약 12개월의 기간 동안 1주에 1회 또는 2회, 1주 또는 2주마다, 또는 1개월에 1회의 인터루킨-2의 투여로 이루어진다.

[0241] 바람직하게 유지 용량은 제1 과정 용량과 실질적으로 동일하거나, 또는 더 낮거나 또는 더 높은 용량일 수 있다.

[0242] ***암의 치료***

[0243] 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 암을 치료하는 방법에서 유용하다. 일부 구현예에서, 대상체는 국소 진행성 또는 전이성 암을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 암은 고형 종양이다. 일부 구현예에서, 암은 결장암, 폐암, 난소암, 위암, 방광암, 췌장암, 자궁내막암, 유방암, 신장암, 식도암, 또는 전립선암이다. 일 구현예에서, 30 MIU/일 미만, 바람직하게 20 MIU/일 미만의 용량이 바람직하고, 유리하게 10 MIU/일 미만, 또는 3 MIU/일과 5 MIU/일 사이이다. 다른 구현예에서, 400,000-750,000 IU/kg 또는 550,000-750,000 IU/kg, 바람직하게 600,000-700,000 IU/kg의 IL2가 투여된다. 용량은 PROLEUKIN®에 대한 처방과 유사할 수 있지만, 그 미만으로 예상된다.

[0244] 조성물은 2일마다 1회를 포함하여, 1일 당 1회 이상 내지 1주 당 1회 이상으로, 1회 투여될 수 있다. 당업자는 질환의 중증도, 이전 치료, 대상체의 전반적인 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 일정 인자들이 대상체를 효과적으로 치료하는데 필요한 용량 및 시기에 영향을 미칠 수 있다는 것을 이해할 것이다. 게다가, 대상체의 치료는 단일 치료를 포함할 수 있거나, 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0245] 자가-면역 및/또는 염증성 장애와 관련하여 상기 기술된 프로토콜의 예는 암의 치료에서 사용을 위해 동일하게 또는 유사하게 적용될 수 있다. 대안적으로, 다른 예에서, 조성물은 5일 동안 8시간 마다 투여될 수 있고, 이어서 2일 내지 14일, 예를 들어, 9일의 휴약 기간이 이어진 다음에, 8시간 마다 투여의 추가 5일이 후속된다. 일부 구현예에서, 투여는 4일마다 투여되는 3회 용량이다.

[0246] **실시예**

[0247] **실시예 1: 시험관내 및 생체내 표적화**

[0248] **재료 및 방법**

[0249] **융합 단백질**

[0250] 렌티바이러스 벡터는 IL-2 융합 단백질 및 표적화 단백질의 생산에 사용되었다. 간략하게, 포스포콜린 산화 지질에 결합할 수 있는 scFvE06에 융합된 인간 IL-2-C4bpβ (IL-2-C4bpβ-E06 또는 IL-2N88R-C4bpβ-E06)는 비장 병소-형성 바이러스 (SFFV) 프로모터 하의 렌티바이러스 플라스미드에 통합되었다. "IL-2-C4bpβ-E06" (SEQ ID NO:19)은 C4BPβ의 N-말단에 융합된 인간 IL-2이고, C4BPβ는 scFVE06의 N-말단에 융합된다. "IL-2N88R-C4bpβ-E06" (SEQ ID NO:20)은 C4BPβ의 N-말단에 융합된 돌연변이된 IL-2이고, C4BPβ는 scFVE06의 N-말단 영역에 융합된다.

[0251] HEK 293T 세포는 폴리에틸렌이민 (PEI)을 사용하여 렌티바이러스 플라스미드로 70% 합류점에서 형질감염되었고, 24-30시간 동안 혈청-무함유 배지에서 배양되었다. 이후 상청액을 여과하였고, 초원심분리를 통해 농축하였고, -80℃에서 보존 전에 적절한 완충액에 재현탁하였다. 안정한 형질감염된 세포를 수득하기 위해서, HEK 293T 세포는 IL-2 융합 단백질을 생산하는 세포의 100%를 보장하기 위해서 GFP+ 세포의 세포 분류 전에 상이한 감염 다중도 (MOI)의 렌티바이러스로 감염되었다. 안정한 세포주는 48시간 동안 혈청-무함유 배지에서 배양되었고, 상청액을 회수하였으며, 농축, 완충액 교환 및 SDS-PAGE에 의한 검증 전에 효과적인 고정화 금속 친화성 크로마토그래피 (IMAC) 정제할 수 있는 HisPur Ni-NTA Resin (Thermofisher)을 사용해 정제하였다.

[0252] **인간에서 pSTAT5 분석**

[0253] 건강한 지원자로부터의 인간 혈액 샘플은 파리의 생 앙투완 병원에서 Etablissement Francais du Sang (EFS)으로부터 수득되었다. 각각의 지원자로부터 사전 동의를 얻었다. STAT5 인산화 (pSTAT5)의 유도에 대한 인간 IL-2, 융합 단백질 및 표적화 단백질의 효과는 인간 CD4+ 조절성 T 세포 (Treg; CD4+Foxp3+CD127lo/-), CD4+ 통상의 T 세포 (Tconv; CD4+Foxp3-), CD8+ T 세포 및 자연 살해 세포 (CD3-CD56+)에서 유세포측정을 사용해 평가되었다. 37℃에서 15분 동안 100 μl의 전체 혈액과 혼합된 인간 IL-2, 융합 및 표적화 단백질의 10배 희석을 Phospho-Epitopes 노출 키트 (PERFIX EXPOSE kit, Beckman Coulter)를 사용한 pSTAT5 염색 전에 수행하였다. 세포내 pSTAT5 신호와 함께, 표면 마커는 활성의 비교 및 상이한 림프구 세포 개체군에 대한 최대 유효 농도의 절반 (EC_{50}) 값의 계산을 허용하였다.

[0254] **ELISA**

[0255] 표적화 단백질 검출을 위해서, 혈장 및 단백질 수준은, 포획 항-IL-2 단일클론 항체 (MQ1-17h12) 또는 포스포콜린-BSA (LGC Biosearch technologies)를 1 μg/mL로 코팅하고, 초민감성 스트렙타비딘-HRP (1:2000; Sigma Aldrich)을 사용한 노출 전에 1 μg/mL의 항-His 항체 (1:1000; Thermofisher)를 사용해 검출을 수행한 것을 제외하고, 상기 본 명세서에 기술된 바와 동일한 프로토콜에 따라서 측정되었다.

[0256] **유세포측정 및 항체**

[0257] 전체 혈액:

[0258] 마우스 혈액 용혈 이후에, 단리된 면역 세포는 4℃에서 20분 동안 사전결정된 최적 희석으로 하기의 항체들을 사용해 염색되었다: CD3-PEfluor610 (Invitrogen), CD4V500 (BD Bioscience), CD8AF700 (BD Pharmingen), CD25PeCy7 (Invitrogen), NKp46eF660 (eBioscience), 및 CD19eF780 (eBioscience). Foxp3-FITC (eBioscience)의 세포내 검출은 FoxP3 염색 완충액 키트 (eBioscience FoxP3/Transcription)를 사용하여 고정 및 투과 세포에서 수행되었다. 세포는 cytoflex S (Beckman Coulter)에서 획득되었고, FlowJo 소프트웨어를 사용해 분석되었다. 죽은 세포는 전방/측면 산란 게이팅에 의해 제외되었다. CD4+ Treg는 CD4+CD25+Foxp3+ 세포로서 정의되었고, CD4+ Teff는 CD4+CD25+Foxp3- 세포로서 정의되며 또한 Tconv CD4+CD25+라고도 불리고, CD8+ Treg는 CD8+CD25+Foxp3+ 세포로서 정의되고, CD8+ Teff는 또한 Tconv CD8+CD25+라고도 불리고, CD8+CD25+Foxp3+ 세포로서 정의되고, 자연 살해 세포는 Nkp46+ 세포로서, 그리고 B 세포는 CD19+ 세포로서 정의되었다.

[0259] STAT5 어세이 경우에, 인간 전체 혈액은 15분 동안 막 단백질에 대한 하기의 항체들과 인큐베이션되었다: CD3-FITC, CD127-PC7, CD4-PB 및 CD8-KO, CD45RA-AF700 및 CD56-APC-eFluor780. 고정 및 투과 이후에, 세포는 세포내 p-STAT5-PE 및 Foxp3-APC 항체로 염색되었다.

[0260] **대장염 염증 실험 모델**

[0261] C57BL/6 마우스는 6일 동안 음용수 중 2.5%의 덱스트란 술페이트 소듐 (DSS; Sigma)의 경구 투여를 통해서 면역화되었다. 마우스는 체중, 그들 대변 중 혈액의 존재 및 굳기에 대해서 10일 동안 매일 모니터링되었다.

하기 채점 체계를 사용하여 중증도를 평가하였다:

[0262] - 0-5% 사이의 체중 감소: 1 / 5-10% : 2 / 10-15% : 3 / 및 15% 이상 : 4.

[0263] - 대변 굳기: 정상 대변 : 0 / 형성되었지만 무른 대변 : 1 / 묽은 대변 : 2 / 경증 설사 : 3 / 수성 설사 : 4.

[0264] - 심한 출혈: 부재 : 0 / 존재 : 2 / 심한 출혈 : 4.

[0265] **결과**

[0266] **시험관내에서 그들 표적을 인식하고, 이량체화되고, 그들 생물학적 활성을 유지하는 표적화 융합 단백질의 능력**

[0267] IL-2 구성체는 이의 기능 변경없이 염증성 조직을 표적화하도록 조직-선택적 모이어티와 조합되었다. 상세하게, IL-2-C4bpβ 또는 IL-2_{N88R}-C4bpβ는 C4bpβ의 C-말단 부분에서, 산화 인지질 예컨대 포스포콜린 (PC)에 특이적인 것으로 알려진, scFvE06에 융합되었다 **(도 1.A)**.

[0268] 표적화 단백질의 시험관내 결합을 결정하기 위해서, PC-BSA, 항-hIL-2 항체 또는 BSA는 표적화 단백질 또는 scFvE06 상청액의 첨가 및 항-His-태그 항체를 사용한 노출 전에 코팅되었다 **(도 1.B)**. PC-BSA 코팅 후에, 3개 구성체가 검출되었는데, 단백질이 PC-BSA에 결합할 수 있다는 것을 의미한다. 또한, hIL-2 코팅 이후에, 항-IL-2 및 항-His 항체에 의해 인식되는 표적화 단백질의 양호한 형태를 강조하는 표적화 융합 단백질만이 검출되었다. 마지막으로, BSA-코팅 이후에 표적화 단백질의 검출이 관찰되지 않아서 비-특이적 결합이 존재하지 않고, scFvE06은 PC에 특이적임이 확인되었다.

[0269] 여과, 정제 및 농축 이후에, 재조합 표적화 단백질은 또한 SDS-PAGE에 이어서 쿠마시 블루 염색 및 웨스턴 블롯에 의해 특징규명되었다 **(도 1.C)**. 98 kDa 근처에서 각 단백질에 대한 쿠마시 염색 후에 고유한 신호가 검출되어서, 비환원 조건 하에서 샘플 중 오직 하나의 주요 단백질이 존재한다는 것을 의미한다 **(도 1.C)**. 1차 항-인간 IL-2 또는 1차 항-히스티딘 항체에 의한 노출 여부와 무관하게, 열 및 환원 조건 하에서, 이의 단량체 형태 (50kDa) 및 이량체 형태 (100kDa)의 단백질의 특징적인 IL-2-C4bpβ-E06 및 IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06에 대한 밴드가 관찰된다. 또한, 조건과 별도로, scFvE06의 특징적인 1차 항-히스티딘 항체 노출 이후에 각 단백질에 대해 25 kDa에서 단일 밴드가 또한 관찰된다. 비교를 위해서, 천연 인간 IL-2는 17 kDa에서 밴드 관찰과 함께 1차 항-인간 IL-2 항체를 사용해서만 노출된다.

[0270] 다시 한번, STAT5 인산화를 측정하는 인간 전체 혈액 어세이를 수행하여서 IL-2 수용체를 발현하는 상이한 세포 유형에 대한 표적화 융합 단백질의 효과를 결정하였다. 조절성 T 세포 EC_{50} 은 천연 hIL-2 경우 약 5 ng/mL, IL-2-C4bpβ-E06 경우 13 ng/mL 및 IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06 경우 650 ng/mL이었고, 3배 더 많은 IL-2-C4bpβ-E06 및 130배 더 많은 IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06이 Treg 세포에 대한 동등한 pSTAT5 반응을 수득하기 위해 필요하였다는 것을 의미한다 **(도 1.D)**. pSTAT5 프로파일의 차이가 또한 Tconv, CD8+ 세포 및 NK 세포 개체군에 대해 관찰되었다.

[0271] 실제로, 감소된 pSTAT5 반응이 적어도 1000 ng/mL 까지의 용량에서 표적화 융합 단백질에 의해 관찰된데 반해, 100 ng/mL의 용량으로부터 이들 이펙터 구획에대해 천연 hIL-2에 의해서 반응이 얻어진다. 예를 들어, Tconv, CD8+ 및 NK 세포의 20% 미만은 대략 10000 ng/mL의 IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06에 반응하여 활성화된다. 이들 결과는 이량체 수용체에 대한 결합 친화성 감소로 인해서 표적화 융합 단백질의 Treg 선택성을 강조한다.

[0272] **대장염 염증 실험 모델에서 표적화 융합 단백질의 효능 증명**

[0273] 표적화 융합 단백질은 질환의 중증도를 제어하는 그들 능력에 대해서 대장염 염증 실험 모델에서 평가되었다 **(도 2.A)**. Treg의 유사한 확장을 수득하기 위해서, rAAV 용량은 IL-2 처치 그룹에서 5.10^{10} rAAV vg 내지 scFvE06, IL-2-C4bpβ-scFvE06 및 IL-2_{N88R}-C4bpβ-scFvE06 처치된 것에서 5.10^{11} rAAV vg로 조정되었다.

[0274] 주사 후 7일에, Treg 세포는 CD25 MFI의 3배 내지 4배 증가를 고려하면 rhIL-2 또는 표적화 융합 단백질이 처치되고 활성화된 그룹에서 2.5배 내지 3배까지 확장되었다 **(도 2.B)**. 돌연변이된 단백질은 이펙터 개체군을 확장시키지 않은데 반해, hIL-2 및 IL-2-C4bpβ-scFvE06 처치 결과로 3배까지 이펙터 개체군 확장이 일어났다. 또한, NK 세포는 용량이 10배 더 낮더라도 hIL-2로 처치된 마우스에서만 확장되었다.

[0275] 예상대로, 5.10^{11} rAAV vg scFvE06 주사 이후에 이들 4개 매개변수에 대한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

[0276] DSS 투여 6일 후에, 미처치 마우스는 경증 설사 (3.5의 대변 점수)와 연관된 그들 초기 체중의 대략 10%의 유의한 손실 및 중증 결장 염증으로 설명되는 대변 중 혈액의 존재를 동반한 중요한 임상적 징후가 발생되었다 **(도 2 C, D, E)**.

[0277] 이들 증상의 추가에 상응하는 질환 활성 지수 (DAI)는 3일차부터 10일차까지 증가되었고, 12 중 8의 점수에 도달한 후에 14일차까지 감소되었다 **(도 2.F)**. 비교를 위해서, scFvE06이 처치된 마우스는 유사한 체중 손실 및 대변 굳기를 가졌지만 출혈이 거의 없었는데, 이것은 미처치된 마우스와 비교하여 시간 경과에 따른 DAI의 약간의 감소를 설명한다. hIL-2에 의한 치료는 적은 체중, 매우 무르지만 수성이 아니고 출혈이 거의 없이 임상 증상을 부분적으로 제어하여서, 처음 DSS 투여 이후 10일에 5의 최대 DAI 점수를 설명한다. 흥미롭게도, 표적화 융합 단백질이 처치된 마우스는 형성되고 부분적으로 무른 대변 (2의 최대 점수)과 거의 출혈이 없는 유의하게 적은 장 임상 징후를 가졌다. 마지막으로, DAI는 각각의 표적화 융합 그룹에서 4의 점수를 초과하지 않아서, 대장염의 치료에서 이들 2개 단백질의 치료적 이득이 확인되었다.

[0278] 흥미롭게도, 상완 및 대동맥 주위 림프절에서, 장 장벽을 통해 통과하는데 필요한, 인테그린 a4β7을 발현하는 Treg는 천연 IL-2에 비해서 표적화 융합 단백질의 처치 이후에 더 양호한 비율로 존재한다. 이들 관찰은 염증 부위로 동원되는 Treg의 수가 표적화 단백질 그룹에서 증가되고, 간접적으로 이들 표적화 단백질이 처치된 마우스의 장에서 IL-2의 양이 더 높다는 것을 시사하여서, IL-2-C4bpβ-scFvE06 및 IL-2_{N88R}-C4bpβ-scFvE06의 표적화 능력을 강조한다. 유사하게, 천연 IL-2와 비교하여 이들 2개 그룹에서 Ki67을 발현하는 더 많은 Treg가 존재하여서, 이들 Treg 증식이 이들 2개 그룹에서 더 많다는 것을 의미한다.

[0279] **실시예 2: 생체내 약동학**

[0280] 방법

[0281] PK 분석

[0282] 7주령 암컷 C57Bl/6 마우스는 100 μl 중 50 KIU의 인간 IL-2 또는 IL-2-C4bpβ-scFvE06이 피하로 주사되었다. 100 μl의 혈액이 ELISA에 의한 hIL-2 용량을 위해 상이한 시점에 수집되었다: 기준점, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 24시간 및 48시간. 혈장 샘플은 1/1000 까지 적절한 용액 중에서 10배 연속 희석되었다. 공급사 권장 사항을 사용하여 ELISA를 수행하였고, 플레이트는 450 nm에서 판독되었다. 양쪽 그룹에서 hIL-2의 농도는 적절한 표준 곡선을 사용해 계산되었다.

[0283] IL-2-C4bpβ-scFvE06의 생체내 결합

[0284] 건선 모델

[0285] 쥐의 건선 모델은 6일 동안, 마우스 귀에 5% 이미퀴모드 크림의 매일 도포를 통해서 유도되었다. 내부 대조군으로서, 각 마우스의 반대측 귀는 동일한 일정에 따라 바셀린이 도포되었다. 건선 유도 전 10일에, 8주령 암컷 Balb/c 마우스는 IL-2-C4bpβ-scFvE06을 코딩하는 AAV가 5.10^{11} vg로 IP 주사되었다. 건선의 대조군 마우스는 처치되지 않았다. 실험 종료 시에, 최초 도포 후 6일에, 마우스를 안락사시켰고, 귀를 제거하고, OCT에 즉시 냉동시켰다. 고정, 투과, 및 IL-2-C4bpβ-scFvE06 검출용 항-6X-His 태그-Cy5 및 DAPI (핵 염색)에 의한 염색 전에 귀의 8 μm 단면부를 크리오스타트를 사용해 만들었다. 형광 현미경을 사용해 단면부를 분석하였다.

[0286] DSS-유도된 대장염 모델

[0287] 마우스의 DSS-유도된 대장염 모델은 6일 동안 음용수 중 3% 덱스트란-술페이트 소듐의 첨가에 의해 유도되었다. 대장염 유도 전 10일에, 8주령 암컷 C57Bl/6 마우스는 IL2 또는 IL-2-C4bpβ-scFvE06을 코딩하는 AAV가 5.1011 vg로 IP 주사되었다. 대조군 마우스 그룹을 첨가하였고, 처치하지 않았다. 실험 종료 시에, 유도 후 10일에, 최대 염증에서, 마우스를 안락사시켰고, 결장을 제거하여 OCT에 즉시 냉동시켰다. 고정, 투과, 및 IL-2-C4bpβ-scFvE06 검출용 항-IL2-HRP 또는 항-6X-His 태그-HRP로 염색 이전에 크리오스타트를 사용해 귀의 8 μm 단면부를 만들었다. 금속 강화 DAB 기질과 인큐베이션 이후에 조직화학 갈색/검은색 착색을 수득하였다.

[0288] 결과

[0289] 약동학

[0290] 분자의 반감기가 증가되었는지 여부를 결정하기 위해서, SC 주사된 50 KIU, IL2 또는 IL-2-C4bpβ-scFvE06의 단일 주사 이후 마우스에서 약동학 실험이 수행되었다 (도 3). IL2는 신속하게 증가되어서 1시간 후에 Tmax에 도달하였고, 이후 10시간까지 매우 빠르게 감소되어서 IL2가 거의 검출가능하지 않았다. 다른 한편으로, IL-2-C4bpβ-scFvE06은 보다 느리게 증가되어서, 주사 후 1시간과 4시간 사이에 Tmax에 도달하였다. 혈장 농도의 감소도 역시 더 느렸고, 분자는 여전히 24시간에 검출가능하였다. 이러한 결과는 IL-2-C4bpβ-scFvE06이 증가된 반감기를 갖는다는 것을 입증하는데, 이러한 설정에서 약 3배 증가로 계산되었다. 이것은 Treg에 대한 IL-2의 유효 기간의 증가를 허용할 수 있으며, Treg의 증가는 보다 긴 기간 동안 유지된다.

[0291] IL-2-C4bpβ-scFvE06의 생체내 표적화의 개념 증명

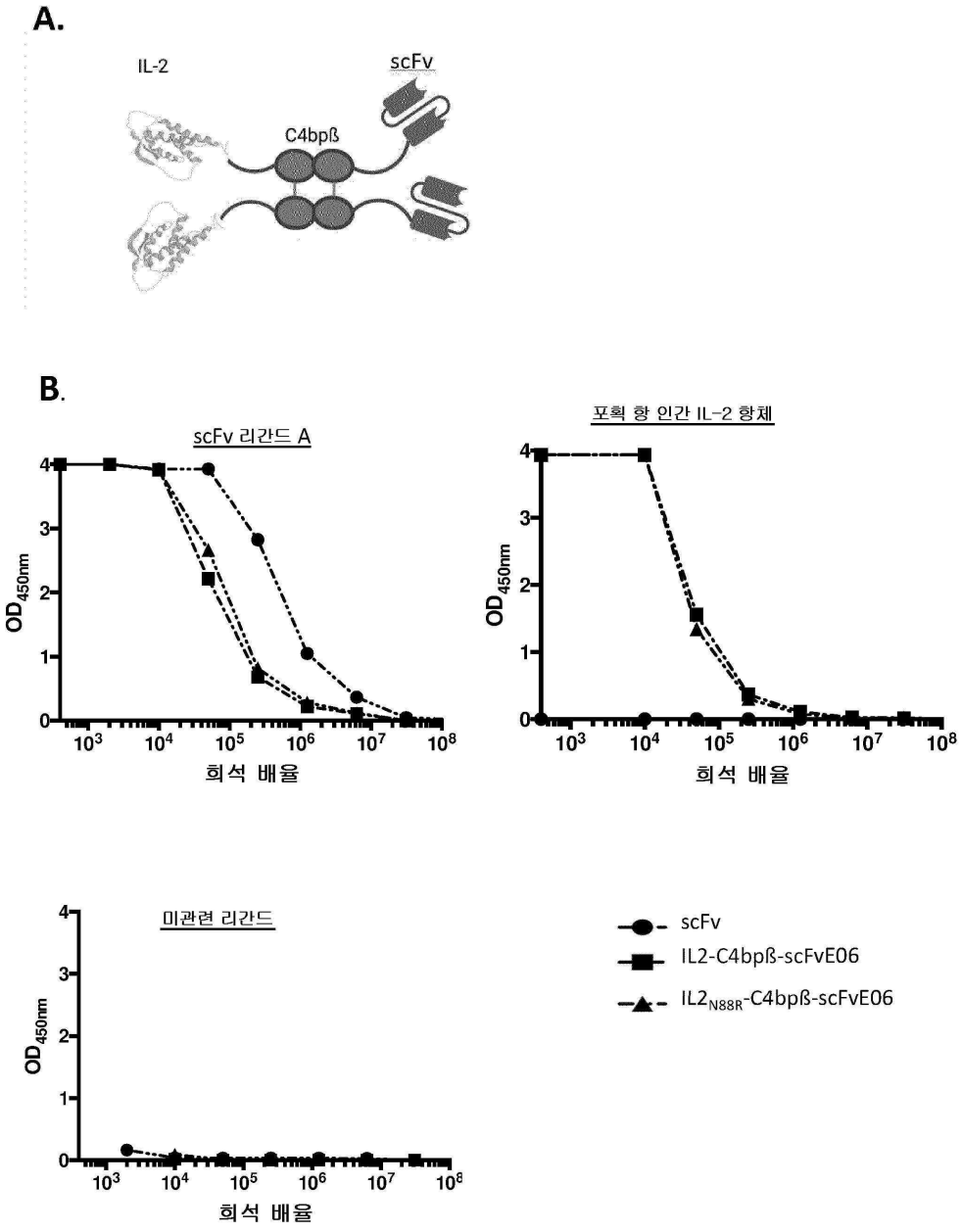
[0292] 우리는 염증성 질환, 건선 및 대장염의 2개 모델을 개발하였다.

[0293] 건선은 한쪽 귀에 5% 이미퀴모드 크림의 국소 도포에 의해 유도되었고, 반대측 귀가 염증의 내부 대조군으로서 사용되었을 경우에 바셀린이 도포되었다. 이들 조건에서, 한쪽 귀는 염증이 발생되어서 IL-2-C4bpβ-scFvE06에 의해 표적화되어야 하는 한편 나머지 귀는 염증이 발생되지 않고, 특히 표적화되지 않아야 한다. 간략하게, 이미퀴모드 및 바셀린의 매일 도포 후 6일에, 마우스는 안락사되었고, 귀를 제거하여, 냉동하고, 단면 절개를 수행하였고, 형광 현미경을 위해 시아닌 5 형광색소와 커플링된 항-6X-His태그 및 DAPI로 염색하였다. 처치되지 않은, 대조군 마우스는 바셀린-처치된 귀, 또는 이미퀴모드-처치된 귀에서 임의의 6X-His 태그 염색을 보이지 않았지만, 우리는 IL-2-C4bpβ-scFvE06을 코딩하는 AAV가 주사된 마우스에서 우리 분자의 염색을 관찰하였는데, 모두 염증이 발생된 귀 주변이었다. 동일 마우스의 대조군으로서, IL-2-C4bpβ-scFvE06은 바셀린-처치된 귀에서 검출되지 않아서, 우리의 표적화 분자의 염증 조직에 대한 생체내 특이적 결합이 입증되었다.

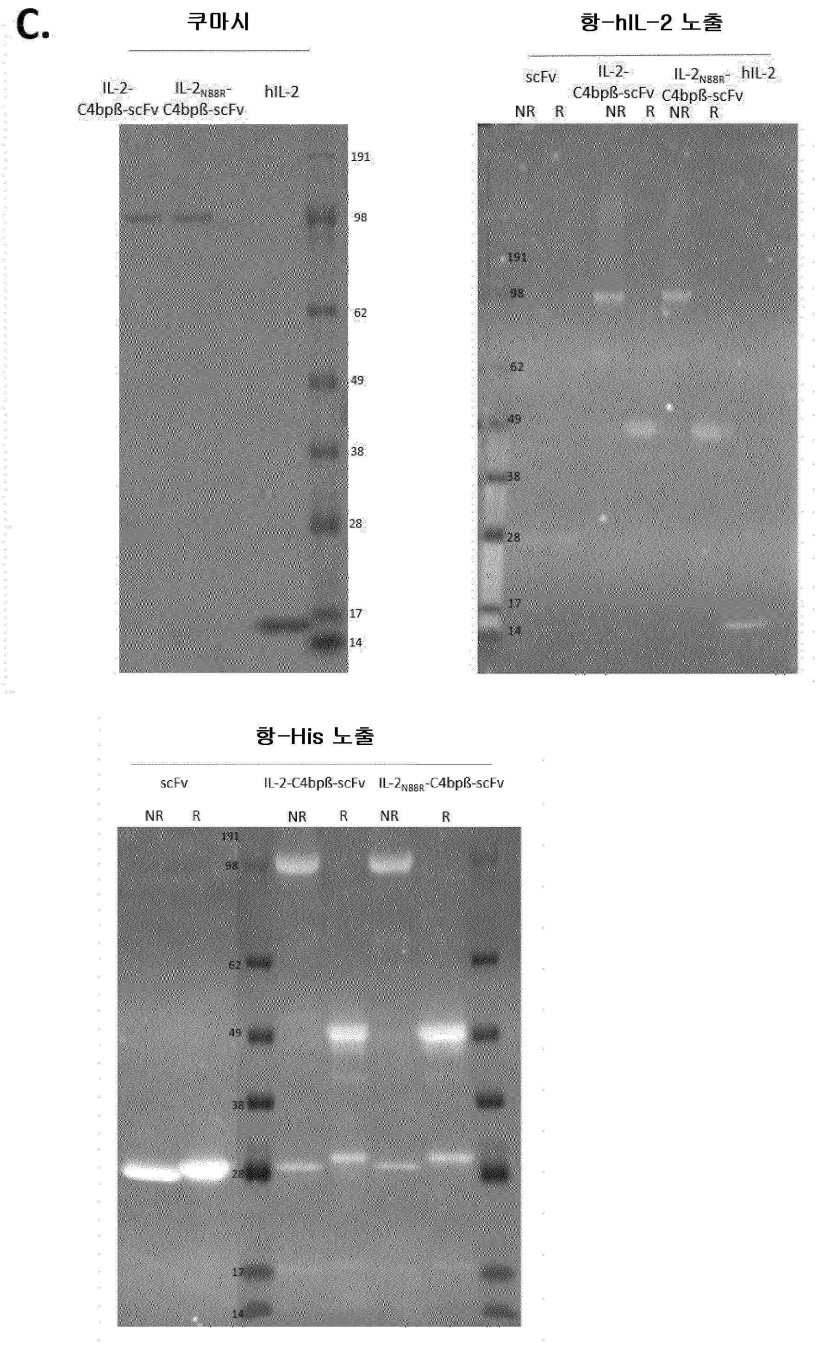
[0294] 우리는 상이한 조건에서 우리 분자를 시험하기 위해서 DSS-유도된 대장염 모델을 추가로 개발하였다 (도 4). 3% DSS는 대장염을 유도하기 위해서 6일 동안 음용수에 첨가되었다. 염증이 최대인, 10일에, 마우스를 안락사시켰고, 결장을 제거하여, 냉동시키고, 단면-절개를 수행하고, HRP에 커플링된 항-hIL2 또는 항-6X-His 태그로 염색하였다. 면역조직화학 염색은 금속 강화 DAB 기질을 사용해 수행되었고, 검은색 또는 진갈색 착색이 발생되어서 분자가 발견되었다. 그 결과, 미처치된 대조군 그룹이나, IL2-처치된 그룹은 결장에서 IL2 또는 6X-His 태그의 검출을 입증하지 못하였다. 그러나, IL-2-C4bpβ-scFvE06으로 처치된 마우스는 결장에서 IL2 및 6X-His 태그 둘 모두의 검출을 보여서, 염증 조건에서 IL-2-C4bpβ-scFvE06의 생체내 특이적 결합을 다시 입증하였다.

도면

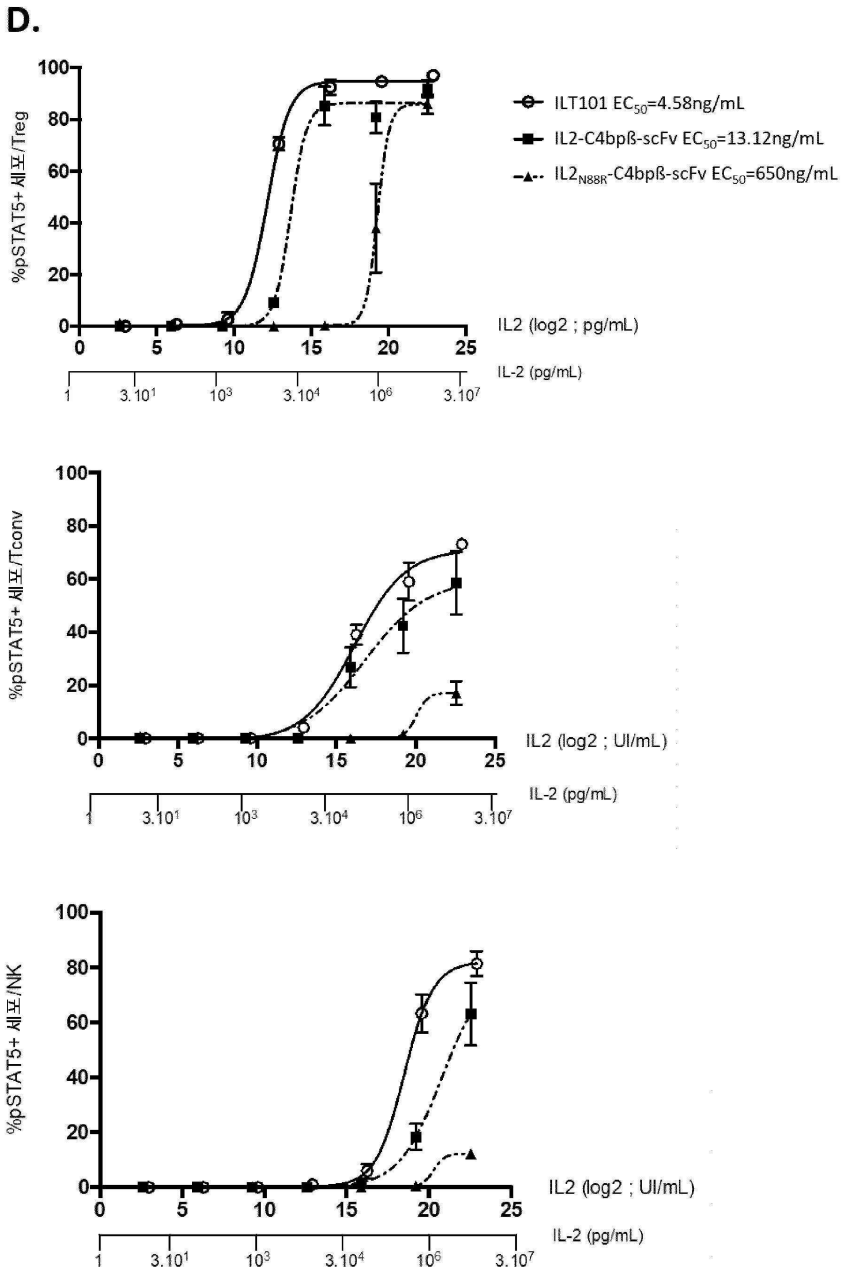
도면1ab


A.
IL-2
scFv
C4bpß
B.
scFv 리간드 A
포획 항 인간 IL-2 항체
OD450nm
희석 배율
미관련 리간드
scFv
IL2-C4bpß-scFvE06
IL2N88R-C4bpß-scFvE06

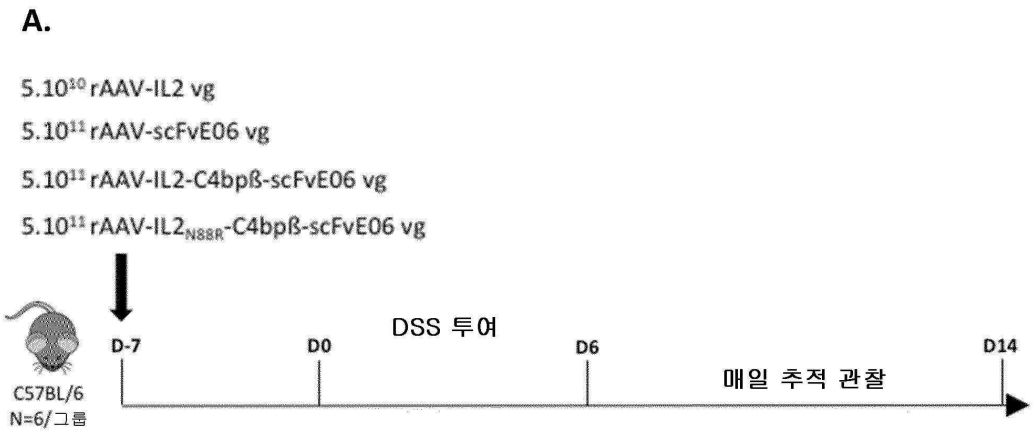
도면1c


C.
쿠마시
IL-2-C4bpß-scFv
IL-2N88R-C4bpß-scFv
hIL-2
191
98
62
49
38
28
17
14
항-hIL-2 노출
scFv
IL-2-C4bpß-scFv
IL-2N88R-C4bpß-scFv
hIL-2
NR R NR R NR R
191
98
62
49
38
28
17
14
항-His 노출
scFv
IL-2-C4bpß-scFv
IL-2N88R-C4bpß-scFv
NR R NR R NR R
191
98
62
49
38
28
17
14

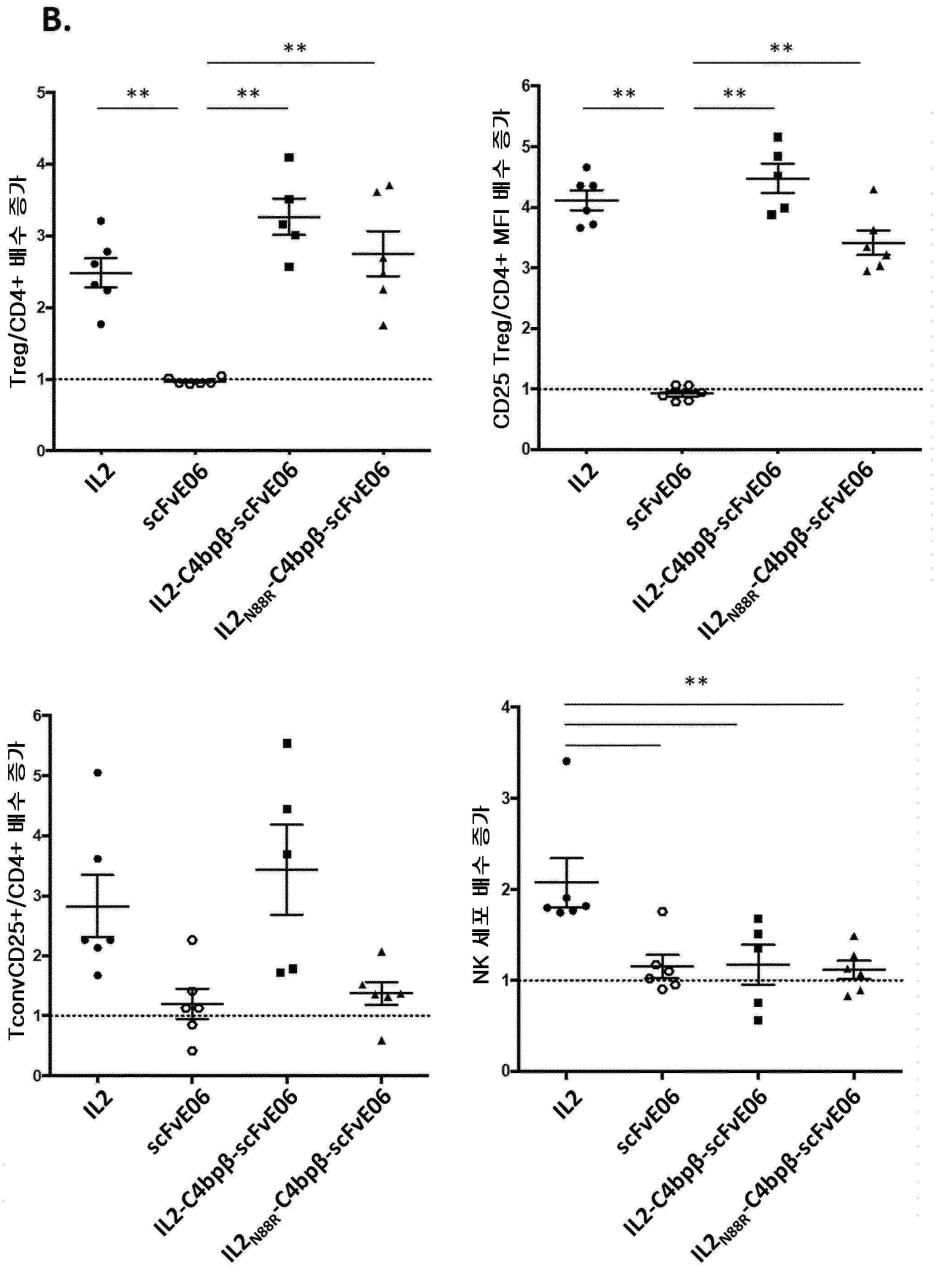
도면1d


D.
%pSTAT5+ 세포/Treg
%pSTAT5+ 세포/Tconv
%pSTAT5+ 세포/NK
ILT101 EC50=4.58ng/mL
IL2-C4bpß-scFv EC50=13.12ng/mL
IL2N88R-C4bpß-scFv EC50=650ng/mL
IL2 (log2 ; pg/mL)
IL2 (log2 ; UI/mL)
IL-2 (pg/mL)

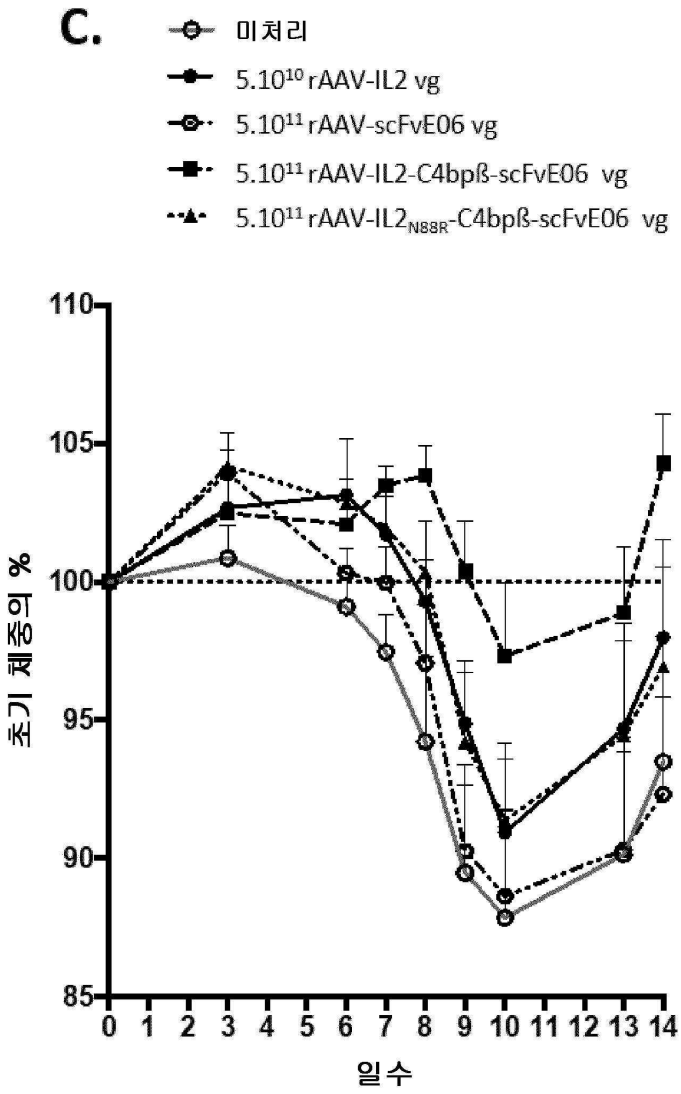
도면2a


A.
5.10¹⁰ rAAV-IL2 vg
5.10¹¹ rAAV-scFvE06 vg
5.10¹¹ rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10¹¹ rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
C57BL/6
N=6/그룹
D-7
D0
DSS 투여
D6
매일 추적 관찰
D14

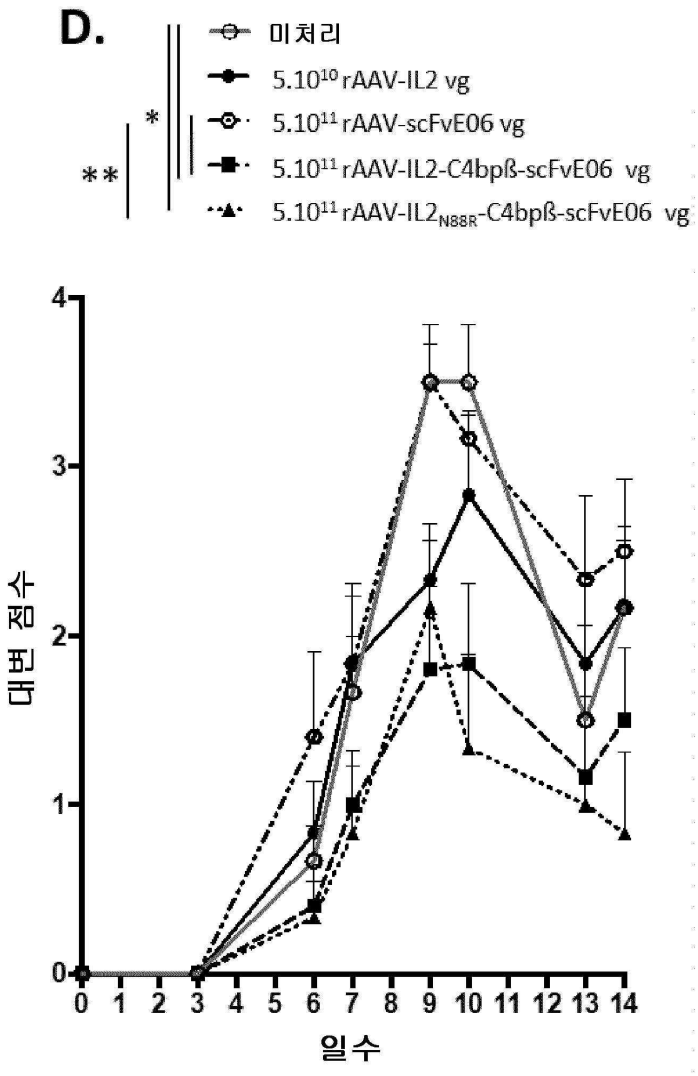
도면2b


B.
Treg/CD4+ 배수 증가
CD25 Treg/CD4+ MFI 배수 증가
TconvCD25+/CD4+ 배수 증가
NK 세포 배수 증가
**
IL2
scFvE06
IL2-C4bpβ-scFvE06
IL2N88R-C4bpβ-scFvE06

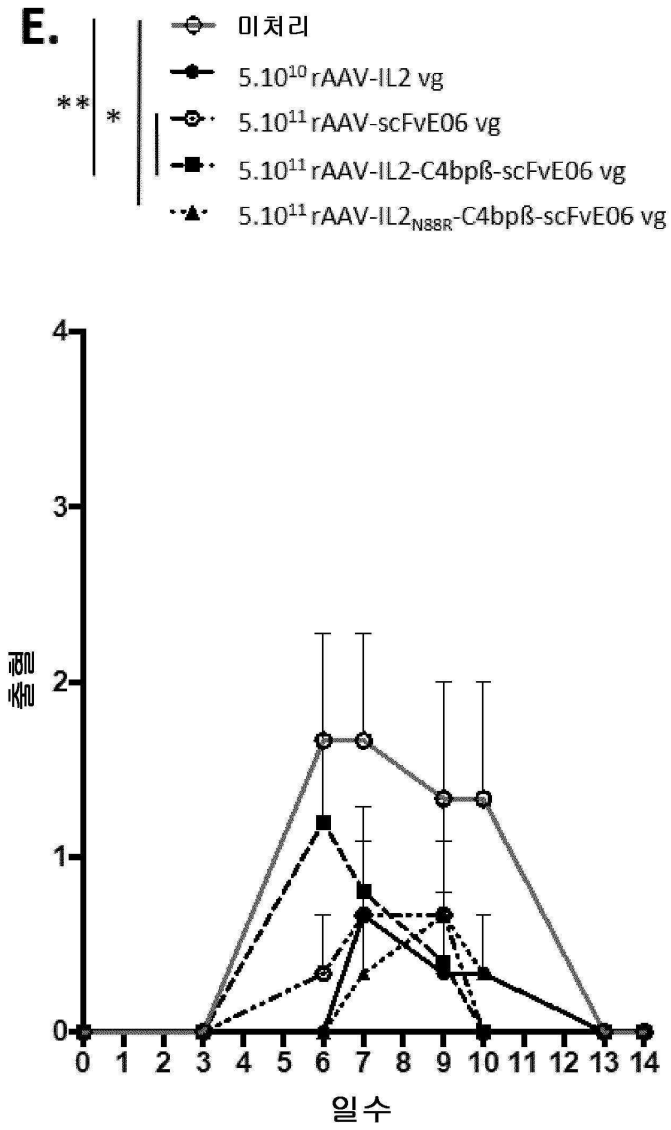
도면2c


C.
미처리
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
초기 체중의 %
110
105
100
95
90
85
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
일수

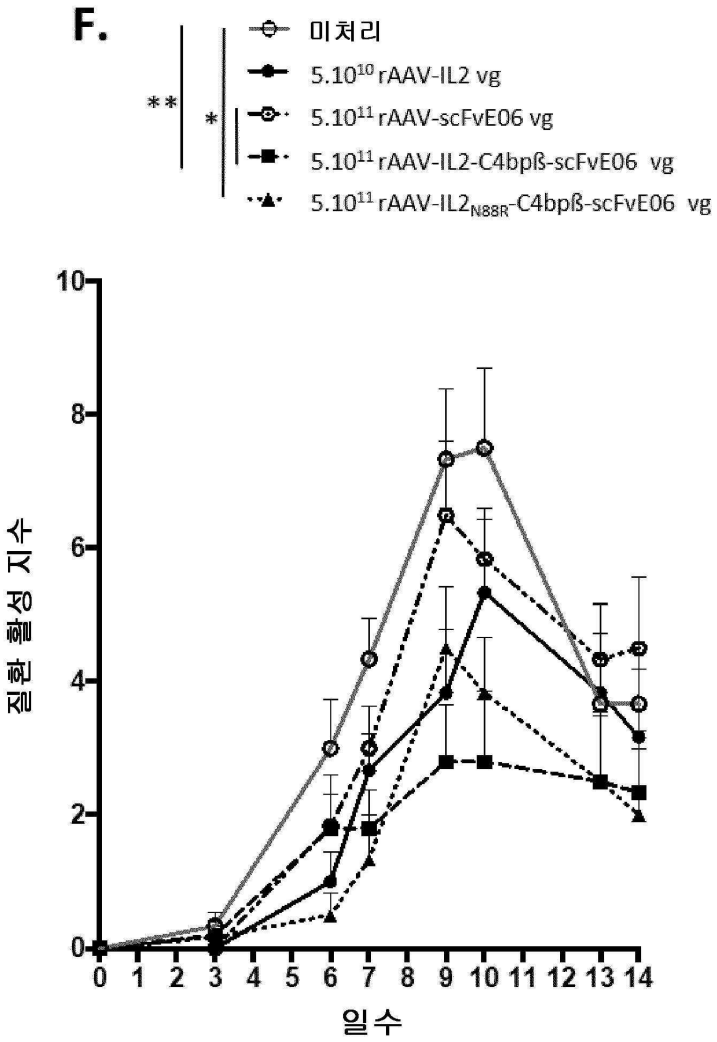
도면2d


D.
**
*
미처리
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
대변 점수
0
1
2
3
4
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
일수

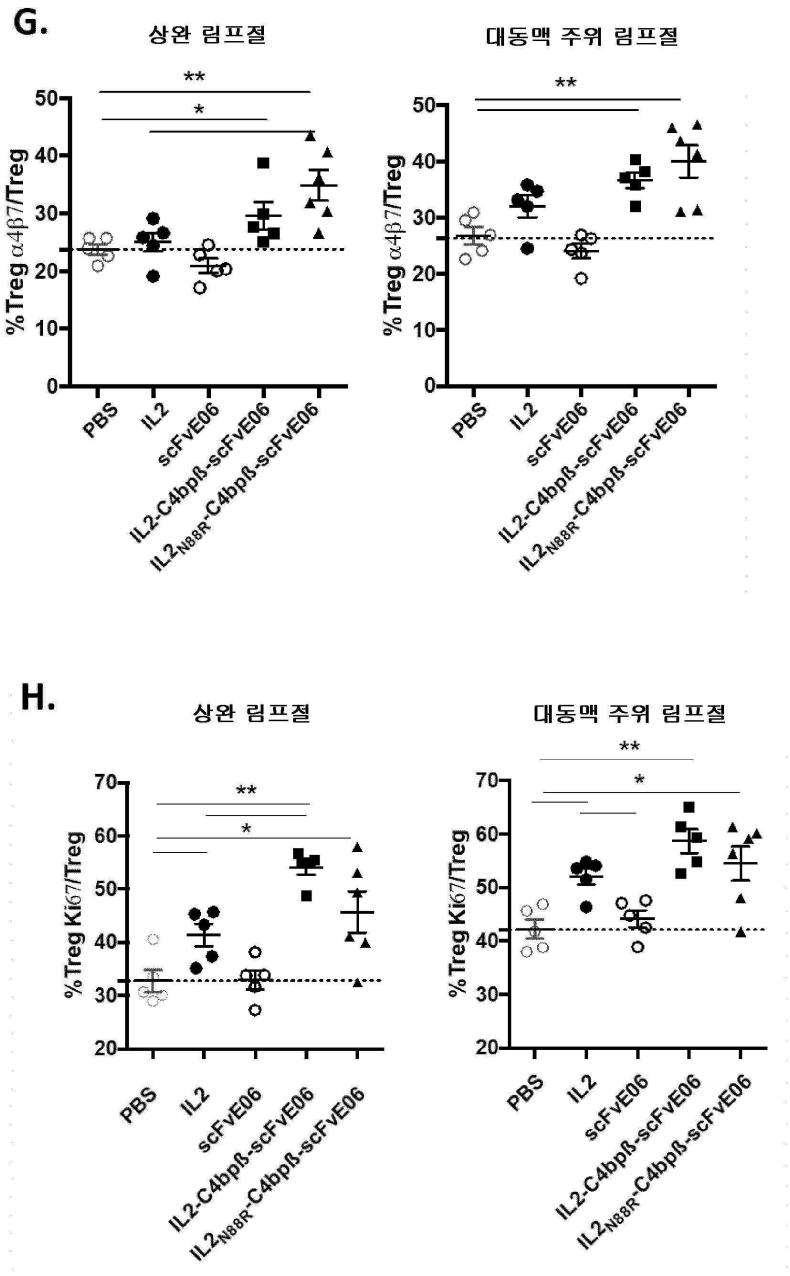
도면2e


E.
**
*
미처리
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
종양 부피
0
1
2
3
4
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
일수

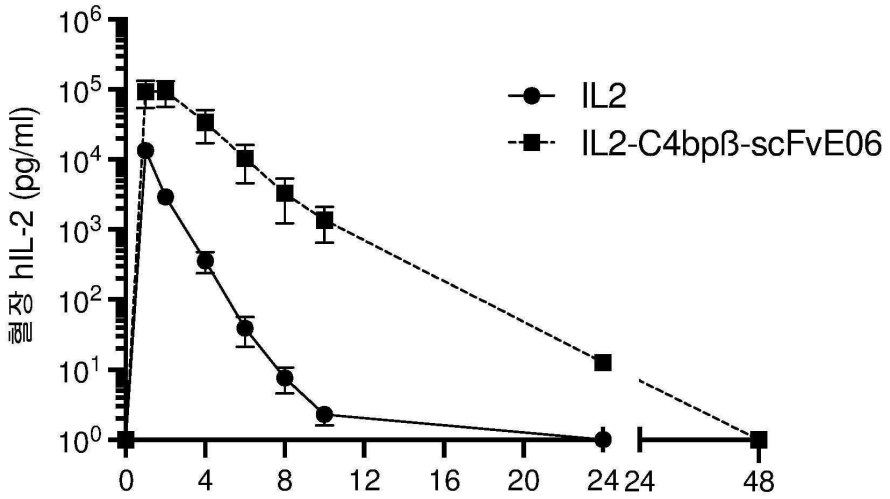
도면2f


F.
**
*
미처리
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
질환 활성 지수
일수
0
2
4
6
8
10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

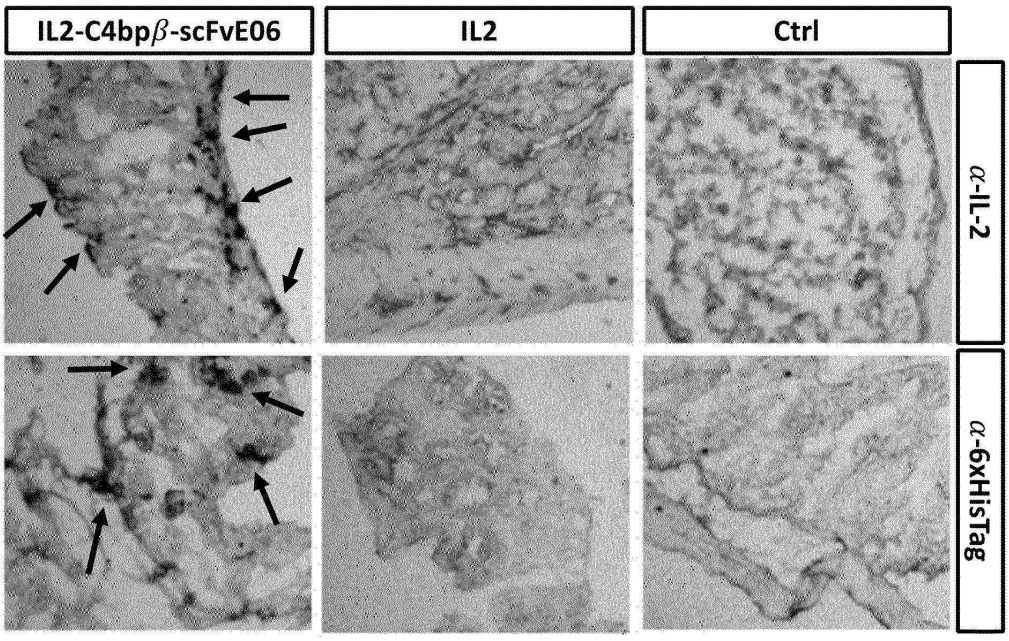
도면2gh


G.
상완 림프절
대동맥 주위 림프절
% Treg α4β7/Treg
**
*
PBS
IL2
scFvE06
IL2-C4bpß-scFvE06
IL2N88R-C4bpß-scFvE06
H.
상완 림프절
대동맥 주위 림프절
% Treg Ki67/Treg

도면3


혈장 hIL-2 (pg/ml)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0
4
8
12
16
20
24
24
48
IL2
IL2-C4bpß-scFvE06

도면4


IL2-C4bpβ-scFvE06
IL2
Ctrl
α-IL-2
α-6xHisTag

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.